

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de fármacos em mananciais do estado de São Paulo e estudo da sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*

Raquel Cardoso de Souza

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Determinação de fármacos em mananciais do estado de São
Paulo e estudo da sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria
*Microcystis aeruginosa***

Raquel Cardoso de Souza

Versão Original

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

C725d Cardoso de Souza, Raquel
Determinação de fármacos em mananciais do estado
de São Paulo e estudo da sua ecotoxicidade sobre a
cianobactéria *Microcystis aeruginosa* / Raquel
Cardoso de Souza. - São Paulo, 2017.
180 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto Junior, Ernani

1. Fármacos. 2. Meio ambiente. 3. *Microcystis
aeruginosa*. 4. Efeitos ecotoxicológicos,. 5. LC-
MS/MS. I. T. II. Pinto Junior, Ernani, orientador.

Raquel Cardoso de Souza

**Determinação de fármacos em mananciais do estado de São Paulo e
estudo da sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria
Microcystis aeruginosa.**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

RESUMO

SOUZA, R. C. **Determinação de fármacos em mananciais do estado de São Paulo e estudo da sua ecotoxicidade sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa***. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A contaminação de corpos d'água por fármacos é um tema de extrema relevância, tendo em vista problemas como a escassez de água, florações de cianobactérias tóxicas e lançamentos clandestinos de efluentes domésticos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo determinar a presença de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) em mananciais do estado de São Paulo, bem como avaliar a toxicidade desses compostos à cianobactéria *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08. Um método por LC-MS/MS foi desenvolvido e validado, de acordo com a RDC nº 166 da ANVISA, para a detecção de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras ambientais. As represas Guarapiranga e Billings, bem como os rios Taiçupeba, Sorocaba, Baixo Cotia, Grande e Paraíba foram monitorados de abril a setembro de 2017. A toxicidade dos fármacos foi avaliada por meio do monitoramento do crescimento, produção de microcistinas e viabilidade celular da cianobactéria *M. aeruginosa* LTPNA 08. CAF foi detectada em todas as amostras analisadas, com concentrações que variaram de 6,6 ng.L⁻¹ a 16,47 µg.L⁻¹. No Rio Cotia foram verificadas as maiores concentrações de CAF, FLX e BZF (16,47 µg.L⁻¹; 3,5 ng.L⁻¹ e 322 ng.L⁻¹, respectivamente). A LVX, cujos produtos de biotransformação não foram monitorados, não foi detectada em nenhuma amostra analisada. A concentração de 50 µg.L⁻¹ de FLX inibiu o crescimento da cianobactéria em 82,3% (CE₅₀: 31,4 µg.L⁻¹). Em relação à produção de microcistinas totais, os fármacos inibiram a liberação da fração extracelular para a maior concentração testada ao longo do tempo de monitoramento, embora não tenham demonstrado efeito sobre a viabilidade celular. Sendo assim, considerando-se que fármacos estão presentes nos mananciais monitorados no estado de São Paulo e que a FLX pode causar efeito sobre a *M. aeruginosa*, os efeitos decorrentes da exposição a concentrações ambientais contínuas e cumulativas de fármacos em corpos d'água devem ser estudados. Além disso, uma vez que a ocorrência destas substâncias e outros contaminantes antropogênicos no ambiente aquático natural é uma questão emergente devido aos efeitos adversos potenciais que estes compostos representam para a vida aquática e os seres humanos, os tipos e níveis destes compostos, que têm um impacto maior na qualidade da água, deve ser constantemente monitorada. Práticas de gestão que investem em saneamento e na redução da descarga de efluentes não tratados, e um plano de proteção de recursos hídricos com o objetivo de garantir a segurança da água seriam medidas essenciais para reduzir o aporte de contaminantes nos corpos d'água do estado de São Paulo.

Palavras chaves: Fármacos, meio ambiente, efeitos ecotoxicológicos, *Microcystis aeruginosa* e LC-MS/MS.

ABSTRACT

SOUZA, R. C. **Pharmaceuticals determination in São Paulo state springs and evaluation of their toxicity in cyanobacterium *Microcystis aeruginosa***. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Contamination of water bodies by drugs is a subject of extreme relevance considering related problems such as water scarcity, harmful cyanobacterial blooms and discharge of untreated domestic effluents. Therefore, the aim of this work was to determine the presence of caffeine (CAF), fluoxetine (FLX), levothyroxine (LVX) and bezafibrate (BZF) in springs in the State of São Paulo, and to evaluate the toxicity of these compounds in cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08. A LC-MS/MS method was developed and validated according to RDC n° 166 of ANVISA to assess the concentration of CAF, FLX, LVX and BZF in environmental samples. Guarapiranga and Billings reservoirs, as well as the Taiçupeba, Sorocaba, Baixo Cotia, Grande and Paraíba rivers were monitored from April to September 2017. The drugs toxicity in *M. aeruginosa* LTPNA 08 was assessed by monitoring their effects on cyanobacterial growth, microcystins production and cell viability by flow cytometry. CAF was detected in all analyzed samples at concentrations ranging from 6.6 ng to 16.47 µg.L⁻¹. Among studied sites, Cotia river showed the highest concentrations of CAF, FLX and BZF (16.47 µg.L⁻¹, 3.5 ng.L⁻¹ and 322 ng.L⁻¹, respectively). LVX, which biotransformation products were not monitored, was not detected in any of the analyzed samples. Regarding the drugs toxicity, 50 µg.L⁻¹ of FLX inhibited the cyanobacterial growth in 82.3% (EC₅₀ of 31.4 µg.L⁻¹). Although no effect on cell viability was seen by flow cytometry, the highest concentrations of all compounds tested were able to inhibit the release of microcystins. Therefore, considering that some of the drugs monitored showed to be present in water sources in São Paulo State and that FLX affects cyanobacteria *M. aeruginosa* growth, the effects of continuous and cumulative exposure at environmental drug concentrations of in water bodies should be evaluated. Also, since the occurrence of these substances and other anthropogenic contaminants in the natural aquatic environment is an emerging issue due to the potential adverse effects these compounds pose to aquatic life and humans, the types and levels of these compounds, which have a greater impact on water quality, should be constantly monitored. Management practices investing in sanitation and in reducing discharge of untreated effluents, as well as a plan for water resources protection with the goal of ensuring water security would be essential measures in reducing drugs loading into water bodies situated in São Paulo State.

Keywords: Pharmaceuticals, drugs, environment, ecotoxicological effects, *Microcystis aeruginosa* and LC-MS / MS.

**Dedico esta pesquisa aos meus pais,
por me darem asas para voar e ninho para pousar.**

Agradecimentos

Aos meus pais por serem meu porto seguro nos dias fáceis e difíceis, por me ensinarem que sou capaz de realizar meus sonhos, que nada é impossível e que nunca estarei só.

A minha irmã Izabel, por ser minha amiga e companheira em todos os momentos, por orar e sonhar comigo.

Ao meu irmão Marcelo por ser meu exemplo desde a infância e por ter me dado junto com a Aline os três amores da minha vida, meus sobrinhos (Davi, Theo e Vítor).

Ao meu sobrinho Davi, por me incentivar mesmo sem saber.

A todos os meus mestres que foram fonte de inspiração, em especial ao meu orientador Ernani, pela amizade, incentivo e orientações. A professora Eliane, por ter me apresentado, em 2008, o tema sobre a contaminação das águas por medicamentos e ter cultivado em mim o entusiasmo por esse assunto. As professoras Cláudia e Maria Elisa por serem meus exemplos e por me incentivarem a buscar meus sonhos.

A todos meus amigos de Florianópolis em específico os da Farmácia-UFSC, do Grupo de Estudo em Saneamento Descentralizado, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental e da Igreja Presbiteriana Independente de Florianópolis.

A todos os colegas e amigos do LTPNA, em especial a Fabi e a Kaká por serem amigas, cúmplices, parceiras de experimentos e por tornarem meus dias no laboratório mais especiais. Ao Thyago por ter me ajudado durante o último e mais difícil ano de doutorado e ao Gustavo por ter me auxiliado nas análises estatísticas.

Aos amigos Luana, Rafael, Juliana, Alexandre, Carmem, Neila, Nádia, Cris e Clarice por serem minha “família” paulistana durante esses quatro anos, por estarem presentes em todos os momentos e por me fazerem sorrir das coisas mais simples da vida.

A CAPES, CNPq, FAPESP e FUSP pelo apoio financeiro.

E por fim sou grata Aquele que me amou primeiro, Aquele que me deu sonhos e forças para conquistá-los.

“Menor que meu sonho não posso ser”.

(Lindolf Bell)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação comercial do cartucho Oasis [®] HLB em coluna e estrutura química do sorvente.....	32
Figura 2. Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas.....	37
Figura 3. Etapas da extração em fase sólida.....	42
Figura 4. Efeito de MeOH:H ₂ O (70:30; v/v) e ACN:H ₂ O (70:30;v/v) sobre a eficiência de ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo e negativo para CAF, FLX, LVX e BZF quando a concentração de 10 µg.mL ⁻¹ foi injetada (1 µL) no EM. As colunas representam as médias das intensidades dos íons de cada composto e as barras os desvios padrão (n=3).....	42
Figura 5. Intensidade dos íons gerados pela ionização por ESI (+) da solução padrão de CAF, FLX, LVX e BZF (10 µg.mL ⁻¹) injetada em EM utilizando como FM: MeOH:H ₂ O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH e ACN:H ₂ O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH. As colunas representam a média ± desvio padrão (n=3).....	48
Figura 6. Cromatograma de íons totais gerado por LC-MS/MS em ESI (+) para o teste de gradiente 5, onde: 1= CAF [M+H] ⁺ (m/z 195,0 > 138,1), 2= FLX [M+H] ⁺ (m/z 310,0 > 44,1), 2*= FLX-D6 (PI) [M+H] ⁺ (m/z 316,0 > 44,1), 3= LVX [M+H] ⁺ (m/z 777,4 > 731,7), 4= BZF [M+H] ⁺ (m/z 362,0 > 317,1). Após a injeção de 1µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 20 µg. L ⁻¹	49
Figura 7. Cromatograma gerado por LC-MS/MS em ESI (+) para o teste de gradiente5, onde: 1= CAF [M+H] ⁺ (m/z 195,0 > 138,1), 2= FLX [M+H] ⁺ (m/z 310,0 > 44,1), 2*= FLX-D6 (PI) [M+H] ⁺ (m/z 316,0 > 44,1), 3= LVX [M+H] ⁺ (m/z 777,4 > 731,7), 4= BZF [M+H] ⁺ (m/z 362,0 >317,1). Após a injeção de 1 µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 20 µg.L ⁻¹	50
Figura 8. Espectros “fullscan” dos compostos na forma [M+H] ⁺ :CAF =195,0(A);FLX=310 (B), LVX=777,4 (C) e BZF=362,0 obtidos por infusão direta.....	52
Figura 9. Resumo da extração em fase sólida definida no	

estudo.....	55
Figura 10. Cromatograma obtido por LC-MS/MS, onde se observa o efeito residual da FLX em uma amostra de branco de solvente (vermelho) após análise de uma solução padrão FLX (em preto) na concentração de 1 mg.mL ⁻¹	57
Figura 11. Cromatograma obtido por LC-MS/MS, em que pode ser observado o efeito residual da FLX (devido à modificação na programação do autoinjeter) em uma amostra de branco de solvente (em vermelho), após análise de uma solução padrão contendo 1mg.mL ⁻¹ de FLX (em vermelho).....	59
Figura 12. Cromatograma (TIC) do branco de amostra fortificada com PI (FLX - d6), após extração em fase sólida.....	60
Figura 13. Representação da ionização da hidroxila fenólica em pH próximo de 7	64
Figura 14. Etapas da reação de desidatação da levotiroxina em meio aquoso.....	65
Figura 15. Estados brasileiros nos quais foi avaliada a presença de fármacos em amostras de águas potável, superficiais e marinhas.....	70
Figura 16. Principais classes farmacológicas detectadas em águas brasileiras.....	71
Figura 17. Fórmula estrutural da Cafeína.....	86
Figura 18. Fórmula estrutural da Fluoxetina.....	88
Figura 19. Fórmula estrutural da levotiroxina.....	90
Figura 20. Fórmula estrutural dado bezafibrato.....	93
Figura 21. Cromatograma de Íons Totais (TIC) representativo das lavagens dos frascos.....	103
Figura 22. Fotomicrografia da espécie <i>Microcystisa eruginosa</i> (Kützing) Kützing.....	121
Figura 23. Fórmula estrutural geral da microcistina.....	122
Figura 24. Hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal (1), critérios de contagem adotados (2) e a imagem real vista através do microscópio, aumento de 10X (3).....	127
Figura 25. Erlenmeyers contendo os cultivos de <i>M. aeruginosa</i> LTPNA 08, expostos as cinco diferentes concentrações dos compostos CAF, FLX, LVX e BZF (n=3).....	129
Figura 26. Clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda das MC-LR e formação do íon <i>m/z</i> 135 (analisado por ESI em modo positivo).....	131

Figura 27. Curva de Linearidade, equação de reta e R^2 obtidos por meio do nº de células.mL ⁻¹ versus absorvância (nm) (n=3).....	136
Figura 28. Curvas de crescimento da <i>Microcystis aeruginosa</i> (LTPNA 08) ao serem expostas a cinco concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF, e controle, ao longo de 24 dias de exposição. Cada ponto do gráfico é representado pela média ± desvio padrão.....	137
Figura 29. Produção de MC total intracelular (Média ± DP), frente às concentrações testadas e ao período amostrado.....	141
Figura 30. Efeito da exposição à concentração de 50 µg.L ⁻¹ de CAF, FLX, LVX e BZF sobre a produção de MC total, frações intra e extracelular (média ± DP) produzidas pela <i>M. aeruginosa</i> durante 24 dias de exposição.....	143
Figura 31. Variação da viabilidade celular (Média ± DP) ao longo de 24 dias em relação à exposição à CAF, FLX, LVX e BZF na concentração de 50 µg.L ⁻¹	146
Figura 32. Decaimento da concentração de 50 µg.L ⁻¹ (Média ± DP) de CAF e BZF ao longo do tempo.....	148
Figura 33. Decaimento da concentração de FLX (Média ± DP) ao longo de 24 dias.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre extração líquido-líquido e extração em fase sólida.....	30
Tabela 2. Aplicações da Oasis [®] HLB para a extração de fármacos de amostras ambientais.....	33
Tabela.3. Valores das massas de cada composto e suas formas protonadas [M + H] ⁺ e não-protonadas [M – H] ⁻	39
Tabela 4. Parâmetros da fonte utilizados no espectrômetro de massas.....	40
Tabela 5. Informações e propriedades físico-químicas dos compostos avaliados durante a validação do método.....	43
Tabela 6. Gradiente de eluição para a obtenção da melhor separação cromatográfica.....	49
Tabela 7. Valores de R determinados para CAF, FLX, LVX e BZF a partir da intensidade dos íons monitorados <i>versus</i> os volumes injetados (5; 10; 15 e 20 µL)	51
Tabela 8. Parâmetros otimizados pelo <i>Software Optimizer</i> em ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo para CAF (10 µg.mL ⁻¹), FLX (10 µg.mL ⁻¹), LVX (10 µg.mL ⁻¹), BZF (10 µg.mL ⁻¹) e FLX D6 (10 µg.mL ⁻¹) com FM composta por ACN a 0,1% de HCOOH: H ₂ O a 0,1% de HCOOH (70:30; v/v).....	51
Tabela 9. Porcentagem de recuperação encontrada para os analitos em diferentes proporções de solução extratora e em pH 5 e 2,5.....	53
Tabela 10. Resumo das condições cromatográficas, do espectrômetro de massas e da extração em fase sólida,desenvolvidos para a quantificação de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras ambientais de água por LC-MS/MS.....	56
Tabela 11. Programação manual da sequência de injeção no autoinjeter.....	57
Tabela 12. Resultados dos parâmetros validados para a CAF, FLX, LVX e BZF para o método proposto.....	61
Tabela 13. Determinação da estabilidade da amostra pré e pós-processamento.....	64
Tabela 14. Determinação da estabilidade da solução mãe (1 mg.mL ⁻¹).....	66

Tabela 15. Determinação da estabilidade da solução estoque ($C= 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em ensaios de ciclo congelamento/ descongelamento, curta e longa duração.....	66
Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos principais fármacos pesquisados no Brasil	72
Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.....	76
Tabela 18. Principais mananciais de água doce em que foram detectados fármacos no estado de São Paulo.....	84
Tabela 19. Classificação da qualidade da água bruta destinada ao abastecimento público de acordo com os valores de IAP.....	98
Tabela 20. Índices de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAP's) monitorados pela CETESB (2011 – 2015) para os mananciais de interesse.....	99
Tabela 21. Concentração Média de Cafeína, Fluoxetina, Levotiroxina e Bezafibrato encontradas nos mananciais monitorados e frequência de amostras positivas do total de amostras analisadas.....	104
Tabela 22. Frequência de detecção mundial de CAF em diferentes matrizes.....	107
Tabela 23. Definições aplicadas ao termo ecotoxicologia.....	113
Tabela 24. Principais cianotoxinas, organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia da exposição aguda.....	120
Tabela 25. Parâmetros da fonte utilizados no espectrômetro de massa para o método de quantificação das MC's.....	131
Tabela 26. Íons qualificadores e quantificadores monitorados por MRM no método por LC-MS/MS.....	132
Tabela 27. Gradiente utilizado para a análise de MC-LR e RR por LC-MS/MS.	133
Tabela 28. Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.....	134
Tabela 29. Taxas de crescimento da <i>M. aeruginosa</i> frente às diferentes concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF, bem como do controle. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BHAT: Bacia Hidrográfica do Alto Tietê

BZF: bezafibrato

CAF: cafeína

CE₅₀: concentração efetiva que causa efeito a 50% dos organismos-teste

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CL₅₀: concentração letal a 50% dos organismos-teste

ESI: Ionização por *electrospray*

FLX-d6: Fluoxetina deuterada

FLX: fluoxetina

FM: Fase móvel

HPLC: Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

IAP: Índice de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IQA: Índice de Qualidade de Águas

ISTO: Índice de Substâncias Tóxicas e Organolépticas.

LC: Cromatografia Líquida

LC-MS/MS: Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem*

LC-MS: Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas

LD: Limite de detecção

LQ :Limite de quantificação

LTPNA: Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas.

LVX: levotiroxina

m/z : massa/carga

MC: microcistina

MeOH: metanol

MPOP's : micro poluentes orgânicos persistentes

MRM: Monitoramento de reações múltiplas
MS/MS: Espectrometria de massa em tandem
SIM: Monitoramento de Íon Seleccionado
MS: Espectrometria de massas
OMS: Organização Mundial de Saúde
PI: Padrão interno
PIC: Porcentagem de inibição do crescimento
Q1: primeiro quadruplo
Q2: segundo quadrupolo
(q): cela de colisão
QqQ: Triplo quadrupolo
QR : Quociente de risco
RMSP: Região metropolitana de São Paulo
SIGRH: Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos
SNC: Sistema Nervoso Central
SPE: Extração em Fase Sólida
 $t_{1/2}$: tempo de meia vida
T3: 3,5,3- triiodo-L-tironina
T4: Tiroxina
TIC: Cromatograma de Íons Totais
tr: tempo de retenção
UGRHs: Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.1.1. <i>Objetivos Específicos.....</i>	23
3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA.....	24
3.1. Introdução.....	24
3.1.1. <i>Spectrometria de massas e análises ambientais.....</i>	24
3.1.2. <i>Preparo e tratamento de amostras ambientais de água para análise por LC-MS/MS.....</i>	29
3.1.3. <i>Validação de métodos analíticos para a detecção e quantificação de fármacos em matrizes ambientais.....</i>	34
3.2. Objetivos do capítulo.....	36
3.3. Parte experimental.....	37
3.3.1. <i>Desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS.....</i>	37
3.3.2. <i>Validação do método analítico por LC-MS/MS.....</i>	43
3.4. Resultados e discussões.....	47
3.4.1. <i>Desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS.....</i>	47
3.4.2. <i>Validação do método analítico por LC/MS-MS.....</i>	59
3.5. Conclusões do Capítulo.....	68
4. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM MANANCIAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO.....	69
4.1. Panorama geral sobre a detecção de fármacos em mananciais no Brasil.....	69
4.2. Detecção de fármacos em águas superficiais do Estado de São Paulo...	82
4.3. Critérios para a definição de CAF, FLX, LVX e BZF como fármacos desse estudo.....	85
4.4. Principais mananciais no estado de São Paulo.....	94
4.4.1. <i>Principais mananciais que fornecem água para a Região Metropolitana de São Paulo.....</i>	95
4.4.2. <i>Qualidade das águas destinadas ao abastecimento público</i>	97
4.5. Objetivos do capítulo.....	100
4.6. Parte Experimental.....	101
4.6.1. <i>Local de estudo.....</i>	101
4.6.2. <i>Limpeza dos frascos.....</i>	101
4.6.3. <i>Coleta e acondicionamento das amostras.....</i>	101
4.6.4. <i>Preparo das amostras.....</i>	102
4.6.5. <i>Determinação de CAF, FLX, LVX e BZF por LC-MS/MS.....</i>	102
4.7. Resultados e Discussão.....	103
4.7.1. <i>Limpeza dos frascos.....</i>	103
4.7.2. <i>Determinação de CAF, FLX, LVX e BZF por LC-MS/MS.....</i>	103
4.8. Conclusões do capítulo.....	112
5. CAPÍTULO III: ESTUDO DA ECOTOXICIDADE CAUSADA POR CAFEÍNA, FLUOXETINA, LEVOTIROXINA E BEZAFIBRATO SOBRE	

A CIANOBACTÉRIA <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> (LTPNA 08)	113
5.5. Ecotoxicologia e a presença de fármacos no meio ambiente	113
5.5.1. <i>Por que avaliar os efeitos de fármacos sobre cianobactérias?.....</i>	<i>115</i>
5.5.2. <i>Microrganismo teste: cianobactéria <u>Microcystis aeruginosa</u>.....</i>	<i>118</i>
5.6. Objetivos do capítulo.....	124
5.7. Parte experimental	125
5.7.1. <i>Avaliação da ecotoxicidade da CAF, FLX, LVX e BZF sobre o crescimento, produção de microcistina e viabilidade celular da cianobactéria <u>Microcystis aeruginosa</u> (cepa LTPNA 08)</i>	<i>125</i>
5.7.1.1. Experimento com a cianobactéria <u>Microcystis aeruginosa</u> (cepa LTPNA 08)	128
5.8. Resultados e Discussões	136
5.8.1. <i>Avaliação da ecotoxicidade da CAF, FLX, LVX e BZF sobre o crescimento, produção de microcistinas e viabilidade celular da cianobactéria <u>Microcystis aeruginosa</u> (cepa LTPNA 08)</i>	<i>136</i>
5.9. Conclusões do capítulo.....	150
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	153
ANEXO.....	174

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese aborda temas como a determinação dos fármacos, cafeína (estimulante do Sistema Nervoso Central), fluoxetina (antidepressivo), levotiroxina (análogo do hormônio tireoidiano – T4) e bezafibrato (antilipidêmico), em amostras de água bruta oriundas de mananciais utilizados para abastecimento público no estado de São Paulo, bem como os efeitos ecotoxicológicos decorrentes da exposição aos fármacos estudados em relação ao crescimento e produção de microcistina pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08).

Esta pesquisa é composta por uma breve introdução sobre o tema, onde são expostos os problemas, a justificativa e as hipóteses do estudo. Em seguida são apresentados os objetivos, geral e específico, e na seqüência os capítulos. Cada capítulo está estruturado da seguinte maneira: revisão da literatura, objetivos do capítulo, metodologia, resultados e discussões, e conclusões.

Ao total são descritos três capítulos. O primeiro aborda o desenvolvimento, e validação do método proposto por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a determinação de fármacos em amostras ambientais de água, o segundo contempla a determinação de fármacos em manancias no estado de São Paulo e o último discorre acerca dos efeitos ecotoxicológicos dos fármacos estudados sobre a cianobactéria tóxica *Microcystis aureoginosa* LTPNA 08.

Por fim são apresentadas as conclusões da tese.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos a preocupação com a escassez e qualidade das águas destinadas ao abastecimento público tem aumentado e suscitado temas como contaminação ambiental por fármacos e a proliferação de cianobactérias tóxicas. A contaminação dos mananciais por medicamentos é um assunto que tem disso amplamente discutido desde a década de 90 e os avanços nessa temática são nítidos, pois cada vez mais os países tem se preocupado em verificar a presença de fármacos no meio ambiente, principalmente nos mananciais utilizados para o abastecimento

Aproximadamente 100.000 toneladas de fármacos são produzidas pela indústria farmacêutica anualmente e existem mais de 4.000 princípios ativos diferentes utilizados na medicina em todo o mundo (Weber *et al.*, 2014). A diversidade dos princípios ativos em termos farmacológicos e físico-químicos é um dos grandes desafios que envolvem a contaminação dos mananciais por medicamentos. Há diversas maneiras dos fármacos adentrarem no meio ambiente, por meio dos efluentes domésticos, hospitalares, industriais e da agropecuária, mas também pelo descarte indevido dos mesmos (BU *et al.*, 2016; SIDRACH-CARDONA *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2010).

As características que tornam um composto persistente são muitas, e envolvem principalmente suas características físico-químicas, entretanto, o comportamento dessas moléculas fora do organismo humano e a toxicidade que elas podem causar em longo prazo sobre humanos e outras espécies ainda são um enigma para muitas classes farmacológicas (ALVARINO *et al.*, 2018; DING *et al.*, 2017; BITTENCOURT *et al.*, 2015; ZENKER *et al.*, 2014; HYLAND *et al.*, 2012)

Tendo em vista a incerteza sobre a toxicidade crônica de muitas dessas substâncias sobre o ser humano, alguns órgãos internacionais como a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO) tem disponibilizado guias sobre o manejo de efluentes contendo fármacos, principalmente efluentes hospitalares e industriais (WHO, 2011 a; WHO, 2011 b). Entretanto, ainda não existem leis que exijam o monitoramento de fármacos em mananciais destinados ao abastecimento público, o que há são diretrizes que sugerem o monitoramento de alguns desses compostos, como os desreguladores endócrinos e antibióticos. Na União Européia é obrigatória a avaliação do risco ambiental para os novos fármacos comercializados (EC 2001 a; EC

2001 b), porém para os fármacos comercializados antes dessa lei essa norma não se aplica (WEBER, *et al.*, 2014).

Inúmeras classes de compostos vêm sendo categorizadas como desreguladores endócrinos. Os hormônios naturais e sintéticos são os compostos mais conhecidos dessa classe de contaminantes (GLASSMEYER *et al.*, 2016; CAMPANHA *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2015;), entretanto substâncias que interfiram na regulação de funções sexuais (VELASCO-SANTAMARÍA *et al.*, 2011; FONG *et al.*, 1998), na síntese de colesterol (VELASCO-SANTAMARÍA *et al.*, 2011) e em outras glândulas, como a tireóide, também podem ser denominados de desreguladores endócrinos (WEGNER & BROW & DIX, 2016). Por isso, seria interessante que medicamentos como fluoxetina (antidepressivo), bezafibrato (anti-lipidêmico) e levotiroxina (análogo do hormônio tireoidiano T4) fossem monitorados nos mananciais, assim como a cafeína.

A cafeína não se trata de um desregulador endócrino e nem tão pouco possui características físico-químicas que confirmam a ela capacidade de bioacumulação. Contudo, esse composto pode ser utilizado como um marcador de atividade antropogênica, pois é continuamente introduzido no meio ambiente e amplamente consumido em todo mundo na forma de bebidas, ou incorporada a preparações medicamentosas, por exemplo (PAÍGA & DELERUE-MATOS, 2017; CANTWELL *et al.*, 2016; NODLER *et al.*, 2016; MONTAGNER *et al.*, 2014 b; KURISSERY *et al.*, 2012; HILLEBRAND *et al.*, 2012). Atualmente a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) monitora a presença de cafeína em alguns mananciais do estado (CETESB, 2016).

Embora os riscos associados aos efeitos agudos causados por essas substâncias em humanos sejam baixos (WHO, 2011a), pouco se sabe dos efeitos em exposição crônica e, das implicações decorrentes da ação dessas substâncias sobre outros seres vivos. Muitos modelos ecotoxicológicos têm sido aplicados para a avaliação da toxicidade desses compostos (FATTA-KASSINOS *et al.* 2011). Entretanto, embora esses modelos sejam confiáveis existem organismos não-alvo que necessitam ser estudados, como as cianobactérias.

As cianobactérias são microrganismos procariontes e fotoautótrofos (PERCIVAL & WILLIAMS, 2014), e algumas espécies como a *Microcystis aeruginosa* produzem substâncias tóxicas chamadas de cianotoxinas. Os mecanismos que levam esses microrganismos a produzir essas substâncias ainda não são totalmente elucidados, entretanto sabe-se que fatores ambientais como luz, pH do meio e quantidade de

nutrientes são fatores relevantes (RASTOGI & SINHA & INCHAROENSAKDI, 2014). Alguns autores têm relacionado às mudanças climáticas ao aumento da incidência de florações tóxicas desses microrganismos. A *Microcystis aeruginosa* é a cianobactéria mais relatada em episódios de florações tóxicas (CARMICHAEL & BOYER, 2016). Portanto, a compreensão dos efeitos dos fármacos sobre o crescimento de cianobactérias e produção de cianotoxinas se fazem necessários, pois esses microrganismos são continuamente expostos a essas substâncias em mananciais eutrofizados.

Tendo em vista a problemática que envolve esse tema e a importância de se verificar o quão impactados estão os mananciais do estado de São Paulo por esses compostos, assim como de verificar quais são os efeitos dessas substâncias sobre as cianobactérias. Duas hipóteses foram geradas:

1ª) Os reservatórios Guarapiranga e Billings, rios Sorocaba, Cotia, Grande, Paraíba e Taiçupeba estão contaminados com cafeína, fluoxetina, levotiroxina e bezafibrato.

2ª) A cafeína, fluoxetina, levotiroxina e bezafibrato causam efeitos ecotoxicológicos sobre o crescimento e produção de microcistina pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08).

A partir das hipóteses os objetivos foram traçados e o estudo realizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a presença de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) em mananciais do estado de São Paulo bem como avaliar a ecotoxicidade sobre a cianobactéria toxigênica *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08).

2.1.1. Objetivos Específicos

- i. Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a detecção e quantificação de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras ambientais de água.
- ii. Determinar a presença de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) em mananciais do estado de São Paulo.
- iii. Comparar as concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF quantificadas com dados descritos na literatura.
- iv. Determinar o crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08) exposta a diferentes concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF por espectrofotometria.
- v. Quantificar a produção de microcistinas totais por LC-MS/MS pelo microrganismo teste em relação à exposição aos fármacos pesquisados.
- vi. Verificar o efeito dos fármacos sobre a viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo.

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA

3.1. Introdução

Com o desenvolvimento das fontes de ionização a pressão atmosférica a partir do final da década de 80, o acoplamento da Cromatografia Líquida (LC) à Espectrometria de Massas (MS) aumentou consideravelmente a capacidade analítica dos laboratórios. (SCHULTZ & HENION, 2017). Técnicas hífenadas como LC-MS permitiram ganhos significativos no limite de detecção, pois possibilitaram a detecção de compostos em concentrações muito baixas ($\mu\text{g.L}^{-1}$; ng.L^{-1} e pg.L^{-1}). Entretanto, a análise simultânea de moléculas com propriedades físico-químicas diferentes requer uma atenção especial para parâmetros relacionados à pré-concentração da amostra (escolha do cartucho de extração em fase sólida, solvente extrator e pH), separação cromatográfica (coluna, gradiente de fase móvel) e detecção pelo espectrômetro de massas (interface e parâmetros operacionais) (PETROVIC, 2014).

3.1.1. *Espectrometria de massas e análises ambientais*

A detecção ambiental de micro poluentes orgânicos persistentes (MPOP's) é uma das áreas de aplicação da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Entre os MPOP's estão substâncias de origem natural (toxinas, hormônios, etc) e sintética (fármacos, nanomateriais, filtros UV, plastificantes, retardantes de chama, drogas ilícitas, etc.) (WEBER, 2014). Esta técnica apresenta algumas vantagens em relação a Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), pois permite a detecção de substâncias pouco ou não voláteis e com diferentes polaridades.

- **Princípio do método**

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica que gera resultados tridimensionais, pois inicialmente os analitos são separados no

cromatógrafo em função do tempo de retenção, em seguida os íons gerados pela fonte de ionização são separados em relação a sua massa/carga (m/z) no analisador de massas e na sequência a abundância dos íons é monitorada pelo detector do espectrômetro (KRUBE *et al.*, 2015 a).

O acoplamento da cromatografia líquida ao espectrômetro de massas proporcionou avanços nas abordagens atuais em química analítica, pois associou a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia com a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade da espectrometria de massas. Entretanto, o acoplamento do LC ao MS não foi algo simples de se realizar, pois havia a incompatibilidade entre a vazão de fase móvel (FM) do sistema cromatográfico e a velocidade de bombeamento do sistema a vácuo do espectrômetro de massas. Além desse problema, existia ainda a dificuldade de ionizar substâncias pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura. Tais problemas foram solucionados empregando-se uma interface para remover total, ou parcialmente a FM. Além da remoção da FM móvel as interfaces foram desenvolvidas com o intuito de melhorar a ionização do analito. Por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização (CHIARADIA & COLLINS & JARDIM, 2008).

- **Fontes de ionização (“Ionização por Electrospray”)**

Há mais de uma década o emprego da cromatografia de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas faz parte das rotinas laboratoriais. Isso ocorreu porque o método de Ionização à Pressão Atmosférica do inglês “*Atmospheric Pressure Ionization*” (API) permitiu a associação entre essas duas técnicas. Nesse tipo de ionização os íons são gerados a partir de átomos ou moléculas à pressão atmosférica. Entre as fontes de ionização mais empregadas estão a ionização por *electrospray* e ionização química à pressão atmosférica, cujas abreviaturas derivam do inglês *Electrospray Ionization* (ESI) e *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), respectivamente. O *electrospray* é a interface mais eficiente para injetar íons em analisadores de massas com pouca ou nenhuma fragmentação de íons (KRUBE *et al.*, 2015 b; FORCISI *et al.*, 2013; WILM, 2011; VESSECCHI *et al.*, 2011).

Moléculas de baixo e de alto peso molecular, bem como de elevada polaridade e complexidade estrutural são ionizadas por *electrospray*. Nesta técnica as espécies ionizadas são formadas pela aplicação de uma diferença de potencial entre um capilar e

um contraeletrodo, sob pressão atmosférica, formando assim pequenas gotas carregadas (VESSECCHI *et al.*, 2011). Uma das vantagens do *electrospray* é a dessolvatação gradual das gotículas formadas (a aproximadamente 80°C), permitindo que os íons se mantenham com a mesma estrutura e carga das espécies em solução (MORAES & LAGO, 2003).

Três tipos de íons podem ser formados por meio da ionização por *electrospray*: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas. A quantidade formada de cada íon depende de três reações que ocorrem dentro do capilar. Os íons gerados pelas reações de oxidação/redução são íons moleculares (M^{+}) ou (M^{-}), já aqueles formados pelas reações ácido/base estão na forma protonada $[M+H]^{+}$ ou desprotonada $[M-H]^{-}$ e aqueles oriundos das reações de coordenação com cátions (pertencentes à família 1A) ou ânions (ex., cloretos) estão na forma de moléculas cationizadas ($[M+Na]^{+}$, $[M+K]^{+}$) ou anionizadas ($[M+Cl]^{-}$, etc) (CROTTI *et al.*, 2006).

Inúmeros estudos que investigaram a presença de fármacos no meio ambiente utilizaram a ionização por *electrospray* como fonte de ionização dos compostos analisados. Mokh *et al.* (2017) detectaram 63 fármacos (dentre eles antibióticos e cafeína) por LC-ESI-MS/MS em amostras de água natural no Líbano. Carmona & Andreub & Picó (2017) também utilizaram a fonte de ionização por *electrospray* para a detecção de 42 compostos orgânicos em diferentes matrizes ambientais, como esgoto, solo e águas superficiais, estas coletadas ao longo do rio Turia, no centro leste na Espanha. Tlili *et al.* (2016) avaliaram a presença de 22 compostos farmacêuticos, entre eles antilipidêmicos, em amostra de água de rios do norte da França. No Brasil, Pereira *et al.* (2016) determinaram 7 fármacos em amostras de água salgada oriundas da baía de Santos (São Paulo) empregando a técnica por LC-ESI-MS/MS, assim como Caldas *et al.* (2016) que aplicaram esta mesma técnica para a quantificação de 58 compostos (alguns destes fármacos) em amostras de esgoto coletadas no Rio Grande do Sul.

A análise de fibratos e estatinas (antilipidêmicos) costuma ser realizada por LC-ESI-MS/MS, isto porque esta fonte de ionização aumenta a sensibilidade de detecção desses compostos em torno de 10 vezes se comparada à ionização química à pressão atmosférica (PETROVIC *et al.*, 2005). Embora o ESI seja a interface mais comum para a detecção de fármacos no meio ambiente sua eficiência pode ser influenciada por interferentes que são co-extraídos das amostras resultando numa supressão ou aumento da ionização (WILLE *et al.*, 2012).

- **Analisadores de massas**

Após a ionização da amostra, a mesma é separada de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e então detectada. O setor de análise do espectrômetro de massas está associado à exatidão, precisão e sensibilidade do equipamento. Entre os principais analisadores de massas estão:

- ✓ Analisador de tempo de voo (“*Time-of-Flight Analyser*” - TOF)

O princípio teórico deste analisador consiste na separação dos íons após aceleração por um campo elétrico de acordo com suas velocidades. Isto porque os íons possuem igual energia cinética e deste modo suas velocidades seriam distintas apenas pela sua massa (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

- ✓ Analisador *Iontrap*

O *iontrap*, como o próprio nome diz, é uma armadilha de íons tridimensional. O *iontrap* de Paul é um aparato que aprisiona os íons ao serem introduzidos em seu interior até que uma radiofrequência entre um eletrodo anelar e dois eletrodos terminais seja empregada. A escolha destas tensões determina a m/z abaixo da qual os íons não são aprisionados (CHIARADIA & COLLINS & JARDIM, 2008).

- ✓ Quadrupolo

O analisador de massas quadrupolo é formado por quatro hastes, dispostas em pares. A um par é aplicado um potencial elétrico positivo e a outro um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras que em voltagem específica faz com que íons de uma determinada razão m/z atravessem o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável (LANÇAS, 2013).

- ✓ Triplo quadrupolo

O analisador de massas triplo quadrupolo comercial foi desenvolvido por Yost & Enke no final de década de 70 (YOST & ENKE, 1979), desde então tem sido amplamente empregado na quantificação de fármacos em matrizes ambientais. Isso graças a sua elevada sensibilidade se comparado a outros analisadores de massas (ACENÑ *et al.*, 2015; GRABIC *et al.*, 2012; STOLKER *et al.*, 2003).

O triplo quadrupolo contém três quadrupolos em série, porém o segundo quadrupolo é uma cela de colisão (na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados), enquanto

que o primeiro e terceiro são utilizados para separar os íons de mesma razão m/z (CHIARADIA & COLLINS & JARDIM, 2008).

Segundo Yost & Fetterolf (1983) o princípio do triplo quadruplo consiste na passagem dos íons da fonte de ionização para o primeiro quadruplo (Q1). No Q1 ocorre a seleção do íon em função da m/z e em seguida ele é enviado para cela de colisão. Na cela de colisão (q) ocorre a fragmentação dos íons selecionados no Q1. Isto ocorre por meio da dissociação induzida por colisão com um gás inerte, do inglês “*Collision-induced Dissociation – CID*”. Essa dissociação ocorre porque um gás de colisão (N_2 ou Ar) é adicionado a uma pressão de 1-10 mTorr. O segundo quadrupolo permite a análise dos íons produto gerados no Q2 (CHIARADIA & COLLINS & JARDIM, 2008; FETTEROLF & YOST, 1983).

Desde a década de 90, quando o triplo quadrupolo passou a ser amplamente comercializado como analisador de massas do LC-MS, e com a possibilidade de se realizar o monitoramento de reações múltiplas (MRM), esta passou a ser a primeira escolha para análise quantitativa de matrizes complexas, como as ambientais (ACENÑ *et al.*, 2015). Boix *et al.* (2015) desenvolveram um método para a detecção/quantificação de bezafibrato e outros 39 MPOP's por UPLC-MS/MS utilizando um QqQ como analisador de massas e os limites de detecção para os compostos analisados foram baixos e da ordem de $ng.L^{-1}$.

Chen *et al.* (2016) também determinaram simultaneamente 20 MPOP's (entre eles hormônios) em amostras ambientais. Nesta pesquisa os autores quantificaram os compostos por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas utilizando um triplo quadrupolo (LC-QqQ-MS) e por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução cujo analisador de massas era um quadruplo híbrido, do tipo orbitrap (Q-Orbitrap-HRMS). Segundo os resultados obtidos ambos os equipamentos geraram boa linearidade, precisão intra e inter-dia e limite de detecção, entretanto a pesquisa revelou que o sistema LC-QqQ-MS foi relativamente mais adequado para a análise de lotes com grande número de amostras ambientais (CHEN, *et al.*, 2016).

No Brasil, Campanha *et al.* (2015) e Torres *et al.* (2015) analisaram fármacos em amostras ambientais de água oriundas do estado de São Paulo. Para isso eles utilizaram um LC-MS com analisador de massas QqQ e entre os fármacos analisados estava a cafeína. Silveira *et al.* (2013) quantificaram fármacos e resíduos de produto de higiene pessoal em amostras de água superficial e potável no estado do Rio Grande do Sul por

LC-ESI-MS/MS, e para isso também utilizaram um triplo quadrupolo como analisador de massas.

✓ Modos de operação do analisador triplo quadrupolo

Com o passar dos anos o aperfeiçoamento da técnica de espectrometria de massas possibilitou o emprego de diferentes modos de operação de detecção como, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS). Na detecção em tandem os íons precursores gerados da amostra analisada são selecionados a partir do espectro, normalmente fragmentados e então os íons produtos são detectados. Desta forma, diferentes modos de operação podem ser empregados (KRUIVE *et al.*, 2015 a).

Entre os diferentes modos de operação do analisador de massas triplo quadrupolo estão: Íon Precursor (*Precursor Ion*), Íon Produto (*Product Ion*), Monitoramento de Íon Selecionado (*Selected Ion Monitoring – SIM*) e Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring - MRM*). O SIM consiste na aquisição de íons de m/z específica. Enquanto que o MRM é realizado para uma variedade de íons produtos oriundos de um ou mais íons precursores.

O MRM é o modo de uso mais comum do triplo quadrupolo para análises quantitativas, em razão da sua alta sensibilidade e seletividade. O triplo quadrupolo possibilita à detecção de várias transições e conseqüentemente a quantificação de múltiplos analitos ao mesmo tempo. As transições são essenciais para se realizar a quantificação e identificação de um composto. Por isso, o íon produto mais abundante é chamado de "quantificador" enquanto que os demais íons produtos são chamados de "qualificadores" (SCHREIBER, 2010).

3.1.2. Preparo e tratamento de amostras ambientais de água para análise por LC-MS/MS

O preparo de amostras é um pré-requisito em muitas análises sendo considerado o passo mais desafiador do procedimento analítico, pois é por meio dele que os interferentes são retirados ou minimizados (FILIPPOU & BITAS & SAMANIDOU, 2017; KUMAR *et al.*, 2015). Entre as principais etapas do preparo de amostras estão: filtração, ajuste do pH, extração, limpeza e pré-concentração. Existem diferentes técnicas de extração/pré-concentração de amostras, como: extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction – SPE*), micro extração em fase sólida, extração líquido-

líquido, extração em fase líquida, extração em líquido pressurizado, etc (DIMPE & NOMNGONGO, 2016).

- **Extração em Fase sólida**

A técnica de extração/concentração aplicada para o preparo de amostras depende, entre outras coisas, do método analítico utilizado. Por exemplo, amostras analisadas por LC-MS/MS não necessitam de preparos tão elaborados quanto aquelas avaliadas por HPLC. Isso porque a técnica de LC-MS/MS possibilita a extração da massa do composto diretamente do cromatograma gerado pela análise e isso é possível mesmo quando ocorre coeluição com interferentes. Embora isso seja uma vantagem da técnica, não se deve subestimar a importância desta etapa para a detecção e quantificação de fármacos por espectrometria de massas, pois a presença de interferentes pode comprometer a sensibilidade do método (SISMOTTO & PASCHOAL & REYES, 2013).

Entre as técnicas de extração mais empregadas então a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Na Tabela 1 estão apresentados os princípios e características dessas duas técnicas.

Tabela 1. Comparação entre extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Técnica	Princípios da técnica	Características da técnica		Referências
		Vantagens	Desvantagens	
Extração líquido-líquido	Distribuição do analito entre dois líquidos imiscíveis em função de um coeficiente de partição.	Boa reprodutibilidade, fácil manuseio, compostos pouco voláteis.	Emprego de solventes puros e elevada produção de resíduos.	HASHEMI <i>et al.</i> , 2017; DIMPE & NOMNGONGO, 2016.
Extração em fase sólida	Adsorção seletiva do analito em sorventes e posterior eluição com solventes.	Flexibilidade, alta seletividade, grande variedade de sorventes, boas recuperações, baixo consumo de solventes, etc.	Custo dos cartuchos, difícil realização manual (requer muitas etapas).	HASHEMI <i>et al.</i> , 2017; DIMPE & NOMNGONGO, 2016.

Há quatro etapas envolvidas na extração em fase sólida. A primeira delas é o condicionamento do sorvente com o solvente, seguido da aplicação da amostra, a

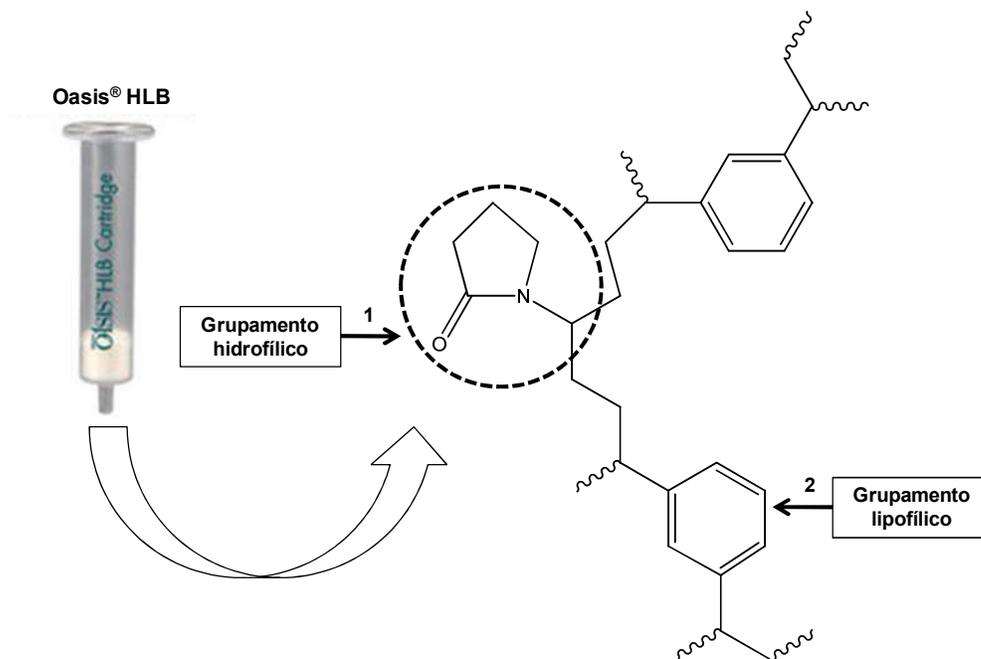
terceira etapa envolve a limpeza da coluna, porém essa etapa pode ser suprimida dependendo dos compostos e solventes envolvidos. A última etapa é a eluição do analito.

A extração em fase sólida é amplamente empregada no preparo de amostras ambientais. Essa técnica foi desenvolvida no início da década de 80 e desde então se tornou a técnica mais importante para isolamento e purificação de analitos específicos. Uma das vantagens da SPE é a extensa variedade de sorventes. Para a extração de fármacos de matrizes ambientais, como a água, é importante o emprego de sorventes que apresentem boa eficiência de extração e recuperação, entre os sorventes mais utilizados está a Oasis[®] HLB (DIMPE & NOMNGONGO, 2016).

Segundo o próprio fabricante (Waters[®]), a Oasis[®] HLB é um sorvente universal, pois é capaz de reter compostos ácidos, neutros e básicos. O sorvente é composto por um copolímero de *N*-vinilpirrolidona (hidrofílica) e divinilbenzeno (lipofílico). Este sorvente possui vantagens como: ser estável em uma ampla faixa de pH e diferentes solventes, capacidade de retenção de compostos polares e relativa retenção de compostos apolares, ou seja capacidade de retenção hidrofóbica três vezes superior ao dos sorventes tradicionais de SPE como a C18 (GUMBI *et al.*, 2017; WATERS[®], 2014).

Além das vantagens mencionadas acima o sorvente da Oasis[®] HLB tem maior capacidade de retenção [k], isso significa que mais analitos são retidos no cartucho melhorando a recuperação e reprodutibilidade do procedimento de extração. A Oasis[®] HLB é comercializada no formato de cartucho, placa ou coluna, e há cinco diferentes tamanhos de partículas de revestimento da coluna (60 µm, 30 µm, 25 µm, 15 µm e 5 µm). Na Figura 1 pode-se observar a apresentação comercial do cartucho Oasis[®] HLB em coluna, bem como a estrutura química do sorvente (WATERS[®], 2014).

Figura 1. Apresentação comercial do cartucho Oasis[®] HLB em coluna e estrutura química do sorvente.



Legenda: 1= Retenção de compostos polares; 2= retenção de compostos apolares.
Fonte: Adaptado WATERS[®], 2014.

Tendo em vista sua grande versatilidade, a Oasis[®] HLB tem sido amplamente aplicada para a extração de fármacos de inúmeras matrizes ambientais (OMAR *et al.*, 2017). Na Tabela 2 foram compiladas algumas pesquisas que utilizaram a Oasis[®] HLB como sorvente para a análise de fármacos em águas superficiais.

Tabela 2. Aplicações da Oasis® HLB para a extração de fármacos de amostras ambientais.

Compostos	Cartucho SPE	Amostra	Local	Referências
Nicotina, metamizol, paraxantina, cafeína, fluoxetina, ácido clofibrico e Atenolol.	Oasis HLB, Lichrolut EN, Bond Elut SCX e C18	Esgoto	Espanha	AFONSO-OLIVARES & SOSA-FERRERA & SANTANA-RODRÍGUEZ, 2012.
Fluoxetina, Doxepina, fluvoxamina, desipramina, imipramina, trimipramina, amitriptilina, nortriptilina, Citalopram, paroxetina, sertralina, venlafaxina, entre outros	Oasis HLB (3mL, 400 mg)	Água superficial e água potável	Polônia	GIEBUŁTOWICZ & NAŁĘCZ-JAWECKI, 2014.
Aciclovir, carbamazepina, fluconazol, fluoxetina, metronidazol e ranitidina	Oasis® HLB (6 mL, 500 mg, Waters)	Esgoto	China	YU & LI & ZHANG, 2012.
Atrazina, octilfenol, nonilfenol e bisfenol-A, triclosan, 17 α -etinilestradiol e cafeína	Oasis HLB (6 mL, 500 mg, Waters)	Água potável	Brasil	MACHADO <i>et al.</i> , 2016.
Cafeína, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, carbamazepina, atenolol, propranolol, triclosan, estrona, 17- β -estradiol e 17- α -etinilestradiol	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	Água superficial	Brasil	CAMPANHA <i>et al.</i> , 2015.
Mais de 80 fármacos, entre eles bazafibrato e fluoxetina	Oasis HLB (60 mg, 3 mL)	Água superficial e tratada	Espanha	GROS & RODRÍGUEZ-MOZAZ & BARCELÓ, 2012.
37 MPOP's incluindo bazafibrato e fluoxetina	MCX, MAX e Oasis® HLB	Esgoto	Portugal	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2015
35 fármacos de diferentes classes como: bazafibrato, fluoxetina, genfibrozil, propanolol, atenolol, etc.	Oasis HLB	Esgoto e água superficial	México	RIVERA-JAIMES <i>et al.</i> , 2018
Fármacos entre eles fluoxetina e bezafibrato	Oasis HLB (200 mg)	Água superficial e esgoto	Suécia	GRABIC <i>et al.</i> , 2012
Hormônios tiroidianos (T4, T3, r-T3, 3,5-T2 e 3,3 -T2)	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	Esgoto bruto e tratado	Finlândia	SVANFELT & ERIKSSON & KRONBERG, 2010

3.1.3. Validação de métodos analíticos para a detecção e quantificação de fármacos em matrizes ambientais

A validação de um método deve ser realizada para demonstrar que o mesmo fornece resultados confiáveis e adequados à sua aplicação. Já a validação analítica é uma avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais, com o intuito de verificar se os requisitos pretendidos foram atendidos (BRASIL, 2017).

Existem inúmeros guias e/ou normas de validação que são referência na Europa, Estados Unidos, Japão, Austrália, Brasil e etc. Embora os guias sejam diferentes, existe um consenso sobre quais parâmetros de validação devem ser validados. Entretanto, há uma imensidão de detalhes sobre a metodologia de validação e critérios de aceitação que não são uniformes, o que dificulta a padronização universal da validação (KRUBE *et al.*, 2015 a)

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por estabelecer as diretrizes para a validação de métodos analíticos por meio de resoluções específicas. A resolução mais atual do país sobre esse tema é a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Além desta, existe a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e que também dispõe sobre os parâmetros de validação. No Brasil está em vigor, ainda, a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, que estabelece os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Embora esta última resolução seja específica para medicamentos, não há no país um guia para a validação de metodologias para análise de fármacos em amostras ambientais (BRASIL, 2017; BRASIL, 2011; BRASIL, 2003).

De modo geral, os estudos que propõem a validação de métodos para a detecção ambiental de fármacos incluem os seguintes parâmetros de validação: limite de quantificação e detecção, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, precisão intra e inter-dias, recuperação e efeito matriz (AFONSO-OLIVARES *et al.*, 2017; GUMBI *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2015). Entretanto, existem autores que não validam todos esses parâmetros. Lardy-Fontan *et al.* (2017) validaram um método analítico para a detecção de fármacos em amostras de água comercializadas com base na recuperação, limite de quantificação, linearidade, exatidão e medidas de incerteza. Os autores utilizaram o guia de validação da “*Association Française de Normalisation – AFNOR*”, que é a Associação Francesa de Padronização, pois o estudo foi realizado na França.

A ANVISA, por meio de sua RDC N° 166 e RE n° 899, estabelece os parâmetros a serem validados durante a validação de um método analítico. Entre os parâmetros de validação estabelecidos estão:

- Limite de detecção (LD): é a menor quantidade do composto de interesse presente na amostra que é detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições estabelecidas. O LD pode ser estabelecido por ensaio prático ou por cálculos teóricos. Se o procedimento escolhido por o ensaio prático o mesmo é determinado como base na análise da razão sinal-ruído. Sendo estabelecido como LD a concentração para a qual é possível constatar o menor efeito visual observado (BRASIL, 2017).
- Limite de quantificação (LQ): é estabelecido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL 2017).
- Linearidade: esse parâmetro pode ser obtido com base na capacidade do método em adquirir respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um composto em uma amostra (BRASIL, 2017).
- Precisão: a precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. (BRASIL, 2017).
- Exatidão: determina o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).
- Estabilidade: Os ensaios de estabilidade devem ser os mais semelhantes possíveis com aquelas condições de manuseio e análise das amostras reais. É de suma importância que os estudos de estabilidade incluam a determinação da estabilidade da amostra e dos analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas (BRASIL, 2003).

3.2. Objetivos do capítulo

O objetivo geral deste capítulo foi desenvolver e validar um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a detecção e quantificação de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras ambientais de água. Para isso foi necessário:

- Determinar o modo de operação do detector
- Escolher os componentes da FM (solvente orgânico, pH e aditivos).
- Determinar os íons qualificadores e quantificadores
- Definir as condições de extração dos compostos (solvente extrator e pH)
- Validar o método proposto segundo a RDC nº 166 da ANVISA.

3.3. Parte experimental

3.3.1. Desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS

O desenvolvimento da metodologia analítica por LC-MS/MS para a quantificação de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) foi realizado utilizando-se um cromatógrafo líquido (*Agilent Series 1290, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*) composto por: degaseificador a vácuo, amostrador automático e uma bomba binária, acoplado a espectrômetro de massas (modelo 6460 *Agilent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA*), com analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Figura 2).

Figura 2. Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas.



Legenda: 1= módulo onde fica localizada a coluna e forno; 2= auto-amostrador; 3= bomba e 4= espectrômetro de massas.

Os testes foram conduzidos levando-se em consideração os parâmetros: modo de ionização por ESI (positivo ou negativo), composição, pH e aditivos de fase móvel. Esses parâmetros foram determinados após injeção das soluções contendo os compostos de interesse no espectrômetro de massas.

- **Preparo das soluções de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF)**

- ✓ Preparo solução Mãe

As soluções contendo os compostos de interesse foram preparadas a partir de padrões analíticos de LVX e BZF, adquiridos da *Council of Europe (European Pharmacopeia Standard)*, CAF e PI (FLX-d6) comprados da *Sigma-Aldrich*[®]. Para o preparo da solução mãe de FLX foi utilizado um padrão secundário doado pelo Laboratório de Análises Toxicológicas – LAT.

O preparo da solução mãe de CAF, FLX, LVX e BZF foi realizado pesando-se 1 mg de cada composto em balança analítica (Sartorius Weighing technology GmbH, Goettingen/Alemanha – Cubis[®]; Weighing Modules Ultra-Micro Balances, 0.0001 g). Na sequência os padrões foram transferidos para 4 *vials* âmbar de 1,8 mL e 1 mL de MeOH:H₂O (70:30; v/v) foi adicionado a fim de que a concentração de 1 mg.mL⁻¹ fosse atingida. A solução mãe do padrão interno (PI) foi adquirida na concentração de 1 mg.mL⁻¹ da *Sigma-Aldrich*[®]. Estas soluções foram armazenadas a -20° C em *freezer* por até 3 meses, exceto pela solução de LVX e PI. As soluções de LVX foram preparadas no dia do uso.

- ✓ Preparo das soluções de trabalho

Todas as soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução mãe, diluindo-se a mesma em MeOH:H₂O (70:30; v/v) até que as concentrações de 10 µg.mL⁻¹, 1 µg.mL⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ fossem atingidas.

- ✓ Preparo Fase Móvel

A fase móvel (FM) foi preparada com metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN), grau ultrapuro (J.T. Baker[®]), em mistura com água ultrapura (MilliQ[®]). Os aditivos acetato e formiato de amônio (*Fluka*[®]) na concentração de 2 mM e 0,1% de ácido fórmico (*Sigma Aldrich*[®]) também foram averiguados, bem como o ajuste de pH da FM (6 e 7).

- ✓ Determinação do modo de ionização por *electrospray* (ESI)

O modo de ionização, positivo e/ou negativo, foi determinado com base na composição de fase móvel (FM), sendo averiguadas duas composições de FM: MeOH: H₂O (70:30; v/v) e ACN: H₂O (70:30; v/v). Para isso, 1 µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 10 µg.mL⁻¹ foi injetado separadamente no espectrômetro de massas operado em modo SIM (monitoramento de íon selecionado), e a intensidade dos íons monitorada segundo a razão massa-carga (*m/z*), tanto em modo positivo quanto negativo de ionização. Os valores das massas de cada composto e das respectivas formas protonadas [M+H]⁺ estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores das massas de cada composto e suas formas protonadas [M + H]⁺ e não-protonadas [M – H]⁻.

Nome do composto	Massa (g)	M+H ⁺	[M – H] ⁻
Cafeína	194,2	195,2	193,2
Fluoxetina	309,3	310,3	308,3
Levotiroxina	776,9	777,9	775,9
Bezafibrato	361,8	362,8	360,8
PI (Fluoxetina-d6)	315,3	316,3	314,3

- ✓ Escolha do componente orgânico, aditivos e pH de fase móvel

Após a escolha do modo de ionização por *electrospray* o componente orgânico da fase móvel (metanol e acetonitrila), pH e aditivos foram avaliados. Para isso 2 pHs foram testados (6 e 7) e três aditivos de FM foram verificados (formiato e acetato de amônio na concentração de 2 mM e ácido fórmico a 0,1%). Uma vez determinada a composição de FM foram definidas as condições cromatográficas.

- ✓ Definição das condições cromatográficas

Após os aditivos de FM e pH serem determinados, buscou-se a padronização das condições cromatográficas. Com base nas características físico-químicas dos compostos de interesse e em informações da literatura foi utilizada uma fase estacionária de fase reversa, Luna C18 (2) (150 x 3.0 mm; 3 µm) e pré-coluna C18 (4.0 x 3.0 mm), ambas da Phenomenex[®]. Duas vazões de fase móvel (0,2 mL.min⁻¹ e 0,3 mL.min⁻¹), quatro volumes de injeção (1 µL, 5 µL, 10 µL e 15 µL) e 5 gradientes de eluição foram avaliados. Para isso, uma solução de 10 µg.L⁻¹ contendo todos os analitos de interesse foi injetada no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas.

- **Definição dos parâmetros do espectrômetro de massas.**

Uma vez determinada a composição de fase móvel, modo de ionização e condições cromatográficas, deu-se início a análise dos compostos pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM). No MRM o sinal do íon precursor e íons produto são medidos e utilizados para a qualificação e quantificação dos analitos (MURRAY *et al.*, 2013). Os íons produtos são monitorados e aquele com maior abundância é considerado o íon quantificador e os demais íons como qualificadores. A definição dos íons quantificadores e qualificadores, bem como as energias de colisão foram estabelecidos pelo *software MassHunter Optimizer (MassHunter Optimizer Triple Quad B.04.01-Agilent Technologies)*. Para isso, 1 µL de solução dos padrões na concentração de 10 µg.mL⁻¹ foi inserido no espectrômetro de massas por injeção em fluxo (sem coluna). Os parâmetros da fonte do espectrômetro de massas utilizados seguem o descrito por Ferrer *et al.* (2010) e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros da fonte utilizados no espectrômetro de massas.

Parâmetros da fonte	Valor/unidades
Capilar	4000 V
Gás nebulizador	35 psi
Gás secante	Vazão 8 L.min ⁻¹ ; Temperatura 250° C
Gás de bainha	Vazão 10 L.min ⁻¹ ; Temperatura 250° C
Nozzle	0 V

Fonte: FERRER *et al.*, 2010.

Na sequência uma análise em modo *scan* foi realizada para que fossem verificadas as intensidades dos íons precursores monitorados, assim como a formação de adutos de sódio [M+Na]⁺ ou amônio [M+NH₄]⁺ durante o processo de ionização. O valor de *scan time* utilizado foi de 200 ms, a vazão de fase móvel igual a 0,2 mL.min⁻¹ e 1 µL de solução de CAF, FLX, LVX, BZF e PI (FLX-d6) na concentração de 10 µg.mL⁻¹ foi injetado no espectrômetro de massas, individualmente.

- **Otimização da extração em fase sólida**

A etapa de extração e concentração dos analitos de interesse de amostras ambientais é fundamental para a quantificação de fármacos nesse tipo de matriz (DIMPE & NOMNGONGO, 2016). Por isso, a SPE foi utilizada para a extração e concentração de CAF, FLX, LVX, BZF e PI da amostra. A extração em fase sólida foi realizada

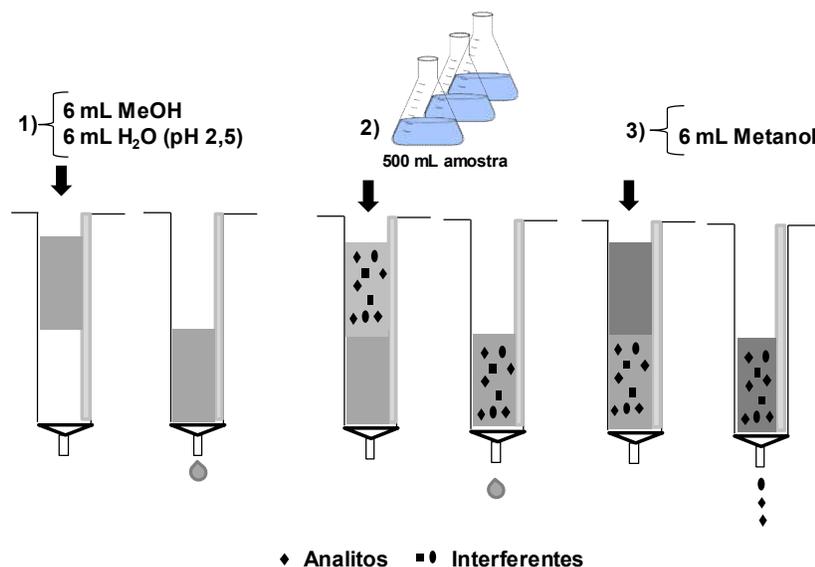
utilizando-se um cartucho Oasis[®] HBL 6 mL (500 mg) da Waters[®]. E conforme visto no item 3.1.3 esse sorvente é amplamente empregado na extração e concentração de fármacos de matrizes ambientais (GIEBULTOWICZ & NAŁĘCZ-JAWECKI, 2014; AFONSO-OLIVARES & SOSA-FERRERA & SANTANA-RODRÍGUEZ, 2012; YU & LI & ZHANG, 2012; FERRER *et al.*, 2010). Além disso, outros sorventes também foram testados durante o desenvolvimento do método, entretanto os valores de recuperação foram muito baixos.

Os testes de extração em fase sólida foram realizados utilizando-se 500 mL de água ultrapura, acidificada até pH 2,5 ou 5, e fortificada com CAF, FLX, LVX, BZF na concentração de 20 µg.L⁻¹ e PI (10 µg.L⁻¹). O condicionamento da coluna foi realizado segundo o proposto por Ferrer *et al.* (2010) com modificações. Portanto, 6 mL de MeOH foram aplicados no cartucho, seguidos de 6 mL de água ultrapura em pH 2,5 ou 5. Na sequência a amostra fortificada foi aplicada com uma vazão inicial de aproximadamente (135 gotas.min⁻¹). Após a completa aplicação da amostra, a coluna foi seca sob vácuo por 5 min e os compostos eluídos com 6 mL do solvente extrator.

O solvente extrator utilizado foi o MeOH em diferentes proporções de MeOH:H₂O, conforme apresentado a seguir: MeOH:H₂O (20:80; v/v), MeOH:H₂O (40:60; v/v), MeOH:H₂O (60:40; v/v), MeOH:H₂O (80:20; v/v) e MeOH 100%.

Inicialmente 6 mL de MeOH 20% foi aplicado na coluna e o volume recolhido após extração dos compostos. Na sequência 6 mL de MeOH 40% foi aplicado no mesmo cartucho e o volume coletado. Este procedimento foi realizado com os solventes 60%, 80% e 100% de MeOH. Os volumes foram recolhidos em tubos de vidro e secos em concentrador de amostras a 35° C sob fluxo de N₂. A ressuspensão dos compostos extraídos foi realizada utilizando-se 250 µL de metanol (100%), seguidos de agitação em agitador automático por 1' e depois adicionou-se 250 µL de água ultrapura a 0,2% de ácido fórmico ao frasco que foi novamente agitado por 30'' em agitador. A Figura 3 apresenta um resumo das etapas de extração em fase sólida (SPE) proposta neste estudo.

Figura 3. Etapas da extração em fase sólida.



Legenda: 1= Condicionamento do cartucho, 2= aplicação da amostra e 3= eluição dos analitos.

Os resultados relacionados ao ajuste do pH da amostra e solução extratora foram expressos em termos de recuperação. O pH da amostra e solução extratora selecionados foram aqueles que apresentaram maior porcentagem de recuperação. Para calcular a recuperação realizou-se a extração de brancos de água ultrapura e após a extração em fase sólida o branco foi ressuspensão em 250 μ L de solução de metanol 70% contendo os padrões de CAF, FLX, LVX, BZF na concentração de 40 μ g.L⁻¹ e PI 20 μ g.L⁻¹. Na sequência foi adicionado ao frasco 250 μ L de água ultrapura a 0,2% de ácido fórmico.

- **Avaliação do efeito residual (*carryover*)**

Os testes para a avaliação do efeito residual foram conduzidos com o intuito de promover a redução/remoção da contaminação inter-corridas analíticas. Para reduzir o *carryover* foram testadas quatro soluções de limpeza da agulha do auto-injetor. A primeira era composta por ACN:H₂O (90:10; v/v), a segunda por ACN:H₂O a 0,5% de ácido fórmico (90:10; v/v), a terceira por Isopropanol: MeOH:H₂O (40:40:20; v/v/v), e a última por Isopropanol: MeOH:H₂O na proporção (80:10:10; v/v/v). Além da definição da solução de limpeza foi introduzida ao método uma programação manual da sequência de injeção do auto-injetor diferente daquele padrão do equipamento.

3.3.2. Validação do método analítico por LC-MS/MS

Após o desenvolvimento do método para a detecção e quantificação dos analitos CAF, FLX, LVX e BZF por LC-MS/MS, seguiu-se com os experimentos para a validação. Para tanto, como fonte de matrizes de água bruta, foram utilizadas amostras d'água oriundas de um lago situado no campus Butantã da Universidade de São Paulo (23°33'58.9"S, 46°43'51.8"W). A amostra foi fortificada com PI (5 ng.L⁻¹) e submetida a extração antes da validação para averiguar se a matriz estava isenta de CAF, FLX, LVX e BZF. Para a validação dos compostos de interesse é importante conhecer suas informações e propriedade físico-químicas. Na Tabela 5 são apresentadas algumas informações e propriedades físico-químicas da CAF, FLX, LVX e BZF.

Tabela 5. Informações e propriedades físico-químicas dos compostos avaliados durante a validação do método.

Com p.	N. CAS	Log Kow ^a	Solub em água a 25 °C (mg/L) ^b	Fórmula estrutural	Fórmula Molecular
CAF	58-8-2	- 0,07*	2632		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
FLX	54910-89-3	3,82*	60,28		C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO
LVX	25416-65-3	2,34	2,994		C ₁₅ H ₁₀ I ₄ NO ₄ N ^a
BZF	41859-67-0	4,25	1,224		C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄

Legenda: Log Kow^a = coeficiente de partição octanol (KOWWIN v1.68 estimativa); Log Kow^b = Solubilidade em água estimativa a partir do LogKow (WSKOW v1.42); Determinado a partir de dados experimentais.

Tendo em vista que esta pesquisa de doutorado foi realizada no Brasil e que os parâmetros de validação estabelecidos pela ANVISA são os mesmos que aqueles definidos internacionalmente pela *EUROCHEM, International Conference on*

Harmonisation – ICH, entre outros, e que os procedimentos estão detalhadamente descritos nas resoluções da ANVISA, RDC nº 166, RDC nº 27 e RE nº 899. (BRASIL, 2017; BRASIL, 2011; EUROCHEM, 2014; BRASIL, 2003; ICH, 1994) optou-se por validar o método de acordo com os critérios estabelecidos ANVISA.

Os parâmetros: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão, precisão inter-dia e intra-dia, recuperação e estabilidade da amostra foram analisados após extração em fase sólida e análise por LC-MS/MS. Entretanto, o estudo de estabilidade da solução mãe e solução estoque ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi conduzido levando-se em consideração apenas a análise por LC-MS/MS. Os parâmetros descritos acima, exceto recuperação e estabilidade da solução estoque, não foram aplicados ao PI do método (FLX-d6), pois utilizou-se a área relativa dos analitos para os cálculos.

- **Limite de Detecção e de Quantificação**

O LD e LQ para cada composto foi determinado experimentalmente a partir das seguintes concentrações: 10 ng.L^{-1} ; 5 ng.L^{-1} ; 1 ng.L^{-1} ; $0,5 \text{ ng.L}^{-1}$; $0,2 \text{ ng.L}^{-1}$; $0,1 \text{ ng.L}^{-1}$, $0,05 \text{ ng.L}^{-1}$ e $0,01 \text{ ng.L}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração verificada (n=24).

- **Linearidade**

A faixa de linearidade do método foi determinada fortificando-se as amostras d'água previamente filtradas, acidificadas e fortificadas com a solução estoque ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), a fim de que as concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 100 ng.L^{-1} fossem atingidas para a CAF e LVX; 1, 5, 10, 20, 30 e 50 ng.L^{-1} para FLX e 10, 20, 30, 50, 100 e 250 ng.L^{-1} para o BZF. O procedimento foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações avaliadas (n=18).

- **Recuperação, precisão e exatidão intra e inter-dia**

Para a determinação da recuperação, precisão e exatidão do método as amostras de água foram fortificadas a partir da solução estoque ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), nas concentrações de 5, 50 e 100 ng.L^{-1} para a CAF e LVX; 1, 20 e 50 ng.L^{-1} para FLX e 10, 100 e 250 ng.L^{-1} para o BZF. O preparo e análise das amostras foram realizados em um dia para se determinar a recuperação, exatidão e precisão intra-dia (n=9), e em três dias para se obter a recuperação, exatidão e precisão inter-dias (n=27). Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração.

A precisão foi determinada por meio do coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$CV \% = (DP/CMD) \times 100$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme apresentado pela equação a seguir:

$$\text{Exatidão} = (\text{Concentração média Experimental} / \text{Concentração teórica}) \times 100$$

Onde, o desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação que admite desvios menores ou iguais a 20%.

Os resultados da recuperação foram comparados com soluções de padrões não extraídos na concentração de 5, 50 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a CAF e LVX; 1, 20 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para FLX; e 10, 100 e 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o BZF e de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o PI.

- **Estudo de estabilidade**

- ✓ Estabilidade da amostra

Para a determinação da estabilidade da amostra em geladeira (pré-processamento) o volume de 1L de água foi filtrado e fortificado a partir da solução estoque (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) – nas concentrações de 5, 50 e 100 ng.L^{-1} para a CAF e LVX; 1, 20 e 50 ng.L^{-1} para FLX e 10, 100 e 250 ng.L^{-1} para o BZF – e estocado em geladeira (8° C) por sete dias em frascos âmbar previamente limpos. Cada concentração foi preparada em triplicata (n=9).

A estabilidade da amostra em *freezer* (pós-processamento) foi avaliada após a filtração, acidificação, fortificação com solução estoque (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (concentrações de 5, 50 e 100 ng.L^{-1} para a CAF e LVX; 1, 20 e 50 ng.L^{-1} para FLX; e 10, 100 e 250 ng.L^{-1} para o BZF) e extração em fase sólida. As amostras foram evaporadas e estocadas em *freezer* a - 20° C pelo período máximo de um mês (n=9).

- ✓ Estabilidade da solução mãe

O estudo de estabilidade da solução mãe foi realizado para todos os analitos de interesse exceto para o PI, sendo estas preparadas segundo o descrito no item 3.3.1., em sextuplicata. Três destas soluções foram armazenadas em *freezer* a - 20°C pelo período de três meses e as outras três foram analisadas por LC-MS/MS logo após o preparo. As

áreas absolutas da solução mãe (1 mg.mL^{-1}) analisadas em triplicata por LC-MS/MS logo após o preparo foram utilizadas para verificar a estabilidade da solução mãe.

✓ Estabilidade da solução estoque

O estudo da estabilidade da solução estoque de CAF, FLX, LVX, BZF e PI (FLX-d6) foi realizado observando-se os seguintes parâmetros: estabilidade de curta e longa duração e estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Para isso, as soluções estoque ($100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) foram analisadas por LC-MS/MS logo após o preparo e utilizadas durante o estudo de estabilidade.

Estabilidade de curta duração: A solução estoque foi preparada conforme o descrito no item 3.3.1. em sextuplicata. Três destas soluções foram analisadas após 2 horas de exposição à temperatura ambiente ($\sim 22^\circ \text{ C}$) e as outras três após 24 horas de exposição à temperatura ambiente ($\sim 22^\circ \text{ C}$). Esse período foi avaliado levando-se em consideração o tempo em que a mesma permanece a temperatura ambiente durante a execução das análises.

Estabilidade de longa duração: A solução estoque foi preparada conforme o item 3.3.1. ($n=6$). Três destas soluções foram analisadas por LC-MS/MS após 1 mês de armazenamento em *freezer* a -20° C , e as outras após três meses de armazenamento em *freezer* a -20° C , respectivamente.

Estabilidade 3 ciclos de congelamento e descongelamento: A solução estoque foi preparada conforme o descrito no item 3.3.1., em triplicata, e na sequência congelada em *freezer* a -20° C por 24 horas. As mesmas foram descongeladas e congeladas a -20° C até que três ciclos de congelamento (24 horas cada) e descongelamento fossem realizados. Na sequência as amostras foram analisadas pelo método analítico proposto.

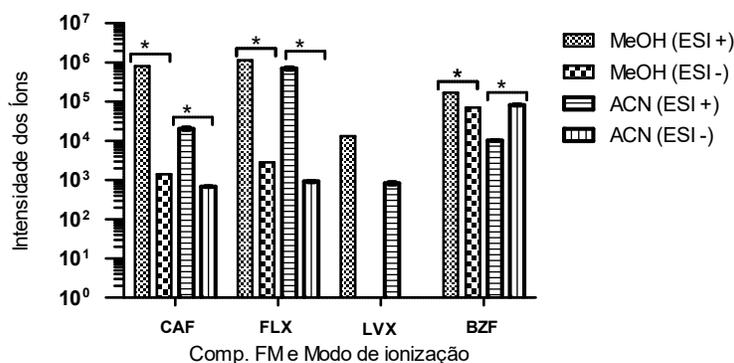
3.4. Resultados e discussões

3.4.1. Desenvolvimento e validação de método analítico por LC-MS/MS

- Eleição do modo de ionização por *electrospray* (ESI)

A seleção do componente orgânico de FM e modo de ionização da fonte por *electrospray* (positivo e/ou negativo) foram determinados para os compostos com base na intensidade dos íons obtidos para as condições avaliadas. Os resultados são apresentados na Figura 4.

Figura 4. Efeito de MeOH:H₂O (70:30; v/v) e ACN:H₂O (70:30;v/v) sobre a eficiência de ionização por *electrospray* em modo positivo e negativo para CAF, FLX, LVX e BZF quando a concentração de 10 µg.mL⁻¹ foi injetada (1 µL) no EM. As colunas representam as médias das intensidades dos íons de cada composto e as barras os desvios padrão (n=3).



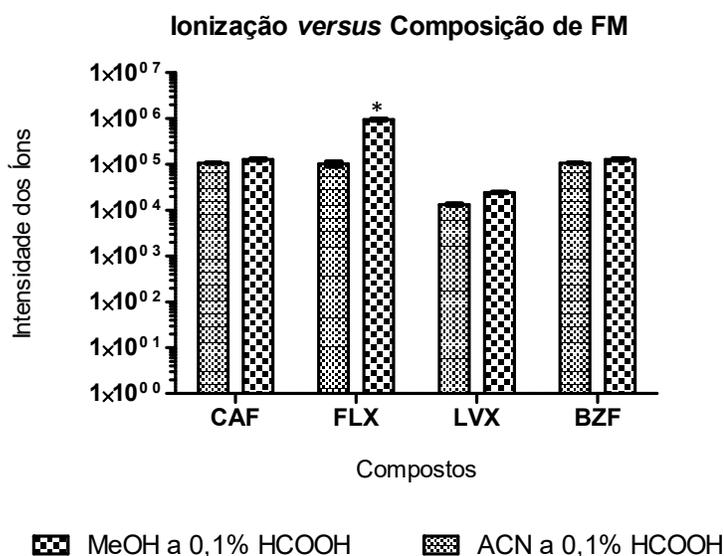
Legenda: *Os asteriscos representam valores de $p < 0,05$ após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

Analisando-se a figura acima, pode-se inferir que o modo de ionização positivo gerou os melhores resultados quando o metanol e ACN foram utilizados como componente orgânico de FM. Exceto para o BZF, que foi melhor ionizado em modo negativo quando a ACN foi empregada. Por isso, o modo positivo de ionização foi selecionado. Entretanto, para verificar o efeito do pH e dos aditivos de FM optou-se por avaliar também a ACN.

- **Determinação do componente orgânico, aditivos e pH de fase móvel**

Após a determinação do modo de ionização, realizou-se a escolha do componente orgânico, pH e aditivos de FM. Os melhores resultados foram obtidos para a fase móvel composta por ACN:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH. Na Figura 5 são apresentadas as intensidades dos íons gerados pela ionização por ESI em modo positivo quando a composição ACN:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH foi comparada com a FM composta por MeOH:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH.

Figura 5. Intensidade dos íons gerados pela ionização por ESI (+) da solução padrão de CAF, FLX, LVX e BZF (10 µg.mL⁻¹) injetada em EM utilizando como FM: MeOH:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH e ACN:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de HCOOH. As colunas representam a média ± desvio padrão (n=3).



Legenda: *Os asteriscos representam valores de $p < 0,05$ após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

Com base na Figura 1.10 nota-se que a única diferença significativa entre as duas composições avaliadas foi observada para a intensidade de ionização da FLX. Sendo assim a ACN:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de ácido fórmico foi definida como fase móvel do método proposto.

- **Definição das condições cromatográficas**

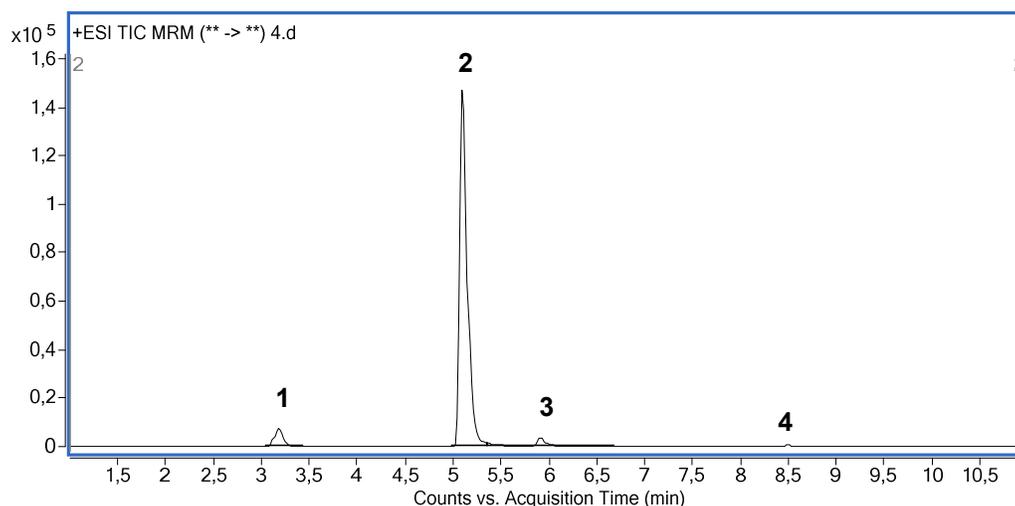
Embora a separação cromatográfica não seja uma etapa limitante para a análise por LC-MS/MS uma boa separação dos compostos é importante para a sensibilidade do método. Deste modo, a melhor separação cromatográfica foi obtida pelo emprego do gradiente de eluição apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Gradiente de eluição para a obtenção da melhor separação cromatográfica.

Tempo (min)	Solvente orgânico (%)	Fluxo
0.00	30	0,3
10.00	100	0,3
15.00	100	0,3
16.00	30	0,3

O retorno as condições iniciais do gradiente de FM e re-equilíbrio da coluna foi realizado após 16 minutos de análise e teve duração de 5 minutos. O cromatograma gerado após a injeção de 1 µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 20 µg.L⁻¹ é apresentado na Figura 6.

Figura 6. Cromatograma de íons totais gerado por LC-MS/MS em ESI (+) para o teste de gradiente 5, onde: 1= CAF [M+H]⁺ (*m/z* 195,0 > 138,1), 2= FLX [M+H]⁺ (*m/z* 310,0 > 44,1), 2*= FLX-D6 (PI) [M+H]⁺ (*m/z* 316,0 > 44,1), 3= LVX [M+H]⁺ (*m/z* 777,4 > 731,7), 4= BZF [M+H]⁺ (*m/z* 362,0 > 317,1). Após a injeção de 1µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 20 µg. L⁻¹.

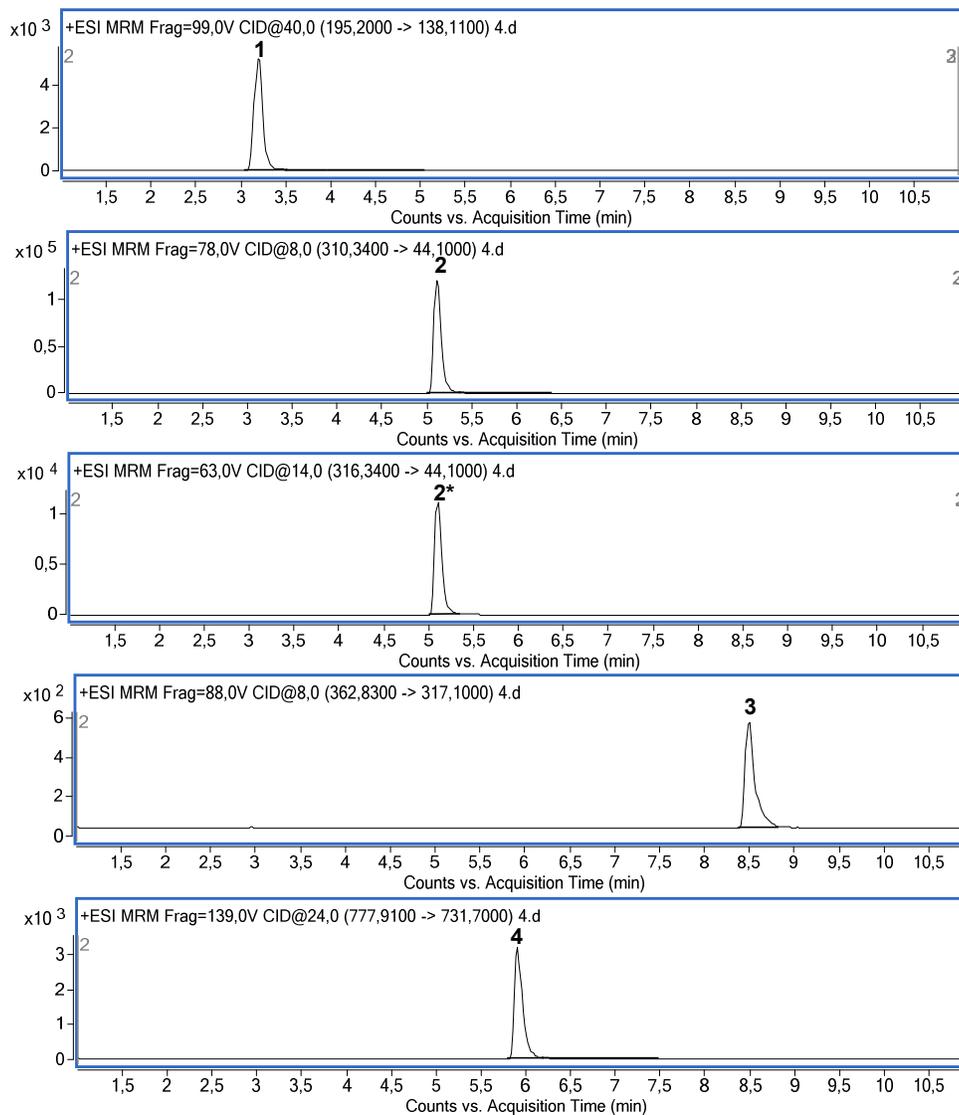


Legenda: 1= CAF; 2=FLX; 3= LVX; 4= BZF

Na Figura 6 é apresentado o cromatograma dos íons totais (“*Total Ion Chromatogram –TIC*”). Porém, devido à diferença de intensidade entre os íons e com o

intuito de facilitar a visualização do pico cromatográfico de cada composto, a Figura 7 apresenta o cromatograma de cada um dos compostos monitorados por MRM.

Figura 7. Cromatograma gerado por *LC-MS/MS* em ESI (+) para o teste de gradiente5, onde: 1= CAF [M+H]⁺ (*m/z* 195,0 > 138,1), 2= FLX [M+H]⁺ (*m/z* 310,0 > 44,1), 2*= FLX-D6 (PI) [M+H]⁺ (*m/z* 316,0 > 44,1), 3= LVX [M+H]⁺ (*m/z* 777,4 > 731,7), 4= BZF [M+H]⁺ (*m/z* 362,0 > 317,1). Após a injeção de 1 µL de solução contendo CAF, FLX, LVX e BZF na concentração nominal de 20 µg.L⁻¹.



Uma vez definido o gradiente de eluição e o fluxo da fase móvel, o volume de injeção também foi avaliado. A intensidade do sinal gerado por cada íon monitorado (*m/z*) para todos os volumes analisados foi superior a 100. Ao plotar-se o gráfico de intensidade dos íons monitorados *versus* os volumes injetados o valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99 para todos os analitos (Tabela 7). Isto significa que

o aumento do volume de injeção eleva a intensidade do íon monitorado proporcionalmente. Tendo em vista que menores volumes de injeção levam a picos cromatográficos mais estreitos (MALDANER E JARDIM, 2009) e as dimensões da coluna cromatográfica utilizada optou-se pelo menor volume de injeção testado (5 µL).

Tabela 7. Valores de R determinados para CAF, FLX, LVX e BZF a partir da intensidade dos íons monitorados *versus* os volumes injetados (5; 10; 15 e 20 µL).

Composto	Coefficiente de correlação -R
CAF	0,998
FLX	0,999
LVX	0,999
BZF	0,993

- **Definição dos parâmetros do espectrômetro de massas.**

Uma vez estabelecidos o modo de ionização, composição de FM e separação cromatográfica deu-se início a determinação da energia de colisão que foi aplicada ao espectrômetro de massas, bem como a seleção dos íons produto por meio do *Software Optimizer*. A determinação dos íons produto foi circunstancial para que a análise por MRM pudesse ser empregada. Na Tabela 8 os resultados gerados pelo *software* são apresentados.

Para que o monitoramento de reações múltiplas possa ser empregado é necessário o monitoramento de dois ou mais íons produto (SANCO, 2010).

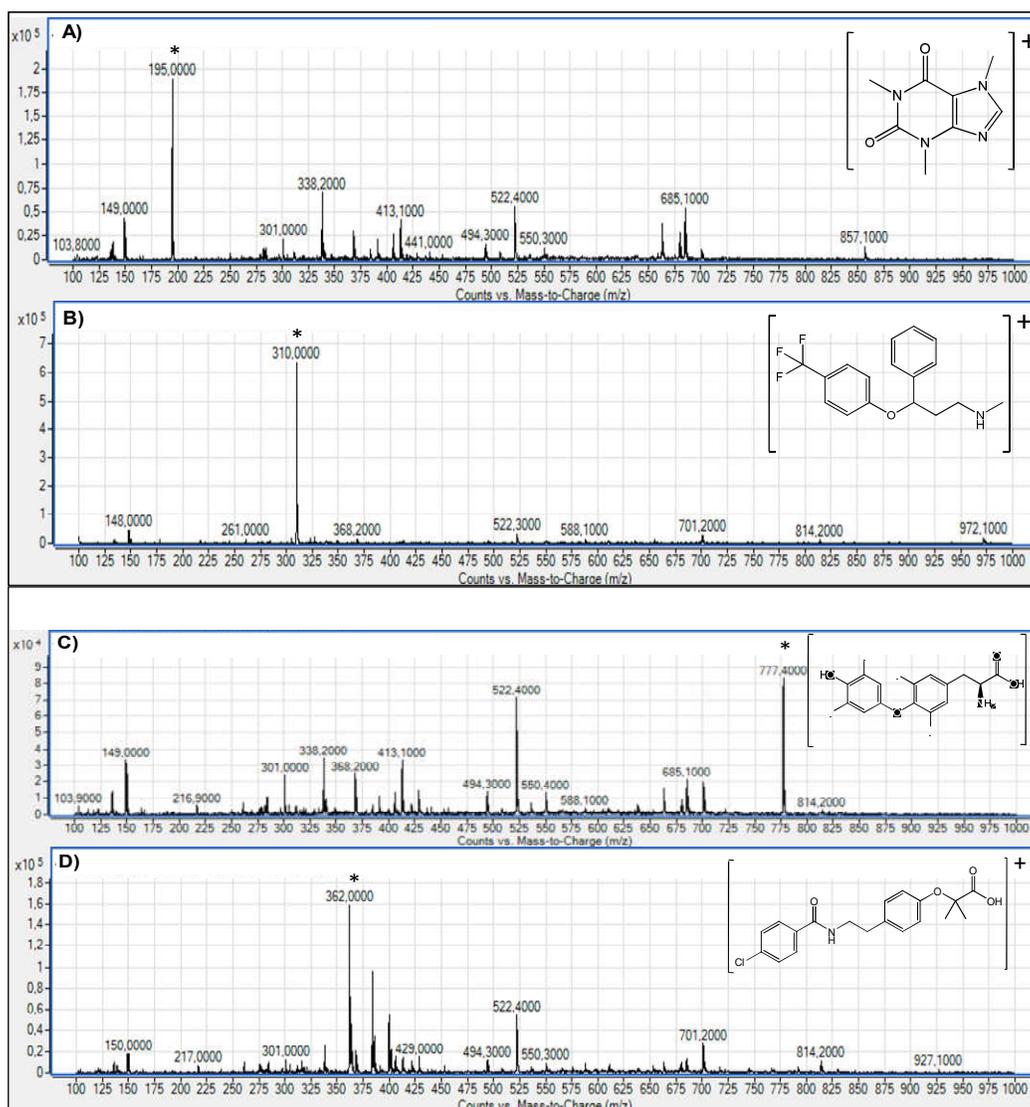
Tabela 8. Parâmetros otimizados pelo *Software Optimizer* em ionização por *eletrospray* no modo positivo para CAF (10 µg.mL⁻¹), FLX (10 µg.mL⁻¹), LVX (10 µg.mL⁻¹), BZF (10 µg.mL⁻¹) e FLX D6 (10 µg.mL⁻¹) com FM composta por ACN a 0,1% de HCOOH: H₂O a 0,1% de HCOOH (70:30; v/v).

Composto	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Fragmentor	Energia de colisão	Abundancia
CAF	195.2	138.1*	99	16	39564
CAF	195.2	42.1	99	40	16559
FLX	310.3	44.1*	78	8	645864
FLX	310.3	148.1	78	0	72831
LVX	777.4	731.7*	139	24	32447
LVX	777.4	633.8	139	24	3710
LVX	777.4	604.8	139	45	3288
BZF	362,8	317.1*	88	8	5753
BZF	362,8	139.0	88	24	4264
BZF	362,8	140.0	88	24	2417
BZF	362,8	121.1	88	32	2061
FLX-D6	316,0	44.1*	63	14	12530
FLX-D6	316.0	154.1	63	22	6500

Legenda: *= íon quantificador (íon mais abundante).

Os dados foram considerados satisfatórios e então incorporados ao método para que o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) pudesse ser realizado. Com o intuito de verificar se os íons monitorados estavam na forma $[M+H]^+$ após as modificações na composição da FM realizou-se uma análise “fullscan” dos compostos. Na figura 8 os espectros “fullscan” dos compostos podem ser observados.

Figura 8. Espectros “fullscan” dos compostos na forma $[M+H]^+$: CAF =195,0(A); FLX=310 (B), LVX=777,4 (C) e BZF=362,0 obtidos por infusão direta.



Legenda: *= Íon $[M+H]^+$

De acordo com os espectros de massas apresentados na figura acima os íons precursores monitorados pelo método estão na forma $[M+H]^+$.

- **Otimização da extração em fase sólida**

Na Tabela 9 estão compilados os resultados dos testes preliminares para a extração em fase sólida. Os mesmos estão expressos em termos de recuperação.

Tabela 9. Porcentagem de recuperação encontrada para os analitos em diferentes proporções de solução extratora e em pH 5 e 2,5.

Analíto	Recuperação (%)									
	Composição solvente extrator									
	MeOH 100%		MeOH:H ₂ O (80:20; v/v)		MeOH:H ₂ O (60:40; v/v)		MeOH:H ₂ O (40:60; v/v)		MeOH:H ₂ O (20:80; v/v)	
	pH 5	pH2,5	pH 5	pH2,5	pH 5	pH2,5	pH 5	pH2,5	pH 5	pH2,5
CAF	*	*	*	*	24,5 ± 2,96	16,8 ± 1,2	-	-	-	-
FLX	*	*	46± 1,5	54,7± 4,2	*	*	-	-	-	-
LVX	53,5 ± 7,3	94,6± 5,7	*	*	*	*	-	-	-	-
BZF	60± 3	56,2± 2,1	*	*	*	*	-	-	-	-

Legenda: - = indica que não houve recuperação quando as soluções extradoras foram empregadas; * = indica que houve extração, porém não foram as maiores.

Os resultados encontrados indicam que o solvente extrai os fármacos da coluna a partir da proporção 60:40; v/v de MeOH:H₂O. Entretanto, como diferentes proporções de solvente extrator foram aplicadas em sequência no mesmo cartucho, pode-se inferir que MeOH 100% seja suficiente para extrair todos os analitos da coluna resultando em porcentagens de recuperação superiores aquelas apresentadas na Tabela 10

A CAF é uma base fraca cujo pka da amina presente em sua molécula é igual a 8,3 e a FLX também é um composto básico, em a amina secundária apresenta pka de 9,8, enquanto que a LVX possui dois pka's (ácidos e básicos). O BZF é um composto ácido e o ácido carboxílico da molécula possui pka igual a 3,83 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010). Tais dados são relevantes, pois a adsorção dos compostos na coluna de extração é dependente do pH.

A extração dos compostos aderidos ao sorvente pode ser afetada pelo solvente. Afonso-Olivares *et al.* (2017) avaliaram dois solventes extratores, MeOH e ACN. Os autores concluíram que o metanol foi o solvente ideal para a extração dos compostos de interesse naquele estudo. Entre as moléculas pesquisadas pelos autores constava a FLX e CAF. Ainda segundo esses autores a adsorção dos compostos ao sorvente que reveste

o cartucho de SPE foi dependente do pH da amostra (AFONSO-OLIVARES *et al.*, 2017). Isto ocorre, pois a maioria dos fármacos possui um ou mais grupamentos ionizáveis, ou seja, o pH da amostra atrelado ao pKa da substância determina se os grupamentos estarão ionizados ou não, influenciando assim a extração do analito de interesse e conseqüentemente a recuperação do mesmo (CALDAS *et al.*, 2016).

Com base nesses parâmetros tem-se que no pH 2,5 as moléculas da CAF, FLX e LVX estavam ionizadas. Entretanto, para a CAF tanto o pH 5 quanto o pH 2,5 geraram baixos valores de recuperação. Afonso-Olivares *et al.* (2017) obtiveram uma recuperação de 50% para a CAF em pH 7.

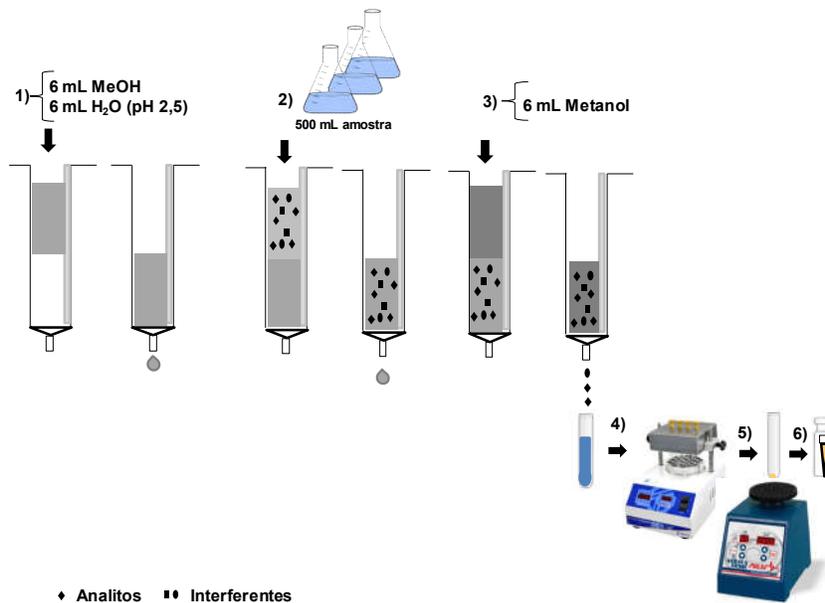
Ao se verificar a Tabela 9 (acima) percebe-se que o ajuste do pH da amostra para 2,5 favoreceu a extração da FLX e da LVX. A LVX é um análogo dos hormônios tireoidianos e como tal trata-se de um composto zwitteriônico, ou seja, mantém-se carregado em uma ampla faixa de pH (ÁLVAREZ & MADRID & MARAZUELA, 2016). Para ambos os compostos o pH 2,5 favoreceu o predomínio (> 99%) da forma ionizada de FLX e LVX e conforme o apresentado no item 3.1.3. o sorvente (*N*-vinilpirrolidona e divinilbenzeno) que reveste a Oasis® HBL é mais eficaz para a extração de compostos polares.

Para o BZF foi observado um aumento na eficiência de extração em pH 5. Isso pode ter ocorrido, pois compostos ácidos se ionizam à medida que o pH se eleva. Conforme visto anteriormente o sorvente que reveste a Oasis® HBL é mais eficaz para a extração de compostos polares, porém também apresenta boa retenção para compostos apolares.

Afonso-Olivares & Sosa-Ferrera & Santana-Rodríguez (2012) sugerem que a acidificação de amostras contendo FLX melhora a sua extração. Svanfelt & Eriksson & Kronberg (2010) também afirmam que acidificação da amostra melhora a extração da LVX. Embora os valores de recuperação para CAF e BZF tenham sido relativamente melhores em pH 5, ainda assim se obteve a recuperação desses compostos devido a abrangência da coluna de extração utilizada.

Com base nos resultados optou-se pelo ajuste do pH da amostra para 2,5 e o emprego de MeOH (100%) como solvente extrator. Um fluxograma com todas as etapas da extração é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Resumo da extração em fase sólida definida no estudo



Legenda: 1= condicionamento da coluna de SPE, 2= aplicação da amostra, 3= extração dos analitos; 4= secagem (30 °C sob fluxo de N₂); 5= ressuspensão (250 µL de metanol e 250 µL H₂O a 0,2% de HCOOH) e 6= injeção (amostra pronta para ser injetada no LC-MS/MS).

A otimização da SPE foi à última etapa relacionada ao desenvolvimento do método proposto. Por isso, uma tabela resumo (ver Tabela 10) foi confeccionada com o intuito de facilitar a visualização dos parâmetros estabelecidos para o método proposto.

Tabela 10. Resumo das condições cromatográficas, do espectrômetro de massas e da extração em fase sólida, desenvolvidos para a quantificação de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras ambientais de água por LC-MS/MS.

Condições cromatográficas

- Coluna C18 (150 x 3,0 mm; 3 μ m) Phenomenex®
- Pré-coluna C18 (2.1 x 3,0; 3 μ m) Phenomenex®
- Fluxo: 0,3 mL.min⁻¹;
- Fase móvel: ACN a 0,1% HCOOH: H₂O a 0,1% HCOOH (30:70 v/v) (condição inicial).
- Volume de injeção: 5 μ L
- Padrão Interno (PI): Fluoxetina deuterada (FLX-d6)
- Tempo de análise: 20 min.
- Tempo de retenção dos compostos: CAF = 3,1 \pm 0,1 (min); FLX = 5,1 \pm 0,1 (min); LVX = 5,9 \pm 0,1 (min); BZF = 8,4 \pm 0,1 (min) e PI = 5,1 \pm 0,1 (min);

Espectrômetro de massas

- Parâmetros da fonte:
- Capilar = 4000 V; Gás nebulizador = 35 psi; Gás secante = vazão 8L.mim⁻¹ e Temperatura 250°C; Gás de bainha = vazão 10L.mim⁻¹ e Temperatura 300°C; *Nozzle* = 0 V;
- Modo de ionização por ESI: Positivo [M+H]⁺
- Transições dos íons quantificadores monitorados por MRM:
CAF 195.2 > 138.1; FLX 310.3 > 44.1; LVX 777.9 > 731.7; BZF 362.8 > 317.1; FLX D6 316.3 > 44.1.
- Transições dos íons qualificadores monitorados por MRM:
CAF 195.2 > 42.2; FLX 310.3 > 148.1; LVX 777.9 > 633.8; LVX 777.9 > 604.3; BZF 362.8 > 139.0; BZF 362.8 > 140.0; BZF 362.8 > 121.1; FLX D6 316.3 > 154.1.

Extração em Fase sólida

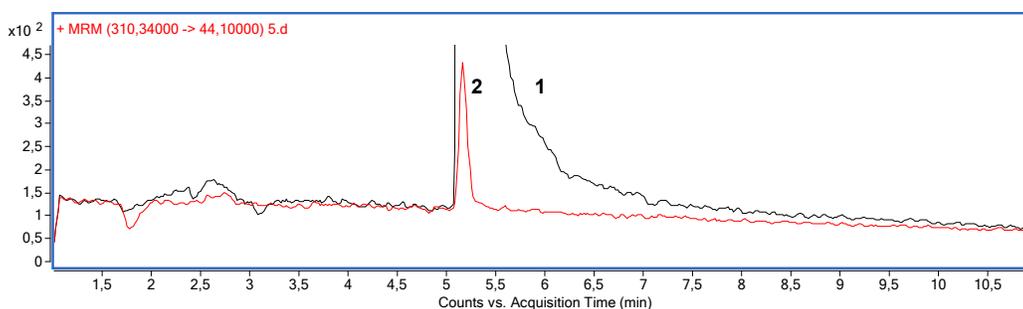
- Coluna de SPE: Oasis® HBL 6cc (500 mg) *Waters*®.
- Condicionamento: 1º) 6 mL MeOH 100%; 2º) 6 mL H₂O ultrapura pH= 2,5; 3º) Aplicação da amostra (500 mL) – após secar a coluna durante 5' sob vácuo; 4º) Extração com 6 mL MeOH 100%.
- Solvente Extrator: MeOH 100%
- Temperatura de secagem da amostra: 30 °C
- Volume de ressuspensão: 500 μ L
- Solvente de ressuspensão: 250 μ L de MeOH 100% e 250 μ L de água ultrapura a 0,2% de ácido fórmico.

- **Avaliação do efeito residual (*carryover*)**

Segundo Hughes *et al.* (2007) há dois tipos de efeito residual, um que está relacionado ao autoinjeter e outro a coluna, sendo possível diferenciá-los com base no tempo de retenção (*tr*) dos analitos de interesse. No efeito residual vinculado ao auto injeter, o *tr* do composto não sofre alteração. Todavia, resíduos retidos na coluna promovem variação no tempo de retenção da molécula analisada.

Ao se realizar a injeção de um branco de solvente após a injeção no equipamento de solução contendo FLX na concentração de 1 mg.mL^{-1} , verificou-se a presença de pico “fantasma” no mesmo tempo de retenção (tr) da FLX. O tr constante indica um efeito residual oriundo do autoinjeter e por isso buscaram-se alternativas para removê-lo ou reduzi-lo. Na Figura 10 pode-se visualizar os cromatogramas representativos obtidos pela injeção de solução de padrão (1), seguido da injeção de um branco de solvente (2) com a programação padrão da sequência de injeção no autoinjeter.

Figura 10. Cromatograma obtido por LC-MS/MS, onde se observa o efeito residual da FLX em uma amostra de branco de solvente (vermelho) após análise de uma solução padrão FLX (em preto) na concentração de 1 mg.mL^{-1} .



Para a redução do efeito residual oriundo do autoinjeter buscou-se averiguar diferentes soluções de limpeza da agulha do autoinjeter. A solução que apresentou os melhores resultados foi aquela composta por Isopropanol:MeOH:H₂O na proporção 80:10:10; v/v/v. Entretanto, somente a alteração na composição da solução de limpeza da agulha não foi suficiente para remoção do efeito residual a níveis aceitáveis (BRASIL, 2003). Por isso, uma programação manual da sequência de injeção no autoinjeter foi empregada (ver Tabela 11).

Tabela 11. Programação manual da sequência de injeção no autoinjeter.

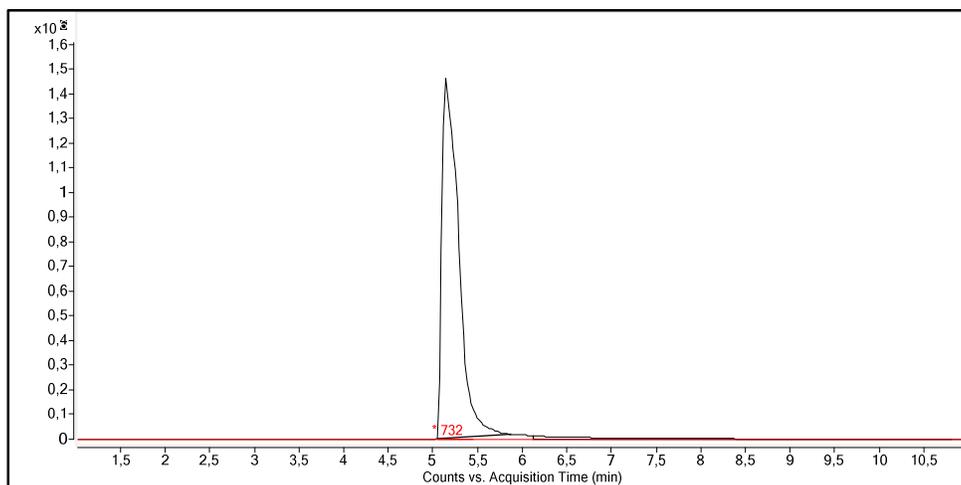
Linha	Função
1	<i>Draw</i>
2	<i>Needlewash in flushport for 2 sec</i>
3	<i>Inject</i>
4	<i>Wait 4.8 min</i>
5	<i>Valvebypass</i>
6	<i>Valvemainpass</i>
7	<i>Valvebypass</i>
8	<i>Valvemainpass</i>

Após a aplicação da programação manual verificou-se uma redução do efeito residual. Tal resultado foi possível devido à inserção de ciclos de rotação da válvula de injeção durante a etapa de lavagem da coluna com alto percentual de solvente orgânico.

A avaliação do *carryover* deve ser realizada por meio da comparação com o limite inferior de quantificação (LIQ) do método. Neste caso as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do mesmo nas amostras processadas do LIQ após a injeção da maior concentração (BRASIL, 2011). Durante o desenvolvimento/otimização deste método adotou-se um LIQ para a FLX igual a 1 ng.L⁻¹. É importante ressaltar que soluções concentradas (1 mg.mL⁻¹) foram analisadas no equipamento durante o estudo de estabilidade. Entretanto, o efeito residual também foi avaliado para soluções de padrões na concentração de mg.L⁻¹, µg.L⁻¹ e ng.L⁻¹

Os resultados alcançados para as soluções de padrões nas concentrações de mg.L⁻¹, µg.L⁻¹ e ng.L⁻¹ foram inferiores a 20% para todas as concentrações avaliadas e portanto estão de acordo com proposto pela ANVISA na sua RE 899. Entretanto, o efeito residual causado pela solução mãe foi superior a 20% (ver Figura 11). Contudo, isso provavelmente ocorreu porque a solução estava bastante concentrada. E além do efeito residual do autoinjeter constatou-se o efeito residual proveniente da coluna quando essa concentração foi injetada. Com o intuito de remover os contaminantes residuais da coluna, sem alterar os parâmetros previamente estabelecidos, optou-se por injetar brancos de solvente compostos por Isopropanol:MeOH:H₂O na proporção 80:10:10 (v/v/v) entre as análises (n=3) da solução mãe (1 mg.mL⁻¹) ou até que não houvesse mais contaminação na coluna.

Figura 11. Cromatograma obtido por LC-MS/MS, em que pode ser observado o efeito residual da FLX (devido à modificação na programação do autoinjeter) em uma amostra de branco de solvente (em vermelho), após análise de uma solução padrão contendo 1mg.mL^{-1} de FLX (em vermelho).

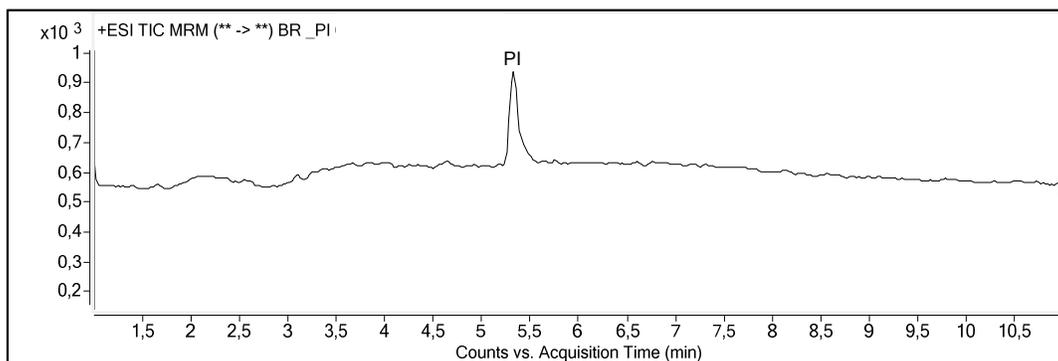


3.4.2. Validação do método analítico por LC/MS-MS

Métodos analíticos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas quando associados à extração em fase sólida permitem a quantificação de fármacos em baixas concentrações ($\mu\text{g.L}^{-1}$, ng.L^{-1} , etc.). Isso possibilita a quantificação desses compostos em concentrações ambientais. Entretanto, o efeito matriz é um componente que pode interferir na sensibilidade dessa análise. Sendo importante o emprego de matrizes que sejam reais ou com a maior semelhança possível com aquelas encontradas no meio ambiente.

Para a validação do método proposto foram utilizadas amostras d'água ambientais, oriundas de um lago situado no campus Butantã da Universidade de São Paulo. As amostras foram submetidas à extração em fase sólida (fortificadas com PI) para averiguar se a matriz estava isenta de CAF, FLX, LVX e BZF. A Figura 12 apresenta o cromatograma gerado a partir da análise da amostra de água avaliada fortificada com o PI.

Figura 12. Cromatograma (TIC) do branco de amostra fortificada com PI (FLX - d6), após extração em fase sólida.



De acordo com o apresentado na Figura 12, o pico cromatográfico observado refere-se ao PI. Após a verificação da ausência (ou abaixo LD) dos compostos de interesse na matriz iniciou-se a validação do método por LC-MS/MS. Os seguintes parâmetros foram avaliados: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão inter-dia e intra-dia, exatidão, recuperação e estabilidade (amostra e soluções mãe e estoque). Todos estes critérios foram determinados após o procedimento de extração da amostra em fase sólida e análise por LC-MS/MS, exceto para o estudo de estabilidade da solução mãe e solução estoque que foi conduzido considerando-se apenas as análises por LC-MS/MS.

Os resultados foram gerados a partir da área relativa, ou seja, área do analito sobre área do PI, por isso o único critério avaliado para o PI (FLX-d6) foi a recuperação do mesmo e a estabilidade da solução estoque. Na Tabela 12 os resultados gerados para os parâmetros validados estão apresentados, exceto estabilidade.

Tabela 12. Resultados dos parâmetros validados para a CAF, FLX, LVX e BZF para o método proposto.

Parâmetros	CAF	FLX	LVX	BZF	PI ^d
LD (ng.L ⁻¹)	1	0,5	1	5	-
LQ (ng.L ⁻¹)	5	1	5	10	-
Linearidade (ng.L ⁻¹)	5-100	1-50	5-100	10-250	-
Reg. Linear (r)	0,9986	0,991	0,9988	0,9935	-
Precisão					
Interdia/ Intra (CV%*)					
Baixa ^a	4,5/ 7,3	4,0/3,0	9,4/ 4,0	6,8/ 1,9	-
Média ^b	2,5/ 10,6	3,8/ 4,5	9,2/ 8,0	4,0/ 4,2	-
Alta ^c	5,0/ 6,0	8,5/ 4,8	7,7/ 5,6	9,7/ 7,0	-
Exatidão					
Interdia/ Intra (%) [*]					
Baixa ^a	104,5 – 90,0/ 106,5 – 96,6	113,4 – 85,8/ 109,3 – 91,4	99,1-86,0/ 101,3-86,5	110,0 - 95,8/ 113,0 - 95,6	-
Média ^b	115,0 –98,0/ 108,0 – 98,0	109,8 – 101,0/ 111,0 – 109,4	94,8-85,0/ 95,3-92,7	95,5 - 94,5/ 104,5 - 88,5	-
Alta ^c	108,0 – 86,6/ 110,2 – 91,8	105,0 – 88,6/ 99,0 – 90,0	107,8-92,3/ 105,8-94,6	111,0 - 90,3/ 104,6 - 90,5	-
Recuperação (%±DP;CV% ^y)					
Interdia/ Intra					
Baixa ^a ±DP; CV% ^y	85,9±11,2;11,7/ 88,9±10,7; 12,0	83,9±5,8; 3,1/ 81,6±4,3; 5,3	89,5±3,1; 3,5/ 93,7±2,8; 3,0	91,9±9,9;3,1/ 92,2±2,6; 2,9	84,7±0,3;0,3/ 88,6±4,6; 5,2
Média ^b ±DP; CV% [*]	87,6±8,0; 9,6/ 88,8 ± 9,1;10,3	87,2±0,5; 0,5/ 84,4±16,3;19,3	87,9±6,1; 6,2/ 91,2±6,1; 6,7	104,9±1,7;2,0/ 102,5±9,5; 9,3	-
Alta ^c ±DP; CV% [*]	92,3±5,8; 5,6/ 90,0 ± 1,3;1,4	91,6±2,7; 2,6/ 90,6 ± 4,0; 4,4	87,6±7,2; 8,5/ 85,6 ± 2,2; 2,5	107,4±6,5;7,3/ 104,2 ± 0,2; 2	-

LD= Limite de detecção

LQ= Limite de quantificação

r = Coeficiente de correlação

CV%* = Coeficiente de Variação (%) determinado para triplicatas das concentrações avaliadas.

(%)^{*} = A exatidão determinada apresenta desvios inferiores a 15% para todas as concentrações avaliadas.

^a = Solução de baixa concentração, trata-se do LQ do método de cada composto analisado.

^b = Solução de média concentração, sendo de 20 ng.L⁻¹ para a FLX, 50 ng.L⁻¹ para CAF e LVX, e 100 ng.L⁻¹ para BZF.

^c = Solução de alta concentração, trata-se da maior concentração determinada para a linearidade do método de cada composto.

^d = Concentração de PI igual a 5 ng.L⁻¹ (a mesma em todos os parâmetros analisados).

De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) o método pode ser considerado validado para os parâmetros apresentados na Tabela 13, pois os parâmetros estão de acordo com a RDC 166/2017 e RE 899/2003 para validação de métodos analíticos. Quanto ao parâmetro linearidade os valores obtidos foram superiores a 0,99. Além disso, o método foi considerado preciso e exato, pois os valores de CV não excederam 15% para o primeiro e a exatidão variou entre 85% e 115% (BRASIL a,

2017; BRASIL, 2003). Quanto ao parâmetro recuperação os valores obtidos variaram entre 70 e 120%. Segundo a RE 899/2003 a recuperação dos analitos de interesse e PI deve estar próxima a 100%, entretanto admitem-se valores menores desde que sejam precisos e exatos. Portanto, a recuperação também foi considerada satisfatória.

Em 2015 b, Krueve *et al.* escreveram uma revisão sobre a validação de métodos por LC-MS. Neste artigo os autores relatam que valores de recuperação entre 70% e 120% são considerados aceitáveis. Tal afirmação corrobora os valores de recuperação gerados para o método validado (KRUEVE *et al.*, 2015 b).

Para a CAF o valor do coeficiente de correlação (r) foi a igual 0,9986, na faixa de linearidade determinada pelo método, 5 – 100 ng.L⁻¹. Ao se comparar esse resultado com outros da literatura percebe-se que a linearidade está de acordo com o alcançado por Wanga & Gardinali (2012) que obteve valores de r = 0,9946 para a faixa de detecção entre 2–2048 ng.L⁻¹. As recuperações da CAF nas três diferentes concentrações avaliadas variam entre 70% (para o menor valor de recuperação) e 98% (para o maior valor de recuperação). Tais resultados são semelhantes àqueles encontrados na literatura para a recuperação de CAF de amostras d'água ambientais. Lardy-fontan *et al.* (2017) alcançaram valores de recuperação para a CAF de 102%, enquanto que Gomez *et al.* (2007) recuperou 95% da CAF e Lajeunesse & Gagnon (2007) 92%.

A FLX também apresentou recuperação superior a 70% para todas as concentrações avaliadas, enquanto que Afonso-Olivares & Sosa-Ferrera & Santana-Rodríguez (2012) obtiveram uma recuperação de 21% para esse composto. Os autores sugerem que esse valor pode ter ocorrido, pois naquele procedimento as amostras foram alcalinizadas e segundo eles a FLX normalmente precisa estar em pH ácido para ser extraída eficientemente (AFONSO-OLIVARES & SOSA-FERRERA & SANTANA-RODRÍGUEZ, 2012). Isto sugere que a extração proposta nesta tese é eficiente para a extração de FLX. Rivera-Jaimes *et al.* (2018) utilizaram cartucho de extração igual ao utilizado neste estudo para a extração de FLX de amostras ambientais d'água, e encontraram valores entre 67% e 71%. Entretanto o pH da amostra coletada não foi corrigido para a análise. Estes mesmos pesquisadores determinaram valores de r > 0,9999 para a faixa de linearidade verificada (0,5 – 500 ng.L⁻¹) e o limite de quantificação do método foi de 2,3 ng.L⁻¹ para amostras de água superficiais avaliadas.

Svanfelt & Eriksson & Kronberg (2010) também acidificaram a amostra até pH 2,5 e utilizaram o cartucho de extração da Oasis[®] HLB para extração de hormônios

tiroidianos (T3 e T4). A recuperação determinada por eles foi de $75 \pm 3\%$ para o primeiro e $82 \pm 8\%$ para o segundo. Esses dados estão semelhantes àqueles determinados na tabela 13 para a LVX.

Para o BZF, Bueno *et al.* (2009) alcançaram valores de r iguais a 0,981 para a faixa de linearidade proposta pelos autores, a recuperação foi de 85% e o limite de quantificação de 3 ng.L^{-1} (Bueno *et al.*, 2009). Enquanto que Ribeiro *et al.* (2015) recuperou entre 34,5% e 39% dos analitos de interesse. Além desse parâmetro o autor alcançou valores de exatidão de 94,4% a 115 % enquanto que a precisão do método variou de 0,28% – 9,82%.

Rivera-Jaimes *et al.* (2018) também obteve bons valores de coeficiente de correlação ($r > 0,9999$) para a faixa de linearidade monitorada de BZF ($1 - 1000 \text{ ng.L}^{-1}$), bem como para a recuperação, entre 105 e 107%. Para o LD e LQ do método os pesquisadores determinaram valores de $0,3 \text{ ng.L}^{-1}$ e 1 ng.L^{-1} , respectivamente e Boix *et al.* (2015) encontrou um LD igual a 2 ng.L^{-1} . Embora o limite de detecção do BZF determinado e validado nesta tese para a detecção em amostras superficiais de água (ver tabela 1.14) seja igual a 5 ng.L^{-1} , ou seja, cerca de 15 vezes maior do que o alcançado por Rivera-Jaimes *et al.* (2018), este valor possibilitaria a detecção e quantificação ambiental de BZF. Um exemplo disso é o mesmo autor quantificou 250 ng.L^{-1} de BZF em amostras de águas superficiais no (RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018) enquanto que em Portugal a concentração variou de 11,9 e $15,5 \text{ ng.L}^{-1}$ em águas superficiais (PEREIRA *et al.*, 2017). Estes estudos sugerem que o LD e LQ propostos pelo método para o BZF são compatíveis com as concentrações verificadas no meio ambiente.

- **Estudo de estabilidade**

- ✓ **Estabilidade da amostra**

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade da amostra estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Determinação da estabilidade da amostra pré e pós-processamento.

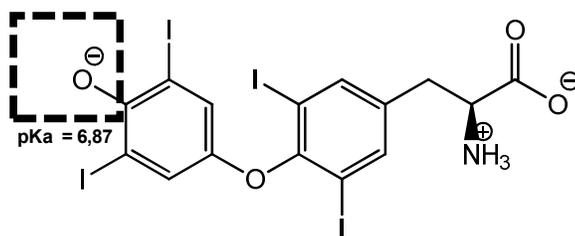
Compostos	Estabilidade pré-processamento	Estabilidade pós-processamento
	Em geladeira 8°C/ 7 dias (CV%*)	Freezer -20°C/ 1 mês(CV%*)
CAF		
Baixa ^a	7,7	3,0
Média ^b	9,9	7,5
Alta ^c	12,5	11,3
FLX		
Baixa ^a	2,31	16,3
Média ^b	1,2	3,2
Alta ^c	8,3	3,9
LVX		
Baixa ^a	103,8	115,0
Média ^b	120,7	106,7
Alta ^c	107,5	111,3
BZF		
Baixa ^a	14,5	14,8
Média ^b	4,7	10,3
Alta ^c	13,3	8,9

Legenda: CV%*= Coeficiente de Variação (%) determinado para triplicatas das concentrações avaliadas.

De acordo com a Tabela 14 as amostras que apresentaram um desvio inferior a 15% quando comparadas aquelas recém-preparadas foram consideradas estáveis, exceto para o limite inferior de quantificação (1 ng.L^{-1}) para o qual se permite valores inferiores a 20%. Os desvios superiores a 20% observados para a LVX poderia ser explicado pelo fato da mesma ser instável em pH baixo e tal fato facilitaria a degradação deste composto (ÁLVAREZ & MADRID & MARAZUELA, 2016).

O pH natural da amostra utilizada para a validação era igual a 6,7. Tal informação é relevante para a discussão dos elevados desvios observados após o estudo de estabilidade da amostra em geladeira (8°C) e freezer (-20 °C). Segundo Won (1992) em pH próximo de 7 a hidroxila do anel fenólico da levotiroxina sódica está ionizada. Na Figura 13 é representada a ionização do anel fenólico em pH ~7.

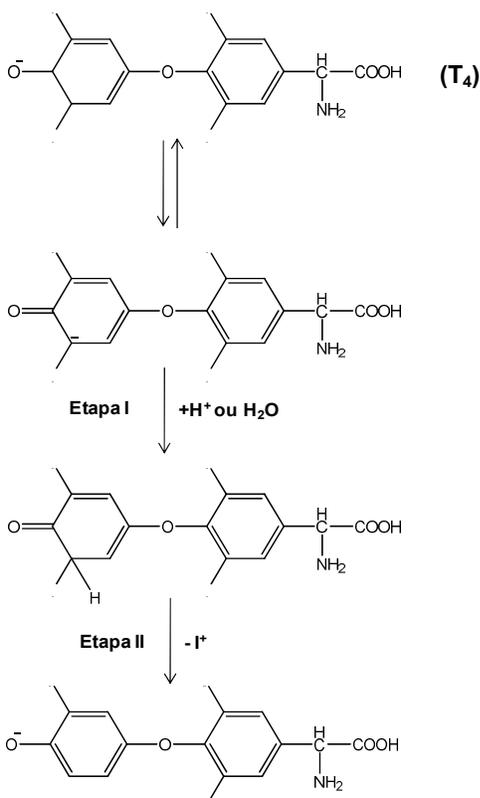
Figura 13. Representação da ionização da hidroxila fenólica em pH próximo de 7.



Fonte: Adaptado de WON, 1992.

A ionização do OH favorece a reação de desiodação desse composto em pH próximo de 7. Esta reação pode ser explicada por reações espontâneas ou catalisada pela água. Na Figura 14 são representadas as etapas da reação de desiodação da levotiroxina.

Figura 14. Etapas da reação de desiodação da levotiroxina em meio aquoso.



Fonte: WON, 1992.

Sendo assim os desvios observados foram elevados, pois durante o armazenamento a molécula de levotiroxina (T4) provavelmente reagiu com a água produzindo produtos de degradação, entre eles o T3, todavia essa molécula pode dar origem a outros compostos (WON, 1991). Tendo em vista o número de produtos de biotransformação oriundos da LVX, neste estudo optou-se apenas pela monitorização da forma inalterada. Por isso a estabilidade da LVX na amostra foi considerada fora dos padrões recomendados demonstrando que a mesma não é estável no pH monitorado e que provavelmente não seria detectada em condições ambientais. Entretanto, Svanfelt & Eriksson & Kronberg (2010) quantificaram LVX em amostras reais de esgoto.

✓ Estabilidade da solução mãe

Após 3 meses de armazenamento as soluções mãe foram analisadas e o resultado comparado com aquelas recém preparadas e analisadas. Os dados obtidos estão expressos na Tabela 14. Este estudo foi realizado para todos os analitos de interesse no método exceto para o PI.

Tabela 14. Determinação da estabilidade da solução mãe (1 mg.mL⁻¹)

Compostos	Estabilidade longa duração - Temperatura = - 20°C	
	Após 3 meses(CV%*)	
CAF	5,2	
FLX	11,8	
LVX	107,8	
BZF	14,5	

Legenda: CV%*= Coeficiente de Variação (%) determinado para triplicatas das concentrações avaliadas.

As soluções mãe de CAF, FLX e BZF foram consideradas estáveis, pois não se observou desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas. Já a solução de LVX não foi estável durante o armazenamento. Isto pode ter ocorrido, porque a LVX pode ter degradada.

✓ Estabilidade da solução estoque

Os resultados do estudo da estabilidade da solução estoque de CAF, FLX, LVX, BZF e PI (FLX-D6) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Determinação da estabilidade da solução estoque (C= 100 µg.mL⁻¹) em ensaios de ciclo congelamento/ descongelamento, curta e longa duração.

Compostos	Estabilidade curta duração (Temperatura = 25°C) (CV%*)		Estabilidade longa duração (Temperatura = - 20°C) (CV%*)		Estabilidade ciclo congelamento/ descongelamento (CV%*)
	2H	24H	1 mês	3 meses	
	CAF	7,4	8,3	9,9	
FLX	1,2	5,7	9,6	4,6	3,3
LVX	3,4	5,1	107,0	108,2	13,6
BZF	1,5	1,9	3,4	8,3	3,8
FLX-d6	0,9	1,6	8,3	3,7	3,6

Legenda: CV%*= Coeficiente de Variação (%) determinado para triplicatas das concentrações avaliadas.

As amostras foram consideradas estáveis, pois os desvios obtidos foram inferiores a 15% do valor das amostras recém-preparadas. Exceto para a LVX durante o estudo de

estabilidade de longa duração a temperatura de -20 °C. No qual os valores são superiores a 100%. Embora, a mesma possa ser considerada estável durante o tempo que permanece a temperatura ambiente e durante os ciclos de congelamento e descongelamento.

Após todas as etapas de validação o método proposto foi considerado validado de acordo com a RDC nº 166 da ANVISA, e dezessete amostras de água oriundas de oito mananciais do estado de São Paulo foram avaliadas utilizando-se esse método. Os resultados dessas análises estão apresentados no capítulo II dessa tese.

3.5. Conclusões do capítulo

Neste capítulo um método por LC-MS/MS foi desenvolvido e validado para a detecção de cafeína, fluoxetina, levotiroxina e bezafibrado em amostras ambientais de água, e a partir dos resultados conclui-se que:

- O modo de operação positivo do detector foi melhor para todos os analitos de interesse quando o metanol foi utilizado como componente orgânico de fase móvel.
- A ionização dos compostos foi mais eficaz quando a fase móvel composta por ACN:H₂O (70:30; v/v) a 0,1% de ácido de fórmico foi avaliada.
- Os parâmetros determinados para o espectrômetro de massas foram satisfatórios, pois foram gerados íons quantificadores e qualificadores para todos compostos avaliados.
- A acidificação da amostra influenciou a extração dos fármacos e o cartucho de extração utilizado foi considerado adequado, porque foram verificados bons valores de recuperação apesar das diferenças físico-químicas existentes entre os compostos analisados.
- A CAF, FLX e BZF atenderam a todos os parâmetros de validação segundo a RDC nº 166 da ANVISA.
- Os critérios de validação determinados para a LVX foram considerados adequados (RDC nº 166 da ANVISA), exceto pelo estudo de estabilidade da amostra (pré e pós-processamento) e da solução mãe e estoque (longa duração).
- A baixa estabilidade da LVX sugere que a mesma pode estar na forma de seus produtos de biotransformação/degradação no meio ambiente, entretanto o método proposto é capaz de detectar LVX na sua forma inalterada.

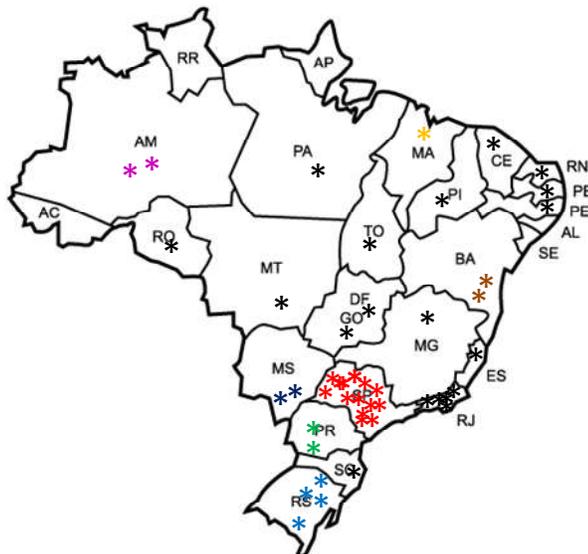
4. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM MANANCIAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

4.1. Panorama geral sobre a detecção de fármacos em mananciais no Brasil

Estudos que avaliam a presença de fármacos em águas superficiais são escassos no Brasil se comparado a países como EUA (FURLONG *et al.*, 2017; ELLIOTT & VANDERMEULEN, 2017; GLASSMEYER *et al.*, 2016), Espanha (BIEL-MAESO *et al.*, 2018; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; JURADO *et al.*, 2012), Itália (MEFFE & BUSTAMANTE, 2014), entre outros. Entretanto, alguns pesquisadores brasileiros têm se empenhado na construção de um panorama nacional sobre a qualidade da água (superficial, subterrânea, marinha e potável) acerca da presença de fármacos. Em 1999, Stumpf *et al.* publicaram a primeira pesquisa que detectou esses compostos em amostras ambientais no Brasil. Porém, apenas em 2016 foi realizado o primeiro levantamento nacional de fármacos e outros contaminantes em água potável e mananciais de 22 estados brasileiros (MACHADO *et al.*, 2016).

De modo geral, pesquisas que envolvem a detecção e quantificação de fármacos em águas ambientais no Brasil ocorrem majoritariamente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Tal fato pode ser justificado porque estes estados são populosos e possuem rios que atravessam cidades extremamente povoadas, como a Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). Além disso, nestas regiões do país estão localizadas as principais universidades e centros de pesquisas com infra-estrutura analítica adequada para a detecção e quantificação desses compostos no meio ambiente. Na Figura 15 é representado um mapa do Brasil no qual são evidenciadas as principais regiões onde foram desenvolvidos estudos publicados em revistas científicas com essa temática, além de alguns dos primeiros estudos desenvolvidos no país.

Figura 15. Estados brasileiros nos quais foi avaliada a presença de fármacos em amostras de águas potável, superficiais e marinhas. Os asteriscos (*) significam a quantidade de estudos referenciados por estado e Distrito Federal.



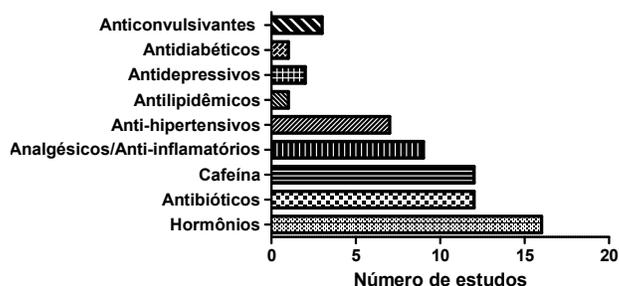
Fonte: LOPEZ-DOVAL *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016; AMÉRICO *et al.*, 2015; CAMPANHA *et al.*, 2015; DENADAI & CASS, 2015; TORRES *et al.*, 2015; CALDAS, 2014; CERQUEIRA *et al.*, 2014; JANK *et al.*, 2014; MACHADO, 2014; MELO & BRITO, 2014; MONTAGNER *et al.*, 2014 a; THOMAS *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; LISBOA *et al.*, 2013; JARDIM *et al.*, 2012; MONTAGNER & JARDIM, 2011; SODRÉ *et al.*, 2010; Sodr e & Locatelli & Jardim, 2010; GHISELLI & JARDIM, 2007; ALMEIDA & WEBER, 2005; FERREIRA, 2005; STUMPF *et al.*, 1999; TERNES *et al.* 1999.

Ao se observar a Figura 15 fica evidente que a região sudeste concentra a maior quantidade de pesquisas desenvolvidas na área, comprovando, assim, a necessidade de mais estudos para a constru o de um panorama nacional sobre a contamina o de  guas por f armacos.

- **Principais f armacos detectados em águas brasileiras**

Dentre as principais classes de contaminantes em águas brasileiras estão os anticonvulsivantes, hormônios, antidepressivos, antilipidêmicos, anti-hipertensivos, antiglicêmicos, analgésicos, anti-inflamatórios, antipiréticos, ansiolíticos e cafeína (QUADRA *et al.*, 2017). Na Figura 16 são apresentadas as principais classes farmacológicas pesquisadas no país, bem como o número de artigos publicados entre 1999 e 2017.

Figura 16. Principais classes farmacológicas detectadas em águas brasileiras.



Fonte: Adaptado de Quadra *et al.*, 2017

Pela análise da Figura 16 percebe-se que os hormônios foram os compostos mais avaliados entre os anos de 1999 e 2017, seguidos pela cafeína (CAF), antibióticos e analgésicos/anti-inflamatórios/antipiréticos. Dentre as classes farmacológicas menos pesquisadas estão os antilipidêmicos, antidiabéticos (antiglicêmicos) e antidepressivos.

O interesse pela detecção ambiental de hormônios ocorre principalmente porque esses compostos são considerados desreguladores endócrinos e podem causar danos sobre diferentes organismos (GLASSMEYER *et al.*, 2016). Enquanto que a preocupação com a presença de antibióticos no meio ambiente se deve principalmente pela sua relação com a resistência microbiana (KLATTE & SCHAEFER & HEMPEL, 2017; PHILIP *et al.*, 2017).

Já o interesse pela CAF se deve ao fato que esse composto trata-se de estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) bastante consumido em todo o mundo na forma de bebidas (café, chás, etc.), medicamentos e está presente na composição de algumas plantas. Além disso, ele tem sido utilizado como marcador de atividade antropogênica, por causa de sua relação com a disposição de efluentes na água e consequentemente com a presença de outros contaminantes. Montagner *et al.* (2014 b) averigaram que existe correlação entre CAF e atividade estrogênica de amostras ambientais de água. RODRÍGUEZ-GIL *et al.* (2018) compilaram informações sobre a distribuição mundial de CAF em diferentes matrizes e os autores verificaram que esse composto foi encontrado inclusive na água da chuva. E em regiões remotas do globo esse fármaco também foi determinado (GONZALEZ-ALONSO *et al.*, 2017). Tais informações justificam o grande número de pesquisas realizadas para essa molécula. Na Tabela 16 são apresentadas algumas informações e propriedades físico-químicas dos principais fármacos pesquisados no Brasil.

Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos principais fármacos pesquisados no Brasil.

Fármacos	Fórmula molecular	Número CAS	Log Kow ^a	Solub. em água 25°C (mg/L) ^b	Log Koa ^c	Log Koc ^d
Cafeína •	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	58-8-2	- 0,07*	2632	8,765	0,980
Antilipidêmicos						
Ácido clofibríco	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	882-09-7	2,57*	582,5	8,618	1,633
Bezafibrato•	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	25812-30-0	4,77	4,964	11,083	2,850
Gemfibrozil	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	41859-67-0	4,25	1,224	17,312	2,311
Anti-hipertensivos						
Clortalidona	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ O ₄ S	77-36-1	0,85*	1361	16,454	0,894
Diltiazem	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	42399-41-7	2,7	12,3	17,153	2,296
Furosemida	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	54-31-9	2,03*	149,3	15,823	1,397
Valsartana	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	137862-53-4	3,65	1,406	19,550	2,200
Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	29122-68-7	0,16*	685,2	16,412	0,611
Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	525-66-6	3,48*	228	13,966	2,451
Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	51384-51-1	1,88*	4777	13,122	1,475
Antidepressivos						
Citalopram	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	59729-33-8	3,74	31,09	12,699	3,230
Amitriptilina	C ₂₀ H ₂₃ N	50-48-6	4,92*	0,824	10,473	3,581
Buformina	C ₆ H ₁₅ N ₅	692-13-7	-0,05	7,808e+4	13,428	0,832
Fluoxetina•	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	54910-89-3	3,82*	60,28	9,259	3,050
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	79617-96-2	5,29	3,517	10,971	3,808
Venlafaxina	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	93413-69-5	2,28	266,7	12,359	2,318
Analgésicos, antitérmicos, antipiréticos e anti-inflamatórios						
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	103-90-2	0,46*	3,305e+4	11,041	1,321
Diclofenaco	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	15307-86-5	4,51*	4,518	14,224	2,607
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	22204-53-1	3,18*	144,9	11,038	1,971
Nimesulida	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	51803-78-2	2,60*	26,92	10,984	2,778
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	15687-27-1	3,97*	41,05	9,177	2,352
Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	69-72-7	2,26*	3808	8,783	1,537

(Continuação) Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos principais fármacos pesquisados no Brasil.

Hormônios						
17 α -etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	57-63-6	3,67*	116,4	13,159	2,710
17 β -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	50-28-2	4,01*	81,97	12,837	2,849
Estriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	50-27-1	2,45*	440,8	12,715	1,624
Estriol (E3)	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	104202-96-2	7,42	0,001	15,823	4,487
Estrone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	53-16-7	3,13*	146,8	10,939	3,019
Progesterona	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	57-83-0	3,87*	5,003	9,446	3,457
Testosterona	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	58-22-0	3,32*	67,76	10,161	2,546
Dietilestilbestrol	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	56-53-1	5,07*	3,321	14,695	4,063
Levonorgestrel	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	212-349-8	3,48	35,84	10,982	2,634
Mestranol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	72-33-3	4,68	3,498	11,414	3,158
Antifúngicos						
Florfenicol	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	73231-34-2	-0,04	5936	15,485	0,490
Cetonazol	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₄	65277-42-1	4,20	0,429	17,361	3,839
Mebendazol	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	31431-39-7	2,83*	50,08	16,849	3,002
Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	443-48-1	-0,02*	2,573e+4	9,141	1,120
Miconazol	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O	22916-47-8	6,25	0,011	13,249	4,834
Antibióticos						
Cefalexina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	15686-71-2	0,65*	1789	15,596	0,421
Amoxicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	26787-78-0	0,87*	3433	19,862	0,709
Norfloxacin	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	70458-96-7	-1,03*	1,779e+5	15,419	-0,392
Oxitetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	2058-46-0	-2,09	7,166e+4	22,897	-1,013
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	723-46-6	0,89*	3942	11,298	1,530
Triclosan	C ₁₂ H ₁₇ Cl ₃ O ₂	222-182-2	4,76*	4,621	11,450	3,925
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	212-006-2	0,91*	2334	12,920	1,896
Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	64-75-5	-1,36	4361	22,999	-0,161
Claritromicina	C ₃₈ H ₃₉ NO ₁₃	81103-11-9	3,16*	0,342	30,310	1,371
Ansiolíticos						
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	439-14-5	2,82*	58,78	9,647	2,438
Flurazepam	C ₂₁ H ₂₃ ClFN ₃ O	17617-23-1	3,02	9,582	12,716	2,483

(Continuação) Tabela 16. Propriedades físico-químicas dos principais fármacos pesquisados no Brasil.

Anticonvulsivantes						
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	298-46-4	2,45	17,66	10,805	2,227
Carbamazepina-epóxido	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	36507-30-9	0,95	276,8	11,503	1,307
Antidiabéticos/ antiglicêmicos						
Clorpropamida	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	94-20-2	2,27*	192,7	10,551	2,310
Glibenclamida	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	10238-21-8	4,79	0,063	21,300	3,173
Imunossuppressores						
Azatioprina	C ₉ H ₇ N ₇ O ₂ S	446-86-6	0,10*	272,3	13,067	2,395
Relaxante Muscular						
Carisoprodol	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	78-44-4	2,36	201	9,895	2,044
Anestésicos						
Lidocaína	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	137-58-6	2,44*	237,7	10,711	2,184
Anti-inflamatórios esteroidais						
Prednisona	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	53-03-2	1,46*	312	9,937	1,301
Análogos dos hormônios tireóideos						
Levotiroxina sódica●	C ₁₅ H ₁₀ I ₄ NO ₄ Na	25416-65-3	2,34	2,994	18,829	1,651

^aLogKow: coeficiente de partição octanol-água (KOWWIN v1.68); ^b Solubilidade em água estimada a partir do Log Kow (WSKOW v1.42); ^cLogKoa: coeficiente de partição octanol-ar (25 °C; KOAWIN v1.10); ^dLogKoc: coeficiente de adsorção (KOCWIN v2.00). *Dados experimentais; ●: fármacos de interesse nessa pesquisa.

Pela análise da Tabela 16 pode-se observar que o estriol (Kow= 7,42), dietilestilbestrol (Kow= 5,07), sertralina (Kow= 5,29) e triclosan (Kow= 4,76) estão entre os compostos que possuem coeficientes de partição octanol-água mais elevados. Esse parâmetro pode ser utilizado como um indicador de bioacumulação e persistência nos diferentes compartimentos ambientais (OECD, 2008).

Tendo em vista a diversidade dos fármacos pesquisados no país é de suma importância considerar os parâmetros que permitem estimar a permanência desses compostos nos diferentes compartimentos ambientais. Por esta razão, uma Tabela 17 foi confeccionada utilizando o *software* EPISuite™ da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Por meio desse programa foi possível determinar o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no ar, água, solo e sedimentos, bem como a remoção durante o tratamento de esgoto para os principais fármacos pesquisados no país. Todavia, não é recomendado o emprego de ferramentas *in silico* quando valores medidos aceitáveis estão disponíveis.

Uma vez que dados experimentais acerca da estabilidade da maior parte destes fármacos não foram encontrados na literatura, o software EPI (*Estimation Programs Interface*) Suite™ foi utilizado também para estimar seus tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) nos diferentes ambientes (água, ar, solo e sedimento), bem como sua remoção durante o tratamento de esgoto para os principais fármacos pesquisados no país. Esta plataforma, disponível no *website* da USEPA, baseia-se na fórmula estrutural dos compostos para prever suas propriedades físico-químicas e características como persistência, toxicidade e potencial de bioacumulação em ecossistemas.

A fórmula estrutural é alimentada por meio do SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), que é uma forma de representação de estruturas químicas, em uma linha contínua, usando caracteres suportados de teletipo ordinários comuns, como por exemplo, o código ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*). O SMILES, assim como o registro CAS (*Chemical Abstracts Service*), é um identificador único, que não pode gerar duas estruturas químicas diferentes. O EPISuite™ utiliza uma única entrada para executar os programas KOWWIN™, AOPWIN™, HENRYWIN™, MPBPWIN™, Biowin™, BioHCwin, KOCWIN™, WSKOWWIN™, WATERNT™, BCFBAF™, HydroWin™, KOAWIN e AEROWIN™ e os modelos de destino WVOLWIN™, STPWIN™, LEV3EPI™ e de toxicidade ECOSAR™,

Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.

Fármacos	Tempo de meia vida (t ½) (horas) ^a				Persistência Tempo (horas) ^a	Remoção durante o tratamento de esgoto (%) ^b			
	Ar	Água	Solo	Sedimento		Remoção total	Biodegradação total	Adsorção no sedimento (total)	Mitigação total Ar
Cafeína •	13,2	360	720	3,24e+3	639	1,85	0,09	1,76	0
Antilipidêmicos									
Ácido clofibríco	33,10	900	1,80e+3	8,10e+3	1,30e+3	3,31	0,10	3,21	0
Bezafibrato•	6,37	1,44e+3	2,88e+3	1,3e+3	2,68e+3	42,58	0,42	42,16	0
Gemfibrozil	3,12	900	1,80e+3	8,10e+3	1,38e+3	69,10	0,62	68,48	0
Anti-hipertensivos									
Clortalidona	25,9	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,79e+3	1,87	0,09	1,78	0
Diltiazem	1,42	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,90e+3	3,81	0,11	3,70	0
Furosemida	2,29	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,31e+3	2,27	0,10	2,18	0
Valsartana	6	360	720	3,24e+3	855	16,92	0,21	16,70	0
Atenolol	1,85	900	1,80e+3	8,10e+3	1,53e+3	1,85	0,09	1,76	0
Propranolol	0,83	360	720	3,24e+3	782	12,58	0,18	12,40	0
Metoprolol	1,75	900	1,80e+3	8,10e+3	1,63e+3	2,15	0,09	2,05	0

(Continuação) Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.

Antidepressivos									
Citalopram	2,79	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+4	9,08e+3	19,74	0,24	19,50	0
Amitriptilina	0,15	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	3,26e+3	75,01	0,66	74,35	0
Buformina	3,84	360	720	3,24e+3	775	1,85	0,09	1,76	0
Fluoxetina	6,96	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+3	2,96e+3	22,58	0,26	22,31	0
Sertralina	26,10	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	3,33e+3	84,99	0,73	84,26	0
Analgésicos, antitérmicos, antipiréticos e anti-inflamatórios									
Paracetamol	14,50	360	720	3,24e+3	714	1,86	0,09	1,77	0
Diclofenaco	1,56	900	1,80e+3	8,10e+3	1,79e+3	56,55	0,53	56,03	0
Naproxeno	2,22	360	720	3,24e+3	758	7,55	0,14	7,41	0
Nimesulida	25,40	900	1,80e+3	8,10e+3	1,80e+3	3,41	0,11	3,31	0
Ibuprofeno	21,70	360	720	3,24e+3	554	28,72	0,31	28,40	0.01
Ácido salicílico	19,70	360	720	3,24e+3	646	2,57	0,10	2,47	0
Hormônios									
17 α -etinilestradiol	2,05	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	3,52e+3	17,51	0,22	17,29	0
17 β -estradiol	2,09	900	1,80e+3	8,10e+3	2,01e+3	30,52	0,32	30,20	0
Estriol	2	900	1,80e+3	8,10e+3	1,57e+3	2,96	0,10	2,86	0

(Continuação) Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.

Estrona	2,04	900	1,80e+3	8,10e+3	2,05e+3	6,96	0,13	6,83	0
Estrona (E1)									0
Progesterona	2,24	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,90e+3	24,50	0,28	24,22	0
Testosterona	2,18	900	1,80e+3	8,10e+3	1,35e+3	9,54	0,16	9,39	0
Dietilstilbestrol	0,03	900	1,80e+3	8,10e+3	2,90e+3	79,80	0,69	79,11	0
Levonorgestrel	1,41	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,98e+3	12,58	0,18	12,40	0
Mestranol	2,84	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,38e+3	65,05	0,59	64,46	0
Antifúngicos									
Fluconazol	15,30	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,04e+3	1,85	0,09	1,76	0
Cetozolazol	9,73	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	5,52e+3	39,94	0,40	39,54	0
Mebendazol	1,89	900	1,80e+3	8,10e+3	1,87e+3	4,48	0,11	4,37	0
Metronidazol	27,60	900	1,80e+3	8,10e+3	1,20e+3	1,85	0,09	1,76	0
Miconazol	4,3	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+3	1e+4	92,97	0,77	92,20	0
Antibióticos									
Cefalexina	1,16	900	1,80e+3	8,10e+3	1,61e+3	1,86	0,09	1,77	0
Amoxicilina	1,85	900	1,80e+3	8,10e+3	1,62e+3	1,88	0,09	1,78	0

(Continuação) Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.

Norfloxacino	0,79	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,60e+3	1,85	0,09	1,75	0
Oxitetraciclina	0,54	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,14e+3	1,85	0,09	1,75	0
Sulfametoxazol	1,28	900	1,80e+3	8,10e+3	1,74e+3	1,88	0,09	1,79	0
Triclosan	15,90	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,85e+3	68,67	0,61	68,06	0
Trimetoprim	1,26	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,77e+3	1,88	0,09	1,79	0
Tetraciclina	0,55	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,93e+3	1,85	0,09	1,75	0
Claritromicina	0,65	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+4	4,94e+3	7,30	0,14	7,17	0
Ansiolíticos									
Diazepam	25,9	900	1,80e+3	8,10e+3	1,88e+3	4,42	0,11	4,31	0
Flurazepam	2,40	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+4	1,07e+4	5,86	0,13	5,74	0
Anticonvulsivantes									
Carbamazepina	0,81	900	1,80e+3	8,10e+3	1,80e+3	2,96	0,10	2,86	0
Carbamazepina-epóxido	8,16	900	1,80e+3	8,10e+3	1,76e+3	1,88	0,09	1,79	0

(Continuação) Tabela 17. Parâmetros de fugacidade dos principais fármacos pesquisados no país.

Antidiabéticos/ antiglicêmicos									
Clorpropamida	30,90	900	1,80e+3	8,10e+3	1,69e+3	2,59	0,10	2,49	0
Glibenclamida	6,41	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+4	7,65e+3	69,95	0,62	69,33	0
Imunossuppressores									
Azatioprina	1,27	900	1,80e+3	8,10e+3	1,84e+3	1,85	0,09	1,76	0
Relaxante Muscular									
Carisoprodol	7,50	900	1,80e+3	8,10e+3	1,78e+3	2,76	0,10	2,66	0
Anestésicos									
Lidocaína	2,35	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	2,67e+3	2,94	0,10	2,84	0
Anti-inflamatórios esteroidais									
Prednisona	3,20	1,44e+3	2,88e+3	1,30e+4	1,43e+3	1,96	0,09	1,87	0
Análogos dos hormônios tireóidanos									
Levotiroxina sódica●	8,18	4,32e+3	8,64e+3	3,89e+4	5,48e+3	2,71	0,10	2,62	0

Legenda: ● = Fármacos de interesse nessa pesquisa.

De acordo com a Tabela 17 a glibenclamida, flurazepam, claritromicina, citalopram e furosemida estão entre os fármacos com os maiores $t_{1/2}$ na água, solo e sedimento. Contudo outros compostos apresentam $t_{1/2}$ elevados no solo (17 α -etinilestradiol, 17 β -etinilestradiol, progesterona, levonorgestrel, mestranol, sertralina, amitriptilina e venlafaxia, e, dentre os anti-inflamatórios, a nimesulida é o que apresenta o maior valor) e sedimento (prednisona, lidocaína, carisoprodol, carbamazepina, entre outros).

Muitos dos compostos pesquisados no Brasil estão entre aqueles preconizados pela União Européia (*European Union* - EU) para o monitoramento de fármacos na água de abastecimento público. Entre essas substâncias estão os hormônios e antibióticos (EU, 2013).

Os hormônios são os compostos mais pesquisados no Brasil e no mundo, pois permanecem no meio ambiente e são capazes de interferir sobre o sistema endócrino, sendo considerados desreguladores endócrinos (GLASSMEYER *et al.*, 2016). Há evidências (eco) toxicológicas que estes compostos causem efeitos sobre inúmeros seres vivos, como peixes, algas, moluscos, bivalves entre outros (ADEEL *et al.*, 2017). Dos hormônios e fitormônios mais pesquisados no país estão: 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estriol, estrona, progesterona, testosterona, dietilestilbestrol, levonorgestrel e mestranol (CAMPANHA *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2014; MONTAGNER *et al.*, 2014 a; JARDIM *et al.*, 2012; MONTAGNER & JARDIM, 2011; SODRE *et al.*, 2010 b; TERNES *et al.* 1999).

Os antibióticos merecem destaque entre os fármacos que devem ser monitorados, pois a presença deles no meio ambiente pode estar associada ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes. Com isso, estima-se que daqui a alguns anos não haverá mais antibióticos capazes de tratar infecções causadas por essas super bactérias (KLATTE & SCHAEFER & HEMPEL, 2017; PHILIP *et al.*, 2017). Jank *et al.* (2014) detectaram sulfametoxazol (376 e 572 ng.L⁻¹), trimetoprim (27 a 94 ng.L⁻¹), azitromicina (24 a 40 ng.L⁻¹), ciprofloxacino (16 a 66 ng.L⁻¹) e norfloxacino (30 a 54 ng.L⁻¹) no Arroio Dilúvio, principal curso d'água de Porto Alegre/Rio Grande do Sul. Enquanto que Montagner *et al.* (2014 a) avaliaram a presença de triclosan em 71 amostras de águas oriundas de Rio Preto, dos rios Atibaia, Capivari, Sorocaba e Cotia, e do reservatório e Tanque Grande em Guarulhos (MONTAGNER *et al.*, 2014 a; JANK *et al.*, 2014) evidenciando que estes compostos estão presentes nos mananciais brasileiros.

Os analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos, assim como a cafeína (que é um estimulante do Sistema Nervoso Central) , também foram foco de inúmeros estudos (PEREIRA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2016; CAMPANHA *et al.*, 2015; AMÉRICO *et al.*, 2015; THOMAS *et al.*, 2014; MONTAGNER & JARDIM, 2011; SODRÉ & LOCATELLI & JARDIM, 2010; GHISELLI & JARDIM, 2007; ALMEIDA & WEBER, 2005; FERREIRA, 2005). Entretanto, poucos deles investigaram a presença de antilipidêmicos e antidepressivos em águas brasileiras.

Thomas *et al.* (2014) avaliaram a presença de amitriplina, citalopram e sertralina em amostras de água do rio Negro (Amazonas) (THOMAS *et al.*, 2014). Tais resultados sugerem que outros mananciais no país possam estar contaminados com esses ou outros antidepressivos como a fluoxetina. Lorz *et al.* (2012) investigaram a presença de FLX no lago Paranoá/DF, entretanto os autores não detectaram esse composto. Dentre os antilipidêmicos pesquisados estavam o gemfibrozil (CERQUEIRA *et al.*, 2014), ácido clofibrato e bezafibrato (STUMPF *et al.*, 1999). Embora existam pesquisas que detectaram antilipidêmicos em águas brasileiras mais estudos são necessários para verificar o quão impactados estão os mananciais no Brasil por esses fármacos.

Outra classe farmacológica que merece destaque e que ainda não foi monitorada em mananciais do país são os análogos dos hormônios tireoidianos, sendo estes representados, principalmente, pelo fármaco levotiroxina sódica (LVX). Dados sobre a monitorização ambiental desse composto e de seus produtos de degradação/biotransformação são escassos. Svanfelt & Eriksson & Kronberg (2010) verificaram a presença da LVX em esgoto. E esse foi o único estudo encontrado que quantificou LVX em amostras ambientais (esgoto). Segundo Dong *et al.* (2013), a LVX merece destaque em termos de risco ambiental, pois obteve escores elevados de prioridade para toxicidade a humanos e animais.

4.2. Detecção de fármacos em águas superficiais do Estado de São Paulo

Segundo o glossário hidrológico internacional “águas superficiais são todas as águas que escoam ou se acumulam na superfície do solo, como os rios, riachos, lagos, lagoas e pântanos”. Embora, as águas dos mares não estejam explicitamente compreendidas na definição da Organização Meteorológica Mundial (*World Meteorological Organization* – WMO) entende-se que as mesmas façam parte dessa definição (WMO, 2012), pois,

segundo o mesmo documento, águas superficiais podem diferir quanto à salinidade, sendo classificadas como águas doce, salobra e salgada.

- **Detecção de fármacos em águas salgadas**

A maioria dos estudos realizados no Brasil e no mundo detectou fármacos em amostras de água doce. Entretanto, Pereira *et al.* (2016) averiguaram a presença de atenolol, paracetamol, cafeína, losartana, valsartana, diclofenaco e ibuprofeno na região da baía de Santos/SP - Brasil. Sendo esta a única fonte encontrada na literatura que avalia a presença de fármacos em amostras de água do mar no estado de São Paulo.

- **Detecção de fármacos em águas doce**

Chama-se água doce a água com uma salinidade próxima de zero, por oposição à água do mar (que tem geralmente uma salinidade próxima de 35 gramas de sais dissolvidos por litro) (WMO, 2012). As águas dos rios, lagos e a maioria dos lençóis subterrâneos são água doce. A quantificação de fármacos em águas superficiais no Brasil e no mundo tem sido realizada principalmente em rios, pois em muitos locais são os receptores finais de efluentes (domésticos e industriais), tratados ou não, e porque muitos rios são utilizados para o abastecimento público. Os principais mananciais de água doce em que foram detectados fármacos no estado de São Paulo estão apresentados na Tabela 18. A tabela foi construída com base em artigos publicados em revistas científicas indexadas nas bases de dados Web of Science® e Scopus®.

Tabela 18. Principais mananciais de água doce em que foram detectados fármacos no estado de São Paulo.

Compostos	Tipo de água	Manancial d'água	Local (cidade/estado)	Referência
Hormônios	Águas superficiais	Rio Piracicaba	Estado de São Paulo	TORRES <i>et al.</i> , 2015
Hormônios e plastificantes	Águas superficiais	Reservatório Tanque Grande Rio Atibaia Rio Sorocaba Rio Cotia	Guarulhos/SP Campinas/SP e Atibaia/SP Cerquilha/SP Barueri/SP	JARDIM <i>et al.</i> , 2012
Cafeína, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, carbamazepina, atenolol, propranolol, triclosan e hormônios	Águas superficiais	Rio Monjolinho	São Carlos/ SP	CAMPANHA <i>et al.</i> , 2015
Hormônios e plastificantes	Águas superficiais	Bacia do Rio Atibaia	São Paulo	SODRÉ <i>et al.</i> , 2010(a)
Triclosan e cafeína	Águas superficiais	Rio Rio Preto Rio Atibaia Rio Atibaia Rio Capivari Rio Sorocaba Rio Cotia Reservatório Tanque Grande.	São José do Rio Preto/SP Atibaia/SP Campinas/SP Campinas/SP Cerquilha/SP Barueri/SP Guarulhos/SP	MONTAGNER <i>et al.</i> , 2014 a.
Antibióticos	Águas superficiais	Rio Monjolinho	São Carlos/SP	DENADAI& CASS, 2015
Diazepam, paracetamol, ibuprofeno, buformin, atenolol e bezafibrato	Águas superficiais	Reservatório Billings	Estado de São Paulo	ALMEIDA & WEBER, 2005
Antibióticos	Águas superficiais	Rio Atibaia	Estado de São Paulo	LOCATELLI & JARDIM, 2011
Antibióticos	Águas superficiais	Reservatório Ilha Solteira	Ilha Solteira/SP	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2016
Desreguladores endócrinos, diclofenaco, cafeína, triclosaneagrotóxicos.	Águas superficiais	Reservatório Guarapiranga	São Paulo/SP	LÓPEZ-DOVAL <i>et al.</i> , 2017

Observando-se a tabela acima percebe-se um predomínio da detecção de fármacos no rio Atibaia seguida pela detecção no rio Sorocaba.

4.3. Critérios para a definição de CAF, FLX, LVX e BZF como fármacos desse estudo

A definição dos fármacos dessa pesquisa levou em consideração suas características físico-químicas, consumo e efeitos ecotoxicológicos.

- **Cafeína**

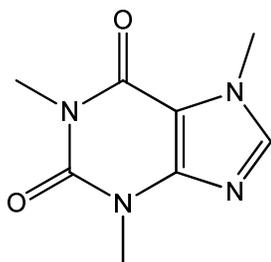
A cafeína é uma trimetilxantina, classificada como um estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo um antagonista competitivo dos receptores de adenosina. Esses receptores estão localizados em neurônios noradrenérgicos pré-sinápticos e, ao serem ativados pela adenosina, inibem a liberação da noradrenalina em sinapses no SNC. O efeito antagonista que a CAF produz é não inibir a liberação de noradrenalina – tal ação é a responsável pelos efeitos estimulantes desse composto (RANG *et al.*, 2016). A cafeína e seus metabólitos são excretados principalmente pelos rins e a concentração desses compostos na urina de indivíduos adultos é $\geq 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (RYBAK *et al.*, 2014).

- ✓ Características físico-químicas e presença no meio ambiente

A cafeína (IUPAC: 1,3,7-trimethyl-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010) é uma trimetilxantina, classificada como um estimulante do SNC, sendo um antagonista competitivo dos receptores de adenosina. Esses receptores se localizam em neurônios noradrenérgicos pré-sinápticos e ao serem ativados pela adenosina inibem a liberação da noradrenalina em sinapses no SNC. O efeito antagonista que a CAF produz é não inibir a liberação de noradrenalina, tal ação é a responsável pelos efeitos estimulantes desse composto (RANG *et al.*, 2016). A cafeína e seus metabólitos são excretados principalmente pelos rins e a concentração desses compostos na urina de indivíduos adultos é $\geq 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (RYBAK *et al.*, 2014).

No meio ambiente pode ser detectada na forma inalterada ou como seu principal produto de biotransformação a paraxantina (RODRÍGUEZ-GIL *et al.*, 2018). A CAF é uma base fraca, o pKa de sua amina é de 8,3, e sua massa molar de 194,2 g/mol. Na Figura 17 a fórmula estrutural desse composto é apresentada.

Figura 17. Fórmula estrutural da Cafeína.



Conforme pode ser observados nas Tabelas 18 e 19, dentre os fármacos avaliados neste estudo, a CAF é o composto que apresenta os menores valores de K_{ow} e $t_{1/2}$, sendo o composto de maior solubilidade em água. Estudos apontam a detecção de CAF no meio ambiente em concentrações bastante elevadas (na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$) (GONZÁLEZ-ALONSO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2016; LUQUE-ESPINAR *et al.*, 2015; CAMPANHA *et al.*, 2015). Alguns pesquisadores sugerem que a CAF seja utilizada como um marcador de atividade antropogênica (PAÍGA & DELERUE-MATOS, 2017; CANTWELL *et al.*, 2016; NODLER *et al.*, 2016; MONTAGNER b *et al.*, 2014; KURISSERY *et al.*, 2012), pois a mesma está presente em inúmeros produtos consumidos pelo homem, como café, chás, medicamentos, entre outros (MONTAGNER *et al.*, 2014 b).

✓ Consumo

Segundo a Organização Internacional de Café (OIC) as três regiões do globo que mais consumiram café em 2014 foram a União Europeia, EUA e Brasil, com um consumo de 41.648, 23.761 e 20.771 sacas, respectivamente (OIC, 2014). A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) divulgou que o consumo de café em kg/habitante/ano foi de 6,12 kg de café verde em grão, o equivalente a 81 L/habitante/ano entre novembro/2013 e outubro/2014. Tais dados evidenciam o maciço consumo de café, principalmente na forma de bebida, no Brasil (OIC, 2014).

✓ Efeitos ecotoxicológicos

Em termos ecotoxicológicos alguns autores sugerem que a CAF não causa danos significativos nas espécies aquáticas e em seres humanos na faixa de detecção ambiental, entretanto é relevante apresentar alguns desses estudos. Zarrelli *et al.* (2014) investigaram a exposição aguda e crônica da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* a

CAF e a CL_{50} após 24h e 48h de exposição foi de 1018 $mg.L^{-1}$ e 104 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Em outro estudo foi verificado que a CAF potencializou os efeitos inflamatórios induzidos pelo cobre em larvas de *zebrafish*, mostrando o impacto sobre o bloqueio dos receptores de adenosina (CRUZ *et al.*, 2017).

Capolupo *et al.* (2016) avaliaram os efeitos sub-letais decorrentes da exposição do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* a três concentrações ambientais de CAF (5, 50 e 500 $ng.L^{-1}$) durante 7 dias. Nesta pesquisa, os autores verificaram que a CAF causou um leve estresse no organismo, porém, devido à sua elevada solubilidade em água e baixo valor de Log Kow, o mesmo não se bioacumulou nos mexilhões. Pires *et al.* (2016) verificaram a exposição do anelídeo *Diopatra neapolitana* a três diferentes concentrações de CAF (0,5; 3,0 e 18,0 $\mu g.L^{-1}$) e os pesquisadores constataram que quanto maior a concentração de CAF, menor era a capacidade e velocidade de regeneração dos segmentos dos organismos.

Rodríguez-Gil *et al.* (2018) realizaram uma análise probabilística da distribuição e exposição global à CAF e também determinaram a avaliação de risco para humanos. Segundo o estudo, a CAF não oferece risco significativo para saúde de humanos a partir da exposição por meio de água potável ou subterrânea contaminadas. Embora os dados sobre os efeitos ecotoxicológicos causados pela CAF ainda sejam inconclusivos, este xenobiótico de origem antropogênica tem sido amplamente detectado em diferentes ecossistemas.

- **Fluoxetina**

A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e, por potencializar os efeitos serotoninérgicos (RANG *et al.*, 2016), é amplamente utilizada no tratamento da depressão. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a depressão acomete mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2017).

Entre as opções de tratamento medicamentoso estão os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, clomipramina, imipramina, maprotilina, nortriptilina), inibidores da recaptação da serotonina (citalopram, fluoxetina, norfluoxetina, fluvoxamina, paroxetina e sertralina), inibidores da monoaminoxidase (MAO) (moclobemida e tranilcipromina), inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da noradrenalina (venlafaxina e duloxetina), entre outros (bupropiona, etc). No Brasil, os medicamentos dispensados pelo Serviço Único de Saúde para o tratamento da depressão são: cloridrato

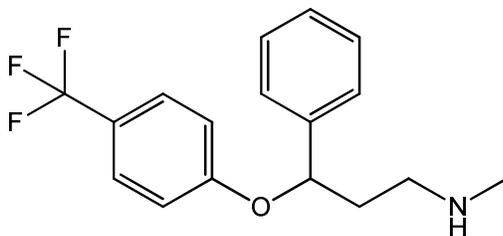
de fluoxetina, cloridrato de clorpromazina, cloridrato de bupropiona, cloridrato de amitriptilina, etc (RENAME, 2017).

Em humanos, a biotransformação da FLX ocorre no fígado, sendo seu principal e único metabólito farmacologicamente ativo a norfluoxetina. A eliminação é predominantemente renal, sendo cerca de 80% excretado na urina, principalmente na forma de fluoxetina (11,6%), fluoxetina-glicuronídeo (7,4%), norfluoxetina (6,8%), norfluoxetina-glicuronídeo (8,2%), entre outros; e aproximadamente 15% são excretados pelas fezes (RANG *et al.*, 2016).

✓ Características físico-químicas e presença no meio ambiente

A FLX (3RS) *N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]-propan-1-amina) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010), é um composto básico e a amina ionizável possui pka igual a 9,8 e no meio ambiente pode ser encontrada na sua forma inalterada ou na forma de norfluoxetina (seu principal produto de biotransformação) (ZENKER *et al.*, 2014). Na Figura 18 a fórmula estrutural da FLX é apresentada.

Figura 18. Fórmula estrutural da Fluoxetina.



A fluoxetina tem sido detectada em amostras ambientais como esgoto (RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2015; AFONSO-OLIVARES & SOSA-FERRERA & SANTANA-RODRÍGUEZ, 2012; GRABIC *et al.*, 2012) e águas superficiais (RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018; GIEBUŁTOWICZ & NAŁĘCZ-JAWECKI, 2014; YU & LI & ZHANG, 2012; GROS & RODRÍGUEZ-MOZAZ & BARCELÓ, 2012). Esse composto pode se bioacumular nos diferentes compartimentos ambientais incluindo microrganismos e animais (PUCKOWSKI *et al.*, 2016). Uma das maneiras de determinar a afinidade de um composto por um organismo vivo é pelo Fator de Bioconcentração, do inglês *Bioconcentration Factor* (BCF). Ding *et al.* (2017)

determinaram o (BCF) em *Daphnia magna* e o valor encontrado para variou entre 460 e 174,4 L.kg⁻¹.

✓ Consumo

O consumo mundial de FLX se elevou muito nas duas últimas décadas e, segundo a *IMS Health* do Brasil, em 2016, a venda de antidepressivos e estabilizadores de humor aumentou 18,2% no país. Em termos financeiros as vendas desses medicamentos movimentaram mais de 3,4 bilhões de reais, sendo o segundo setor que mais lucrou naquele ano. Com base no último relatório da ANVISA sobre o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) pode-se inferir que no município de São Paulo foram consumidos aproximadamente 0,72 t de FLX durante o ano de 2011 (ANVISA, 2012) e estudos nacionais apresentam a FLX como um dos medicamentos mais dispensados pelo Sistema Único de Saúde – SUS (CAMPOS & AFONSO & ROEWER, 2017; ASSINI *et al.*, 2016).

✓ Efeitos ecotoxicológicos

A serotonina é conservada em todos os filós animais, e os processos fisiológicos regulados por ela são diferentes entre as espécies. Enquanto que para os invertebrados a serotonina regula processos somáticos e funções reprodutivas, em bivalves, por exemplo, ela regula processos reprodutivos como desova, maturação do oocisto e rompimento da vesícula germinativa (FONG *et al.*, 1998). Tais informações sugerem que a presença de FLX em ambientes aquáticos pode causar danos ecotoxicológicos a diversos seres vivos.

Alguns estudos ecológicos têm avaliado a ação da FLX sobre diferentes organismos. Ding *et al.* (2017) verificaram que a FLX pode causar alterações fisiológicas e bioquímicas em *Daphnia magna*. Já em peixes da espécie *Poecilia reticulata* foi observada alteração do comportamento predador quando os animais foram expostos a concentrações ambientais de FLX 4 ng.L⁻¹ a 16 ng.L⁻¹ (SAARISTO *et al.*, 2017). Em outro estudo, Amy-Sagers & Reinhard & Larson (2017) verificaram que a FLX diminuiu significativamente o crescimento radicular da planta aquática *Lemna minor*, e reduziu a taxa de crescimento e reprodução assexuada diária quando a concentração de 98 µg.L⁻¹ de FLX foi utilizada.

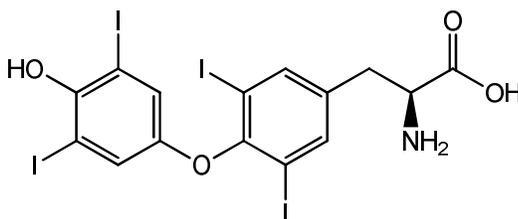
Johnson *et al.* (2007) determinaram a CE₅₀ (concentração efetiva que causa efeito a 50% dos organismos-teste) *in silico* de FLX em algas por meio do *software* US EPA ECOSAR e o valor empírico definido foi de 0,84 mg.L⁻¹. Já quando os valores foram

determinados experimentalmente, após 96 h de exposição das algas ao fármaco, obteve-se uma CI_{50} (Concentração Inibitória) de aproximadamente $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, e para as demais espécies analisadas os valores das CI_{50} foram iguais a $91,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Scenedesmus acutus*, $213 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Scenedesmus quadricauda* e $4339,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Chlorella vulgaris*

- **Levotiroxina**

A levotiroxina é um análogo do hormônio tireoídiano T4 (Tiroxina), sendo consumida na forma de levotiroxina sódica (propionato (2S)-2-amino-3-[4-(4-hidróxi-3,5-diiodofenóxi)3,5-diiodofenil] propionato (EUROPEAN PHARMA COPIEIA, 2010). A molécula apresenta alguns grupamentos ionizáveis sendo o pka do ácido carboxílico igual a 0,27 e da amina igual a 9,43, sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 19.

Figura 19. Fórmula estrutural da levotiroxina.



Esse composto é indicado para o tratamento de hipotireoidismo e seu mecanismo de ação é igual ao hormônio tireoídiano T4. Uma vez administrado, este análogo da tiroxina se liga as proteínas plasmáticas e se distribui nos tecidos periféricos, onde é convertido a 3,5,3- triiodo-L-tironina (T3) através da ação de deiodinases teciduais. (RANG *et al.*, 2016). T4 é convertido a T3 nos rins e no fígado por meio da desiodação da hidroxila fenólica levando a formação de 3,3, 5 – triiodotironina (r-T3). A desiodação do T3 e r-T3 dá origem a 3,5-diiodotironina (3,5-T2) e 3,3-diiodotironina (3,3-T2) (SVANFELT & ERIKSSON, & KRONBERG, 2010).

- ✓ Características físico-químicas e presença no meio ambiente

Observando-se a Tabela 19 a LVX apresenta os maiores valores para o $t_{1/2}$ em ar, água, sedimento e solo. Zenker *et al.* (2014) discutem a influência do pH do meio sobre

a bioacumulação de fármacos no meio ambiente e indicam que a variabilidade do pH das águas superficiais pode introduzir incertezas sobre as avaliações de riscos ecológicos, uma vez que muitos fármacos são compostos ionizáveis.

A levotiroxina pode ser encontrada no meio ambiente na sua forma intacta, porém, seus produtos de biotransformação também podem ser facilmente encontrados (SVANFELT & ERIKSSON, & KRONBERG, 2010). Isso porque a LVX é sensível a variações de pH. Sendo que valores de pHs abaixo ou acima de 7 (ou ainda, meios ácidos e básicos) favorecem as reações de desiodação desse composto (Won, 1991). Svanfelt & Eriksson & Kronberg, (2010) encontraram LVX no esgoto bruto e tratado (64 ng L⁻¹ e 22 ng L⁻¹). Entretanto, os produtos de biotransformação da LVX são bioativos. Papavasiliou *et al.* (1977) verificaram que os produtos de biotransformação r-T3 e 3,3-T2 também possuem efeito estimulante sobre a tireoide.

✓ Consumo

Segundo o Departamento de Tireóide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (2014) o hipotireoidismo acomete de 8 a 10% da população brasileira, sendo mais comum em mulheres após a menopausa e idosos. O tratamento medicamentoso indicado é realizado com levotiroxina sódica. Em 2016 foram movimentados mais de 172,6 milhões de reais na compra de Puran T4[®] (um dos nomes comerciais da levotiroxina sódica) (INTERFARMA, 2017). No Brasil, um levantamento da prevalência de hipotireoidismo em uma população de 1.085 indivíduos foi realizado na região metropolitana de São Paulo e o valor obtido foi de 8,0% do número amostrado (CAMARGO *et al.*, 2008).

✓ Efeitos ecotoxicológicos

Estudos que avaliem a ecotoxicidade da levotiroxina sódica ainda são escassos. Há indicações, no entanto, de que esse fármaco atue como desregulador da tireóide, interferindo principalmente na secreção e transporte desse hormônio, bem como na sua concentração e resposta celular (WEGNER, BROW & DIX, 2016). Entre os compostos desreguladores da tireoide estão as bifenilas policloradas (PCB's), retardantes de chama, tetrabromobisfenol A, percloratos, alquilfenóis e levotiroxina sódica (T4) (JEAN-CLAUDE & AMIARD-TRIQUET, 2015).

Wegner & Browne & Dix (2016) verificaram que esse composto causou efeitos significativos na metamorfose de anfíbios e promoveu alterações na maturação sexual de ratos machos e fêmeas. Jomaa *et al.* (2014) investigaram a embriotoxicidade em peixes, *zebrafish*, expostos a compostos bioativos da tireoide, entre eles a triiodotironina (T3). Este hormônio se origina a partir de T4 e também é um dos produtos de degradação da LVX. Os autores observaram mudanças no desenvolvimento do animal, sendo T3 o composto que causou os maiores danos. Os *endpoints* foram: alteração na cor e brilho das escamas, batida e natação deslizante, e a reabsorção do saco vitelínico

Embora os efeitos da LVX sobre humanos ainda sejam incertos, Dong *et al.* (2013) encontraram escores elevados de toxicidade ao realizarem a avaliação de risco para humanos.

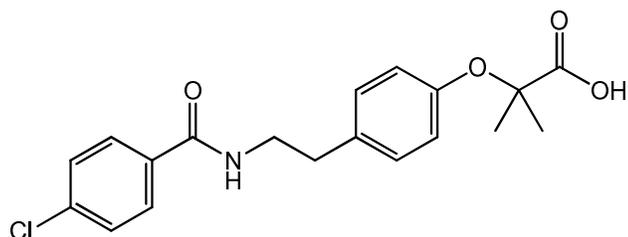
- **Bezafibrato**

O bezafibrato (BZF) reduz os níveis das lipoproteínas de baixa densidade (LDL e VLDL), enquanto aumenta os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL). Isto porque ele estimula a atividade das lipases lipoprotéicas e lipases hepáticas envolvidas no catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. A excreção ocorre principalmente por via renal, 50% da dose administrada é excretada na urina em sua forma inalterada e 20% na forma de glicuronídeos (RANG *et al.*, 2016).

- ✓ Características físico-químicas e presença no meio ambiente

O BZF é o ácido 2-[4-[2-[(4-clorobenzoil)amino]etil]fenóxi]-2-metilpropanoico (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010) e o pka do ácido carboxílico e da amina secundárias são iguais a 3,83 e -0,87, respectivamente. Na Figura 20 pode-se observar a fórmula estrutural desse composto.

Figura 20. Fórmula estrutural dado bezafibrato.



O BZF é comumente encontrado no meio ambiente na sua forma inalterada, pois uma boa parte da dose administrada é excretada dessa maneira (SUI *et al.*, 2017). Esse fármaco também tem sido determinado em amostras ambientais em todo o mundo (RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2015; GROS & RODRÍGUEZ-MOZAZ & BARCELÓ, 2012; GRABIC *et al.*, 2012; STUMPF *et al.*, 1999), principalmente em sua forma inalterada. Cermola *et al.* (2005) verificaram que o BZF é relativamente estável em efluentes de estações de tratamento de esgoto.

✓ Consumo

O BZF é amplamente utilizado em todo mundo. E na Inglaterra Sebastine & Wakeman (2003) publicaram que esse medicamento ocupava o 40º lugar na lista dos fármacos mais dispensados no país, com um consumo de 8,38 t naquele período.

✓ Efeitos ecotoxicológicos

Quando os efeitos ecotoxicológicos causados pelo BZF foram investigados em machos de *zebrafish* (*Daniorerio*), Velasco-Santamaría *et al.* (2011) observaram degeneração testicular após exposição dos peixes ao fármaco. Além disso, o BZF causou seu efeito sobre a esteroidogênese gonadal e espermatogênese do animal e exerceu um efeito hipocolesterolêmico. Tais efeitos tornam o composto um potencial desregulador endócrino (VELASCO-SANTAMARÍA *et al.*, 2011).

Nica & Villa & Finizio (2016) verificaram a inibição da bioluminescência do *Aliivibrio fischerie* quando exposto ao BZF, e os valores de CI_{50} e CI_{10} foram iguais a 150,7 $mg.L^{-1}$ e 15,2 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Afonso-Olivares & Sosa-Ferrera & Santana-Rodríguez (2017) avaliaram o risco ambiental produzido pela presença de BZF em água sobre espécies aquáticas. Com base na determinação do quociente de risco (QR), que é determinado pela razão entre exposição e dose de referencia (BRILHANTE & CALDAS, 1999) os autores encontraram valores de QR iguais a 0,014 para algas,

0,009 para *Daphnia* e 0,043 para peixes. Valores de QR entre 0,001 e 0,077 indicam que não há risco significativo para espécies aquáticas.

4.4.Principais mananciais no estado de São Paulo

Mananciais são reservas hídricas ou fontes de água como rios, lagos, riachos, represas e lençol freático destinados ao abastecimento público, podendo ser superficiais ou subterrâneos. Tendo em vista a finalidade dessas águas (abastecimento público), as mesmas devem ser conservadas e protegidas para assegurar a qualidade da água (OMM, 2012).

No estado de São Paulo a Lei Estadual no 7.663, de 30 de dezembro de 1991, criou uma política de recursos hídricos estabelecendo a criação do Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SIGRH) e em 1994 a bacia hidrográfica foi considerada como unidade físico-territorial de planejamento e gerenciamento no Estado. Deste modo, o Estado foi dividido em vinte e duas Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) (SÃO PAULO, 1991; SÃO PAULO, 1994).

As UGRHs estão distribuídas dentro sete bacias ou regiões, sendo essas:

- Bacia do Rio Tietê, na qual estão contidas as UGRHs de Piracicaba, Capivari e Jundiaí (05); Alto Tietê (06); Sorocaba e Médio Tietê (10); Tietê – Jacaré (13); Tietê – Batalha (16) e Baixo Tietê (19);
- Região Hidrográfica Aguapeí/Peixe: composta pelas UGRHs de Aguapeí (20) e Peixe (21);
- Região Hidrográfica da Vertente Paulista do Rio Paranapanema: formada pelo Alto Paranapanema (14), Médio Paranapanema (17) e Pontal do Paranapanema (22);
- Região Hidrográfica da Vertente Litorânea: onde estão inseridas as UGRHs do Litoral Norte (03); Baixada Santista (07) e Ribeira de Iguape e Litoral Sul (11);
- Região Hidrográfica da Vertente Paulista do Rio Grande: que engloba as UGRHs da Serra da Mantiqueira (01); Pardo (04); Sapucaí-Mirim/Grande (08); Mogi-Guaçu (09); Baixo Pardo/Grande (12) e Turvo/Grande (15);
- Região Hidrográfica de São José dos Dourados: composta ela UGRH de São José dos Dourados (18);
- Bacia do Rio Paraíba do Sul: abrange apenas a UGRH Paraíba do Sul (02).

As bacias Alto Tietê, Piracicaba/Capivari/Jundiaí e Sorocaba/Médio Tietê são as três bacias mais industrializadas do estado de São Paulo e concentram quase metade da população paulista (CRH, 2017).

4.4.1. Principais mananciais que fornecem água para a Região Metropolitana de São Paulo

A região metropolitana de São Paulo (RMSP) engloba 39 municípios com 21,2 milhões de habitantes, esse número equivale a aproximadamente 50% da população do estado (IBGE, 2016). Das bacias hidrográficas localizadas nesta região a Bacia Hidrográfica do Alto Tietê (BHAT) é a mais importante, e secundariamente estão as bacias do rio Juquiá, rio Sorocaba, rio Jundiaí, rio Paraíba do Sul e da Vertente Oceânica (EMPLASA, 2017).

- **Bacia Hidrográfica do alto Tietê (UGRHI06)**

A Bacia Hidrográfica do Alto Tietê (BHAT) é a que dispõe da menor disponibilidade de água *per capita* (130,68 m³/ano por habitante), pois esta região é intensamente populosa e povoada. Com a crise hídrica nos anos de 2014 e 2015 a oferta de água gerada por esta bacia não foi suficiente para atender as demandas da população. Os dois principais sistemas produtores de água da BHAT (Sistema Cantareira e Sistema Alto Tietê) foram os mais impactados, causando prejuízos ao abastecimento público de toda a RMSP (CHB, 2016).

A bacia hidrográfica do Alto Tietê (BHAT) é a principal fonte hídrica da RMSP, sendo dividida em seis sub-bacias (Cabeceiras, Billings-Tamanduateí, Cotia-Guarapiranga, Penha-Pinheiros, Juqueri-Cantareira e Pinheiros-Pirapora). Sua superfície é de 5.775 km² e aproximadamente 70% da RMSP estão inseridas nesta bacia, o restante (30%) distribui-se nas bacias dos rios Sorocaba, Jundiaí, Paraíba do Sul, Capivari, Itatinga, Itapanhaú e Ribeira do Iguape (CBH, 2016)

Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2013), a ocupação próxima às cabeceiras dos rios contribuiu para a poluição da BHAT, principalmente por efluentes domésticos e industriais, pois a capacidade de depuração de contaminantes é menor nas cabeceiras, comprometendo a qualidade das águas destinadas ao abastecimento público

(ANA, 2013). Entre os mananciais pertencentes à BHAT que merecem destaque estão: Reservatório Guarapiranga, Reservatório Billings, Rio Grande e Rio Cotia.

- **Reservatório Guarapiranga**

A represa do Guarapiranga localiza-se a sudoeste na RMSP, ocupando uma área 630 km² sobre os municípios de São Paulo, Embu, Cotia, Itapeverica da Serra, Embu-Guaçu, Jujutiba, São Vicente e Itanhaém. Aproximadamente 36% da sua área total estão inseridas no município de São Paulo. Em 2007, a produção média era de 14 mil litros de água por segundo, abastecendo cerca de 3,7 milhões de pessoas (20% da população da RMSP) nas zonas sul e oeste da capital (bairros de Santo Amaro, Campo Limpo, Morumbi e Butantã), bem como os municípios de Cotia, Embu e Taboão da Serra (OLIVER & RIBEIRO, 2014; SABESP, 2017).

- **Reservatório Billings**

O Reservatório Billings é formado pelo Rio Grande (ou Jurubatuba), Ribeirão Pires, Rio Pequeno, Rio Pedra Branca, Rio Taquacetuba, Ribeirão Bororé, Ribeirão Cocaia, Ribeirão Guacuri, Córrego Grota Funda e Córrego Alvarenga. Esse manancial está localizado no sudeste da Região Metropolitana de São Paulo, a 746,5 m de altitude e sua área de drenagem equivale a 582,8 km². O município de Rio Grande está totalmente inserido nessa bacia enquanto que os municípios de Diadema, Ribeirão Pires, Santo André, São Bernardo do Campo e São Paulo estão inseridos parcialmente (SABESP, 2017).

- **Rio Grande**

O Rio Grande tem capacidade de 11,21 bilhões de litros de água e está localizado próximo à Rodovia Anchieta, sendo formado pela compartimentação do braço do Rio Grande na represa Billings. Após o tratamento a água do Rio Grande atende os municípios de São Bernardo do Campo, Santo André e Diadema (SABESP, 2017).

- **Rio Cotia**

A bacia do rio Cotia está localizada na região oeste da RMSP e tem por finalidade o abastecimento público da região circunvizinha. Nesta bacia existem dois sistemas que fazem parte do Sistema Integrado Metropolitano. O primeiro sistema é o Alto Cotia que está localizado na parte alta da bacia, sendo composto pelas represas Pedro Beicht e

Cachoeira da Graça; e o segundo é o Sistema Baixo Cotia, sendo constituído por duas barragens de nível denominadas Isolina Superior e Isolina Inferior, cujas águas são encaminhadas para tratamento na Estação de Tratamento de Água Baixo Cotia e está localizado na porção média/baixa da bacia (CBH 2016; SABESP, 2017).

- **Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba e Médio Tietê (UGRHI 10)**

O Rio Sorocaba pertence à Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba e Médio Tietê e essa bacia localiza-se no centro-sudeste do estado de São Paulo e abrange área de 53 municípios, dos quais 34 com sede em seu território e 19 possuindo apenas porções rurais (CBH, 2016).

- **Bacia hidrográfica Paraíba Sul (UGRHI 02)**

A Bacia hidrográfica Paraíba Sul pertence à UGRHI 02, que está situada no leste do estado de São Paulo. O território da UGRHI 02 é composto por 34 municípios, dos quais 33 estão totalmente contidos nesse recorte geográfico e apenas o município de Paraibuna, está parcialmente inserido. Outros cinco municípios (Arujá, Guarulhos, Itaquaquetuba, Mogi das Cruzes e Salesópolis), com sede na UGRHI 06, possuem trechos na UGRHI 02. Um dos mananciais de grande porte e de interesse regional é o Rio Paraíba do Sul (CBH, 2016).

4.4.2. Qualidade das águas destinadas ao abastecimento público

A qualidade das águas destinadas ao abastecimento público pode ser avaliada com base no Índice de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAP) (CETESB, 2015). A determinação do IAP leva em consideração dois outros parâmetros: o Índice de Qualidade de Águas (IQA) e o Índice de Substâncias Tóxicas e Organolépticas (ISTO). O primeiro é determinado com base na temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes termotolerantes, nitrogênio total, fósforo total, resíduo total e turbidez (ANA, 2017). Enquanto que o segundo é gerado a partir da investigação de substâncias que afetam a qualidade organoléptica da água, presença de substâncias tóxicas (como metais, por exemplo), além de resultados do teste de Ames, que avalia o potencial mutagênico de

amostras e substâncias, e do Potencial de Formação de Trihalometanos (THMPF) (CETESB, 2015).

Para a determinação do ISTO são estabelecidas curvas de qualidade que atribuem ponderações variando de 0 a 1. Dois níveis de qualidade (qi) são utilizados para determinar as curvas de qualidade da formação de trihalometanos e metais, sendo estes valores numéricos, 1,0 e 0,5, respectivamente associados ao limite inferior (LI) e ao limite superior (LS). Os níveis de qualidade refletem as seguintes condições sobre a qualidade da água bruta destinada ao abastecimento público:

a) quando o valor medido é menor do que o Limite inferior tem-se que a água pode ser considerada adequada para o consumo humano, pois atende a Portaria 2914 do Ministério da Saúde;

b) Quando o valor medido está entre o Limite inferior e o Limite superior as águas seguem os padrões da Resolução CONAMA 357/05 e, portanto são adequadas ao tratamento convencional;

c) As águas não atendem aos padrões de qualidade da Resolução CONAMA 357/05, quando o valor medido é maior do que limite superior e, portanto não devem ser submetidas ao tratamento convencional (ANA, 2017).

O Índice de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAP) pode ser determinado pela seguinte fórmula:

$$IAP = IQA \times ISTO$$

O valor determinado para o IAP indica se a qualidade da água é ótima, boa, regular, ruim ou péssima. Na Tabela 19 são apresentados os valores de IAP que indicam a qualidade da água bruta para abastecimento público.

Tabela 19. Classificação da qualidade da água bruta destinada ao abastecimento público de acordo com os valores de IAP.

Valores IAP	Classificação
$79 < e \leq 100$	Ótima
$51 < e \leq 79$	Boa
$36 < e \leq 51$	Regular
$19 < e \leq 36$	Ruim
≤ 19	Péssima

Fonte: CRH, 2017

A CETESB monitora diversos pontos ao longo das UGRHs que abastecem o estado de São Paulo com o intuito de avaliar a qualidade das águas brutas para fins de

abastecimento público. Na Tabela 20 são apresentados os Índices de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAPs) monitorados pela CETESB entre os anos de 2011 e 2015 para os mananciais de interesse nessa pesquisa.

Tabela 20. Índices de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAPs) monitorados pela CETESB (2011 – 2015) para os mananciais de interesse.

Sistemas Produtores	UGRHI	Nome do ponto de captação	Descrição	Ano				
				2011	2012	2013	2014	2015
Alto e baixo Cotia	UGRHI 06 ABC	COTI 03900	Rio Cotia	22	14	15	9	9
Alto Tietê	UGRHI 06 AT	PEBA 00900	Reservatório Rio Taiacupeba	71	64	48	55	29
Bacia do reservatório Billings	UGRHI 06 B	RGDE 02030	Reservatório Rio Grande	-	-	-	-	18
	UGRHI 06 B	GADE 02900	Reservatório Rio Grande ou Jurubatuba	-	-	-	-	10
	UGRHI 06 B	BILL 02030	Reservatório Billings	-	-	-	-	8
Bacia do Reservatório Guarapiranga	GUGRHI 06G	GUAR 00900	Reservatório do Guarapiranga	52	55	45	37	62
Bacia do Rio Sorocaba e Médio Tietê	UGRHI 10	SORO 02700	Rio Sorocaba	48	32	31	33	20
Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul	UGRHI 02	PARB 02600	Rio Paraíba do Sul	-	-	-	-	36 < e ≤ 51

Adaptado: (CRH, 2017; CBH, 2016).

Observando-se as Tabelas 19 e 20 verifica-se que a qualidade de seis dos oitos pontos monitorados em 2015 foram considerados ruins ou péssimos e apenas os pontos monitorados na represa do Guarapiranga (GUAR 00900) Rio Paraíba Sul (PARB 02600) foram considerados bom e regular, respectivamente.

4.5. Objetivos do capítulo

Determinar a presença de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX), bezafibrato (BZF) em mananciais do estado de São Paulo e comparar as concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF quantificadas com dados descritos na literatura.

4.6. Parte Experimental

4.6.1. Local de estudo

A definição dos locais de estudo foi realizada juntamente com membros da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) com base no Índice de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público (IAP). Para isso, foram monitorados os seguintes mananciais: Guarapiranga (GUAR0900), Sorocaba (SORO 02700), Baixo Cotia (COTI03900), Rio Grande (GADE 0900 e GADE 02030), Paraíba (PARB 02600), Billings (BILL0 2030) e Taiaçupeba (PEBA 00900). Os pontos GUAR 0900, COTI 03900, GADE 0900, GADE 02030, BILL0 2030 e PEBA 00900 foram coletados pela divisão de amostragem da CETESB e os pontos PARB 02600 e SORO 02700, pelo Laboratório de Taubaté e Sorocaba.

4.6.2. Limpeza dos frascos

Os frascos utilizados nas coletas foram fornecidos pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA). Os mesmos foram lavados com Extran, seguido de enxágue com água da torneira (5 vezes) e água ultra pura (5 vezes). Após as mesmas foram colocadas para secar em estufa (45°C) e depois de secas as mesmas foram lavadas com acetonitrila (ACN) 100% e deixadas em capela pela completa secagem. No intuito de verificar se a limpeza estava adequada, brancos das lavagens com água ultrapura foram realizados após a secagem completa dos frascos enxaguados com ACN.

4.6.3. Coleta e acondicionamento das amostras

As coletas de amostras para investigação da presença de Cafeína (CAF), Fluoxetina (FLX), Levotiroxina (LVX) e Bezafibrato (BZF) foram realizadas em parceria com a CETESB em pontos já monitorados por ela, no período de abril a setembro de 2017, totalizando 17 amostras. A amostragem foi realizada a 30 cm da lâmina d'água nos mananciais de estudo, em frascos âmbar (1L), sem a adição de preservantes e o volume preenchido totalmente. Na sequência as amostras foram armazenadas em geladeira (4 °C) por no máximo sete dias após a coleta.

4.6.4. *Preparo das amostras*

Antes de serem submetidas à extração em fase sólida (SPE) as amostras foram homogeneizadas, filtradas e o pH ajustado para 2,5. O volume foi dividido em dois frascos de 500 mL e estes submetidos à SPE, conforme descrito no item 3.3.1. A análise da amostra em duplicata foi realizada com o intuito de confirmar os valores encontrados e os resultados expressos em termos de média. Após a secagem completa do volume extraído (6 mL), os mesmos foram armazenados a -20°C por no máximo 1 mês. Para análise, o material seco nos tubos foi ressuspenso em 250 µL de metanol e 250 µL de água acidificada com ácido fórmico a 0,2% e filtrado por meio de membrana de *nylon* de 22 µm. 250 µL foram transferidos para *inserts* de vidros em *vials* de 1,8 mL.

4.6.5. *Determinação de CAF, FLX, LVX e BZF por LC-MS/MS*

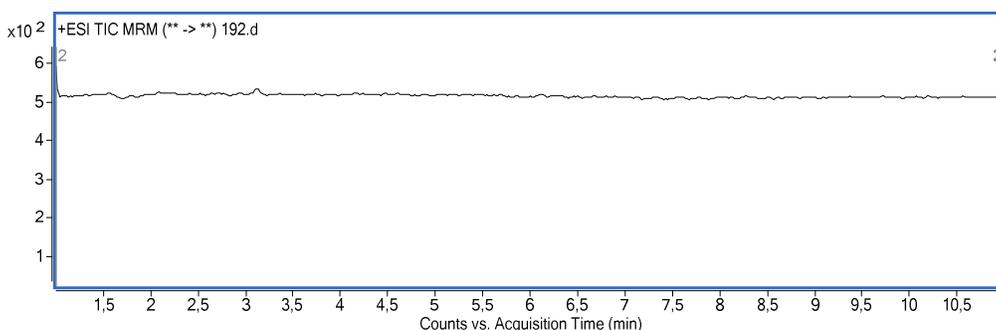
A determinação de CAF, FLX, LVX e BZF nas amostras foi realizada por LC-MS/MS, utilizando-se o método desenvolvido e validado no capítulo I.

4.7. Resultados e Discussão

4.7.1. Limpeza dos frascos

Com o objetivo de verificar se a limpeza dos frascos foi adequada para remover eventuais contaminações por CAF, FLX, LVX e BZF realizou-se a limpeza dos mesmos conforme o descrito no item 4.3.2. e em seguida os frascos foram enxaguados com água ultra pura e a mesma reservada para análise por LC-MS/MS utilizando o método proposto. Na Figura 21 é apresentado um Cromatograma de Íons Totais (TIC) representativo dos brancos das lavagens dos frascos utilizados nas coletas realizadas pela CETESB.

Figura 21. Cromatograma de Íons Totais (TIC) representativo das lavagens dos frascos.



Em nenhum dos brancos de lavagem os analitos de interesse foram verificados. Isso ocorreu porque estavam ausentes ou abaixo do limite de detecção do método.

4.7.2. Determinação de CAF, FLX, LVX e BZF por LC-MS/MS

Na Tabela 21 são apresentados os resultados obtidos para a determinação de CAF, FLX, LVX e BZF nas coletas realizadas nos mananciais do Guarapiranga (GUAR0900), Sorocaba (SORO 02700), Baixo Cotia (COTI03900), Rio Grande (GADE 0900 e GADE 02030), Paraíba (PARB 02600), Billings (BILL0 2030) e Taiáçupeba (PEBA 00900). Os resultados serão expressos em termos da concentração média.

Tabela 21. Concentração Média de Cafeína, Fluoxetina, Levotiroxina e Bezafibrato encontradas nos mananciais monitorados e frequência de amostras positivas do total de amostras analisadas.

Compostos	Período de coleta	Reservatório Guarapiranga	Rio Sorocaba	Rio Cotia	Rio Grande		Rio Paraíba	Reservatório Billings	Rio Taiaçupeba	Frequência (+ /total)
		GUAR 0900	SORO 02700	COTI 03900	RGDE 02030	GADE 02900	PARB 02600	BILL 02030	PEBA 00900	
Cafeína (ng.L ⁻¹)	C1	104,7	556,0	1152,6	110,1	*	*	*	2461,5	
	C2	197,1	770,0	9255,7	*	*	3283,1	16,2	48,0	17/17
	C3	1669,1	658,0	16466,4	*	1499,1	●	6,6	20,0	
Fluoxetina (ng.L ⁻¹)	C1	nd	nd	3,5	1,2	*	*	*	nd	
	C2	1,2	1,4	3,2	*	*	1,2	1,8	nd	11/17
	C3	2,1	1,6	3,4	*	nd	●	3,3	nd	
Levotiroxina (ng.L ⁻¹)	C1	nd	nd	nd	nd	*	*	*	nd	
	C2	nd	nd	nd	*	*	nd	nd	nd	0/17
	C3	nd	nd	nd	*	nd	●	nd	nd	
Bezafibrato (ng.L ⁻¹)	C1	nd	nd	211,2	nd	*	nd	*	nd	
	C2	nd	11,0	286,2	*	*	41,5	nd	nd	7/17
	C3	nd	77,5	322,0	*	26,0	●	nd	nd	

Legenda: * = Coleta não realizada; ● = não analisada; nd = substância não detectada ou menor que o limite de detecção; C1= amostras coletadas entre abril-maio/2017; C2= amostras coletadas entre junho-julho/2017; C3= amostras coletadas entre agosto-setembro/2017

- **Cafeína**

Com base nos resultados obtidos pode-se observar (Tabela 21) que a CAF foi detectada em todas as amostras analisadas, evidenciando a contaminação dos mananciais por efluentes domésticos. Sendo os Rios Cotia, Paraíba, Taiacupeba, reservatório do Guarapiranga e Rio Grande os mananciais mais impactados pela presença CAF. Esse composto tem sido utilizado como um indicador de contaminação das águas por micro poluentes orgânicos persistentes (MPOP's), ou seja, se há CAF nos mananciais isso sugere a presença de outros fármacos (Paíga *et al.*, 2017) e os dados observados indicam que de fato existe uma correlação entre a presença de CAF e outros fármacos.

Recentemente a CETESB passou a monitorar níveis de CAF em alguns mananciais destinados ao abastecimento público, dentre eles os rios Cotia e Sorocaba bem como o Reservatório do Guarapiranga nos mesmos pontos monitorados por essa pesquisa. No Relatório da Qualidade das Águas Interiores (2016) são apresentadas as concentrações verificadas para esses mananciais. Os maiores níveis de CAF foram detectados no Rio Cotia (17970 ng.L^{-1}) e as concentrações no Rio Sorocaba variaram de 60 a 690 ng.L^{-1} enquanto que no Reservatório do Guarapiranga foram de 19 a 240 ng.L^{-1} (CETESB, 2016). Os níveis detectados para os mananciais monitorados são semelhantes aqueles verificados nessa pesquisa de doutorado, exceto pelo último período amostrado no reservatório do Guarapiranga. Essa diferença pode ser fruto de alterações pluviométricas ou de algum despejo indevido de efluentes.

LÓPEZ-DOVAL *et al.* (2017) também investigaram a presença de CAF e outros contaminantes em amostras de água oriundas do reservatório do Guarapiranga, em três locais diferentes da represa. Um dos sítios amostrados era próximo à captação de água (assim como o ponto GUAR 0900) e as concentrações de CAF variaram de 43 a 477 ng.L^{-1} . Para o ponto GUAR 0900, analisado nesse trabalho, as concentrações de CAF foram de 104,7; 197,1 e $1669,1 \text{ ng.L}^{-1}$ para os períodos amostrados, sendo a maior concentração determinada nas amostras coletadas no mês de setembro.

Em 2014 (a), Montagner *et al.* publicaram um estudo sobre a detecção de CAF nos Rios Sorocaba e Cotia. No período amostrado pelos autores, de janeiro de 2010 a abril de 2011, as concentrações de CAF variaram de 600 a 5300 ng.L^{-1} para o ponto monitorado no Rio Sorocaba e de 690 a 29000 ng.L^{-1} para o Rio Cotia. Estas concentrações também são semelhantes às encontradas nessa pesquisa. Entretanto, o que

chama a atenção é que em ambos os estudos as maiores concentrações de CAF foram determinadas para amostras do Rio Cotia, sugerindo a possível presença de outros MPOP's. No Rio Sorocaba além de CAF já havia sido relatada a presença de hormônios (naturais e sintéticos) e agentes plastificantes por Montagner *et al.* (2014 a) e agora com os resultados apresentados nessa pesquisa pode-se incluir a esse grupo a FLX e BZF. Esses dados indicam que a CAF se trata de um bom marcador de contaminação ambiental e que poderia ser utilizada no Brasil por outros órgãos ambientais como uma ferramenta de investigação dessas substâncias (JARDIM *et al.*, 2012).

Nos Rios Grande, Paraíba e Taiaçupeba também foram encontrados valores elevados de CAF (entre 1000 ng.L⁻¹ e 3300 ng.L⁻¹) em pelo menos uma das amostras analisadas. A variação dos valores entre as datas de coleta de um mesmo ponto pode estar relacionada aos índices pluviométricos e indicadores de qualidade da água bruta (IQA), por exemplo. Entretanto, o fato é que existe cafeína nesses mananciais, assim como no reservatório Billings, onde foram verificadas as menores concentrações desse composto. Almeida (2005) encontrou de 1,9 a 14,7 ng.g⁻¹ de CAF em amostras de sedimento dessa represa, o que fomenta a necessidade de mais estudos que monitorem a presença de CAF nesse manancial.

Outros pesquisadores têm detectado CAF em mananciais e em água potável no estado de São Paulo. Montagner & Jardim (2011) encontraram de 1,17 a 25,8 ng.L⁻¹ de CAF em amostras coletadas no rio Atibaia, enquanto Sodré & Locatelli & Jardim (2010) verificaram 2400 ng.L⁻¹ de CAF neste mesmo rio, sugerindo que as concentrações de composto variam ao longo do tempo. Campanha *et al.* (2014) detectaram entre 0,04 e 129,6 ng.L⁻¹ de CAF nas águas do Rio Monjolinho; no Rio Jundiá, as concentrações variaram de 993,9 a 19329,7 ng.L⁻¹ (SOUSA *et al.*, 2014). Embora os rios Atibaia, Monjolinho e Jundiá não estejam entre os rios monitorados por essa pesquisa, pode-se observar que as concentrações identificadas estão próximas às apresentadas na Tabela 22.

A CAF também foi monitorada em outras regiões do país. Em amostras de água potável analisadas no Rio Grande do Sul, os valores detectados foram inferiores ao limite de quantificação (<0,5 ng.L⁻¹) do método proposto pelos autores (CERQUEIRA *et al.*, 2014). Esse composto também foi quantificado por Machado *et al.* (2016) e, dentre as 22 capitais avaliadas, os maiores níveis de CAF foram determinados para as amostras de água potável de Porto Alegre (2769,0 ng.L⁻¹).

É importante ressaltar, ainda, que concentrações de CAF foram verificadas na água do mar de Santos/SP e na Baía de Todos os Santos, em Salvador/BA, onde a CAF foi quantificada no sedimento (PEREIRA *et al.*, 2016; BERETTA *et al.*, 2014). RODRÍGUEZ-GIL *et al.*(2018) avaliaram a distribuição mundial de CAF em diferentes matrizes. Na Tabela 22 está apresentada a frequência de detecção de CAF em diferentes matrizes, sendo consideradas as amostras positivas ou negativas para a CAF, de acordo com a presença ou não deste analito.

Tabela 22. Frequência de detecção mundial de CAF em diferentes matrizes.

Matriz	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas	Nº de amostras negativas	Frequência de detecção (%)
Água da chuva	4	4	0	100,0
Água de estuário	293	273	20	93,2
Água do mar	513	457	56	89,1
Água potável	421	331	90	78,6
Efluente	1637	1149	488	70,2
Água superficial	14.527	8666	5891	59,7
Água subterrânea	10.939	1515	9424	13,8

Fonte: RODRÍGUEZ-GIL *et al.*(2018)

Observando-se a Tabela 21 percebe-se que a CAF está amplamente distribuída em matrizes aquáticas, tendo atingido, inclusive, áreas remotas e pouco habitadas como a Antártida. Nessa região a CAF foi determinada em amostras superficiais na concentração de 71,33 ng.L⁻¹ (GONZALEZ-ALONSO *et al.*, 2017). Isso chama atenção para o quão impactados estão os diferentes corpos d'água por substâncias de origem antropogênica.

Além da detecção da CAF servir como um indicador da contaminação ambiental por fármacos (PAÍGA *et al.*, 2017), algumas das concentrações verificadas nos mananciais estudados nessa pesquisa de doutorado seriam capazes de causar danos ecotoxicológicos, conforme publicado por Capolupo *et al.* (2016) e Pires *et al.*(2016). Nesses estudos, os autores verificaram que a CAF pode causar estresse em mexilhões e interferir na capacidade e velocidade de regeneração dos anelídeos, indicando que a fauna desses mananciais pode estar sofrendo efeitos por causa da presença desse composto.

- **Fluoxetina**

Com relação à FLX, detectada em 11 das 17 amostras analisadas (Tabela 21), as maiores concentrações foram verificadas nas águas do Rio Cotia (3,5; 3,2 e 3,4 ng.L⁻¹) e no reservatório Billings (3,3 ng.L⁻¹). Essas concentrações foram semelhantes às aquelas encontradas por GIEBULTOWICZ & NAŁĘCZ-JAWECKI (2014) em amostras de água dos Rios Vístula e Utrata, na Polônia (3,2 ng.L⁻¹). Tais valores, embora pequenos, refletem uma questão preocupante sobre a presença de FLX nos mananciais, já que se trata de um composto que tende a ficar retido no sedimento por absorção e adsorção. No primeiro mecanismo de sorção, os micropoluentes se movimentam da fase aquosa para a camada lipofílica da biomassa ou do sedimento por causa da sua hidrofobicidade, que neste caso pode ser justificada pelo Kow da FLX (3,82); no segundo, adsorção se dá por meio das interações eletrostáticas entre a FLX (carregada positivamente por causa do pKa (9,8) da amina secundária de sua molécula e pH do meio) e a superfície negativa das moléculas do sedimento. Normalmente a FLX está na sua forma catiônica em águas naturais, o que significa que tende a interagir com o sedimento, podendo, ainda, bioacumular nos organismos aquáticos presentes no local impactado (ALVARINO *et al.*, 2018; DING *et al.*, 2017; BITTENCOURT *et al.*, 2015; HYLAND *et al.*, 2012).

Embora baixas, as concentrações detectadas nesse estudo requerem atenção, pois recentemente foi publicado que concentrações de 4 ng.L⁻¹ a 16 ng.L⁻¹ de FLX foram capazes de alterar o comportamento predatório de peixes (SAARISTO *et al.*, 2017). Portanto, seria interessante que estudos futuros continuassem investigando a presença de FLX em corpos d'água em associação com a avaliação do comportamento predatório dos peixes.

A FLX também foi quantificada na represa do Guarapiranga e Rios Sorocaba e Paraíba na faixa de 1,2 a 2,1 ng.L⁻¹. Outros estudos realizados no país se propuseram a detectar FLX, entretanto Lorz *et al.* (2012) e Cardoso *et al.* (2011) não encontraram esse composto ao monitorar amostras de água do Lago Paranoá (DF) e da estação de tratamento d'água da Companhia Rio grandense de Saneamento, respectivamente. Em um estudo realizado no Rio Negro foram determinadas concentrações de outros três antidepressivos. Os valores foram de aproximadamente 30 ng.L⁻¹ para a amitriptilina, de 48 - 69 ng.L⁻¹ para o citalopram e de 30 a 164 ng.L⁻¹ para sertralina, entretanto a FLX não foi monitorada nesse estudo (THOMAS *et al.*, 2014).

- **Levotiroxina**

Conforme apresentado na Tabela 22, a LVX não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Isso pode ter ocorrido porque esse composto estava ausente nos mananciais estudados ou porque estava abaixo do limite de detecção do método analítico. A ausência de LVX nas amostras pode ser justificada pelo fato da dosagem prescrita desse medicamento ser muito baixa e/ou porque aproximadamente 70% da levotiroxina (T4) metabolizada está na forma de T3 e outros produtos de biotransformação, além disso, esse composto é sensível em pHs próximos de 7 (MERCK, 2015; WON, 1991). Entretanto, Svanfelt & Eriksson & Kronberg (2010) quantificaram LVX e seus principais produtos de biotransformação e degradação em amostras de esgoto, antes e após o tratamento, indicando que a LVX pode ser detectada no meio ambiente.

- **Bezafibrato**

Assim como a FLX, a concentração de BZF foi maior no Rio Cotia para as três coletas realizadas (211,2; 286,2 e 322,0 ng.L⁻¹). As concentrações desse fármaco nos Rios Sorocaba, Grande (GADE 02900) e Paraíba variaram entre 11 e 77 ng.L⁻¹. Almeida (2005) verificou a presença de BZF em amostras de sedimento da represa Billings, em concentrações que variaram de 1,7 a 3,8 ng.g⁻¹ nesse manancial. Stumpf *et al.* (1999) verificaram a presença de BZF antes e após o tratamento do esgoto. O BZF também foi detectado em águas superficiais no México (Rivera-Jaimet *et al.*, 2017) dentro da faixa monitorada nesse estudo, e os valores estavam entre 286–2.100 ng/L⁻¹.

Gros *et al.* (2012) verificaram a presença de BZF em seis matrizes ambientais, incluindo amostras de água potável, de rio, de mar e na entrada e saída de duas estações de tratamento de esgoto. Os autores encontraram cerca de 16 ng.L⁻¹ em amostras de água do rio e 2 ng.L⁻¹ em água do mar. Já os valores quantificados de BZF antes e após o tratamento de esgoto em duas estações de tratamento de esgoto foram de aproximadamente 206 e 424 ng.L⁻¹, antes do tratamento e de 7 e 16 ng.L⁻¹ após. Portanto, os valores de BZF encontrados no Rio Cotia (211,2; 286,2 e 322,0 ng.L⁻¹) são equivalentes aos verificados por Gros *et al.* (2012) em amostras de esgoto não tratado. Isso sugere que o Rio Cotia recebe efluentes não tratados ou tratados de modo ineficiente.

Entre todos os mananciais pesquisados, o rio Cotia, que vem sofrendo depreciação da qualidade da sua água ao longo dos anos, foi o que apresentou as maiores concentrações de fármacos. Santa Rosa & Oliveira & Saad (2014) discutiram os impactos decorrentes da expansão urbana na região da bacia do Rio Cotia em comparação à evolução do índice da qualidade da água bruta (IQA). Os parâmetros utilizados como indicadores do IQA são temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes termotolerantes, nitrogênio total, fósforo total, resíduo total e turbidez (ANA, 2017) e, segundo o autor, houve um aumento exponencial da taxa de expansão urbana, levando à queda do OD e aumento do fósforo total, impactando de forma negativa o IQA entre os anos de 1983-2011 (SANTA ROSA, OLIVEIRA & SAAD, 2014).

Segundo o último relatório do Comitê da Bacia Hidrográfica Alto Tietê o Rio Cotia ainda apresenta valores baixos de OD e altos para o DBO, Fósforo e Nitrogênio Amoniaco nas amostras analisadas, assim como para *Escherichia coli* (CBH, 2016).

De modo geral a BHAT teve uma depreciação da qualidade da água bruta destinada ao abastecimento público de acordo com o apresentado no último relatório da CBH (2016). Entre os pontos de coleta analisados nessa pesquisa, apenas o reservatório do Guarapiranga apresentou IAP bom, entretanto isso não significa que fármacos estejam ausentes nesse manancial, pois, segundo os resultados apresentados, o mesmo contém CAF, FLX e BZF. Essa discrepância entre o IAP e a detecção de fármacos pode estar associada à distribuição heterogênea dos MPOPs na bacia, por causa das diferenças entre o nível de impacto dentro da bacia (LÓPEZ-DOVAL *et al.*, 2017).

O comprometimento do IAP observado nos últimos anos para os mananciais estudados pode ter sido decorrente da crise hídrica que se reflete na qualidade de águas (CBH, 2016). Entretanto, a crise hídrica deveria ser mais um fator a fomentar a importância da determinação de fármacos nos mananciais utilizados para o abastecimento público, pois isso reflete a necessidade da implantação de sistemas rígidos de controle para lançamento de efluentes domésticos clandestinos, bem como a necessidade de tratamento adequado do esgoto lançado nesses mananciais.

Uma vez que o monitoramento de todos os fármacos presentes nos mananciais seja inviável, por causa do grande número de substâncias com diferentes características físico-químicas, ou porque os métodos de monitorização não estão totalmente desenvolvidos e padronizados, ou ainda devido às limitações financeiras e de recursos humanos, é que estratégias devem ser desenvolvidas para auxiliar na investigação de

fármacos nos mananciais (EU, 2013). Portanto, o acompanhamento dos níveis de CAF pode ser uma boa ferramenta de monitorização conforme já começou a ser monitorada pela CETESB.

Os resultados apresentados nessa pesquisa de doutorado vêm acrescentar e corroborar com as demais pesquisas realizadas no país no sentido de criar um panorama nacional para que medidas de controle possam ser tomadas pelos órgãos responsáveis. Essas medidas deveriam envolver atividades de prevenção como o descarte correto de medicamentos, melhoria nos sistemas de tratamento de esgoto empregado no país, bem como a promoção do uso racional de medicamentos.

4.8. Conclusões do capítulo

Esse capítulo buscou determinar a CAF, FLX, LVX e BZF em manancias do Estado de São Paulo e a partir dos resultados apresentados tem-se que:

- A CAF estava presente em todas as amostras analisadas (17/17);
- As maiores concentrações de CAF foram verificadas nas amostras oriundas do Rio Cotia, seguidas pelos rios Paraíba, Taiáçupeba, Reservatório Guarapiranga e Rio Grande.
- A FLX foi detectada em 11/17 manancias, embora presente em baixas concentrações esse composto requer atenção por causa de seus efeitos ecotoxicológicos em baixas concentrações.
- O BZF foi encontrado em 7/17 amostras.
- O Rio Cotia parece ser o manancial mais impactado pela presença de fármacos, pois além de CAF as maiores concentrações de FLX e BZF também foram verificadas nesse rio.
- A LVX não foi encontrada nos mananciais pesquisados, ou estava abaixo do limite de detecção.
- Os valores de CAF foram semelhantes aqueles relatados por outros autores para os mananciais de estudo em comum.
- Não foram encontradas pesquisas que tenham avaliado a presença de FLX nos rios e reservatórios estudados.
- Os níveis de BZF verificados no Rio Cotia são semelhantes aqueles verificados no esgoto em outros locais do globo.

5. CAPITULO III: ESTUDO DA ECOTOXICIDADE CAUSADA POR CAFEÍNA, FLUOXETINA, LEVOTIROXINA E BEZAFIBRATO SOBRE A CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA* (LTPNA 08)

5.5. Ecotoxicologia e a presença de fármacos no meio ambiente

A primeira definição para ecotoxicologia surgiu em 1977, como sendo “*um ramo da toxicologia relacionado ao estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais e sintéticos, aos constituintes dos ecossistemas, animais (incluindo humanos), vegetais e microbianos, em um contexto integrado*” (TRUHAUT, 1977). Na Tabela 23 são apresentadas as principais definições atribuídas ao termo ecotoxicologia ao longo dos anos.

Tabela 23. Definições aplicadas ao termo ecotoxicologia.

Definições	Referência
“ <i>Um ramo natural da toxicologia, a ciência dos venenos em organismos individuais, para os efeitos ecológicos de poluentes</i> ”.	MORIARTY, 1983
“ <i>A ciência que visa prever os impactos dos compostos químicos sobre os ecossistemas</i> ”.	LEVIN <i>et al.</i> , 1989
“ <i>O estudo do destino e dos efeitos de agentes tóxicos no ecossistema</i> ”.	CAIRNS & MOUNT, 1990
“ <i>É a ciência das substâncias tóxicas no meio ambiente e seu impacto sobre os organismos vivos</i> ”.	JORGENSEN, 1990
“ <i>O estudo de efeitos tóxicos sobre organismos não-humanos, populações e comunidades</i> ”.	SUTER, 1993
“ <i>O estudo do destino e do efeito de um composto tóxico em um ecossistema</i> ”.	SHANE, 1994
“ <i>O campo de estudo, que integram os efeitos ecológicos e toxicológicos de poluentes químicos nas populações, comunidades e ecossistemas com o destino (transporte, transformação e degradação) de tais poluentes no meio ambiente</i> ”.	FORBES & FORBES, 1994
“ <i>A ciência dos efeitos de agentes potencialmente tóxicos sobre os ecossistemas naturais e espécies não-alvo</i> ”.	HOFFMAN <i>et al.</i> , 1995
“ <i>O estudo das vias de exposição, absorção e efeitos de agentes químicos sobre organismos, populações, comunidades e ecossistemas</i> ”.	CONNEL, 1990
“ <i>O estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos sobre os ecossistemas; Os efeitos prejudiciais de produtos químicos (toxicologia) dentro do contexto da ecologia</i> ”.	WALKER <i>et al.</i> , 2001
“ <i>O estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos sobre os ecossistemas incluindo os efeitos sobre os indivíduos e os consequentes efeitos sobre os níveis das populações acima</i> ”.	WALKER <i>et al.</i> , 2012

Fonte: NEWMAN, 2014.

Ao se verificar as definições acima fica evidente a preocupação com os efeitos causados por substâncias químicas sintéticas ou naturais, de origem antropogênica, sobre os diferentes seres vivos presentes no meio ambiente.

Os organismos vivos podem assimilar os contaminantes do ambiente onde residem e ainda armazená-los a sua massa corporal. A resposta dos organismos aos contaminantes depende da natureza desses compostos, da concentração e do tempo de exposição. Os efeitos podem ser mínimos e reversíveis ou até a morte. Estudos a respeito dos efeitos causados por substâncias de origem antropogênica se fazem necessários, a fim de que os riscos possam ser identificados, minimizados e medidas tomadas. A identificação dos efeitos e a avaliação da relação da dose-resposta são etapas iniciais no processo de análise do risco ambiental (SILVA *et al.*, 2015).

Para avaliar a dose-resposta de uma substância, testes de toxicidade são necessários. Esses ensaios podem ser classificados em agudos e crônicos, o primeiro avalia os efeitos decorrentes da exposição do organismo-teste a um agente tóxico por um curto período de tempo (24 h às 96 h) em relação ao seu período de vida. Por meio desses testes, valores de CE₅₀ e CL₅₀ podem ser determinados. Ensaios de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre organismos-testes por um período que pode abranger parte ou todo o seu ciclo de vida. Tais testes avaliam os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais. Concentrações estas que permitem a sobrevivência dos organismos sem afetar funções biológicas essenciais como: reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação e etc (COSTA *et al.*, 2008).

Segundo Fatta-Kassinis *et al.* (2011) alguns organismos testes tem sido empregados na avaliação ecotoxicológica de fármacos. Entre os organismos listados pelos autores estão: algas e cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus leopoliensis*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* entre outras), cnidários (*Hydra attenuata*), moluscos (*Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*), camarões (*Palaemonetes pugio*), copépodes (*Nitocra spinipes*), anfípodos (*Hyalella azteca*), peixes (*Gambusia affinis*, *Oryzias latipes*, *Salmo trutta*, *Pimephales promelas*), bactérias (*Vibrio fischeri*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas salmonicida*), crustáceos (*Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, *Gammarus pulex*, *Artemia salina* e *Ceriodaphnia dubia*), rotíferos (*Brachionus calyciflours*), diatomáceas (*Cyclotella meneghiniana*), plantas (*Amaranthus retroflexus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Zea mays*), macrófitas aquáticas (*Lemna minor*, *Lemna gibba* e *Myriophyllum sibiricum*), anelídeos e enquitreídeos. Cabe ressaltar que a *Microcystis aeruginosa* trata-se de uma espécie de cianobactéria e foi aqui escolhida neste estudo

por representar um organismo primário em um ambiente aquático.

Uma das maneiras de avaliar o efeito de fármacos sobre cianobactérias é avaliar seu crescimento. O guia 201 da OECD (2002) propõe os procedimentos necessários para avaliar o efeito de substâncias químicas sobre o crescimento celular de cianobactérias. Existem cinco fases bem definidas para o crescimento celular desse microrganismo (REYNOLDS, 2006). A primeira fase é a de latência (fase Lag). Essa etapa ocorre logo após a inoculação de uma cepa em um meio de cultivo, e possui curta duração, não se observando crescimento celular e podendo, inclusive ocorrer um declínio na quantidade de microrganismo. A fase exponencial (fase Exp) é a segunda fase, na qual se percebe um aumento do número de microrganismos, que pode ser determinado pelo aumento da biomassa ao longo do tempo. A duração da fase exponencial em culturas depende de fatores como quantidade de inóculo, ritmo de crescimento, meio utilizado e condições físicas como luz e temperatura.

A terceira fase é conhecida como fase de desaceleração, pois há uma diminuição no crescimento celular. Isto ocorre porque a concentração celular elevada conduz a um esgotamento de nutrientes, e a uma limitação de O₂ e luz. A penúltima fase é a estacionária, sendo a principal característica dessa etapa a ausência de crescimento e alterações bioquímicas das células. A fase de morte acontece quando o metabolismo celular não consegue se sustentar e alterações de pigmentação podem ocorrer dependendo da espécie. A curva de crescimento celular auxilia na compreensão dos fenômenos que envolvem a proliferação e morte de cianobactérias.

5.5.1. Por que avaliar os efeitos de fármacos sobre cianobactérias?

A eutrofização dos corpos d'água é um dos principais fatores que influenciam a proliferação de cianobactérias. Sendo esse um processo natural, no qual um corpo d'água recebe lenta e continuamente o aporte de nutriente (N:P:K). Entretanto, esse processo pode ser acelerado pela ação antrópica. No qual o ser humano introduz grandes quantidades de nutrientes em um manancial, normalmente pelo despejo de efluentes doméstico, industrial e agrícola. O lançamento de efluentes não tratados ou tratados de modo ineficiente são um dos maiores problemas relacionados à floração de cianobactérias. A floração trata-se da proliferação exacerbada desse microrganismo por causa do excesso de N e P em corpos d'água e o termo em inglês para floração é *bloom* (NEWCOMBE *et al.*, 2012).

Quando um *bloom* tem potencial de causar efeitos tóxicos, ele é chamado de *bloom* de cianobactérias tóxicas, e esse tipo de floração tem aumentado em todo o mundo, provavelmente pelo excesso de nutrientes oriundos de efluentes domésticos e industriais (OEHRLE *et al.*, 2017; GKELIS & ZAOUTSOS, 2014). Os motivos que desencadeiam a produção de substância tóxicas produzidas por cianobactérias (cianotoxinas) ainda não são totalmente esclarecidos, porém alguns fatores ambientais como concentração de nutrientes, temperatura da água e o pH também influenciam no desencadeamento da produção de toxinas (GEADA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2014; MERWE, 2015).

Entre as espécies produtoras de cianotoxinas está a *M. aeruginosa*. Essa espécie produz a microcistina, que é uma hepatoxina, e normalmente está relacionada a episódios de florações tóxicas (CARMICHAEL & BOYER, 2016). E, portanto é uma das espécies relevantes a serem estudadas.

Estima-se que as mudanças climáticas globais (tempestades mais fortes, secas mais extensas) contribuam para que o aumento de episódios de floração de cianobactérias em água doce sejam mais frequentes e persistentes (MARION *et al.*, 2017). Além de nutrientes, o esgoto leva consigo para os corpos d'água micropoluentes orgânicos persistentes (MPOP's), entre eles os fármacos. Portanto, compreender os efeitos de fármacos sobre cianobactérias é importante, pois esses microrganismos são continuamente expostos a essas substâncias (DAI *et al.*, 2016).

As cianobactérias desempenham papel essencial na manutenção da biosfera e algumas espécies são produtoras de toxinas (CARMICHAEL & BOYER, 2016; PERCIVAL & WILLIAMS, 2014). O que reforça a importância de conhecer os efeitos tóxicos dos fármacos sobre esses microrganismos e assim verificar se esses compostos podem influenciar de alguma maneira na proliferação e produção de cianotoxinas. Além disso, as cianobactérias são organismos produtores primários em ambientes aquáticos, sendo juntamente com as microalgas, parte importante do fitoplâncton para a manutenção da cadeia alimentar e ecossistema.

Algumas pesquisas têm se dedicado a verificar os efeitos de fármacos sobre cianobactérias. Lawrence *et al.* (2012) examinaram o efeito de cafeína (CAF), paracetamol (PC), e diclofenaco (DF), bem como suas misturas (PC, CAF, DF, PC+CAF, PC +DF, CAF+DF, PC+CAF+DF), sobre o desenvolvimento, funcionamento e biodiversidade das comunidades de biofilme de rios. Os biofilmes eram compostos por uma variedade de algas, cianobactérias e biomassa bacteriana. Os resultados

indicaram que a mistura PC+DF reduziu significativamente a biomassa de cianobactérias.

Backhaus *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade da FLX sobre os componentes fotossintéticos naturais de perifitons (são comunidades de microrganismos compostas por bactérias, fungos, cianobactérias, microalgas, etc; incorporados numa matriz de polissacarídeos que se aderem a superfícies aquáticas) e o valor de CE_{50} determinado para a inibição do teor total de pigmento foi igual a 111,6 nM. Em 2007, Johnson *et al.* (2007) investigaram o efeito da mistura de inibidores da receptação de serotonina (fluoxetina, fluvozamina e sertralina) sobre o crescimento de comunidades de microalgas, o valor de CE_{50} foi igual a $1040,1 \pm 427,5$ nM.

Palomares *et al.* (2009), observaram a interação toxicológica de três antilipidêmicos da classe de fibratos (ácido fenofibrico, e seu metabolito ativo, fenofibrato, genfibrozil e bezafibrato) sobre dois microrganismos bioluminescentes, *Vibrio fischeri* e *Anabaena* I CPB4337 (modificada). Os resultados demonstraram que a inibição da bioluminescência foi perceptível quando os três compostos estavam associados, constatando-se um sinergismo para as concentrações menores e um forte antagonismo para as maiores. Em outro estudo, Rosal *et al.* (2010) avaliaram a toxicidade aguda do bezafibrato, ácido clofibrico, gemfibrozil, ácido fenofibrico e fenofibrato, sobre *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, e *Anabaena* I CPB4337. O Gemfibrozil foi tóxico para *Anabaena* sp. com CE_{50} de $4,42$ mg.L⁻¹.

Outros estudos têm buscado compreender os efeitos dos antibióticos sobre esses microrganismos, isto se deve às semelhanças entre as células de bactérias e cianobactérias. Liu *et al.* (2012) observaram que a espiromicina foi mais tóxica para *M. aeruginosa* do que a amoxicilina. Além disso, o primeiro antibiótico reduziu o conteúdo total de microcistinas e inibiu o crescimento celular, enquanto que a exposição ao segundo aumentou a concentração intra e extracelular de microcistinas sem afetar o crescimento dos microorganismos.

Pleiter *et al.* (2013) verificaram que cianobactérias são mais sensíveis aos efeitos tóxicos da amoxicilina, eritromicina, levofloxacino, norfloxacino e tetraciclina do que algas verdes. Entretanto, Drury *et al.* (2013), constataram o que o triclosan aumentou em seis vezes a abundância relativa de cianobactérias e causou mortandade em algas. Este resultado sugere que cianobactérias são mais resistentes ao triclosan do que algas, e que o composto poderia atuar como um fator seletivo, favorecendo o crescimento de cianobactérias sobre algas.

Wang & Zhang & Guo (2017) verificaram que os antibióticos florfenicol e tiamfeicol inibiram o crescimento das cianobactérias em 46% e 56% quando as concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dos respectivos fármacos foram avaliadas. Outras classes farmacológicas também têm causado interesse em alguns pesquisadores. Bàcsiet *al.* (2016) verificaram o efeito de ibuprofeno e diclofenaco sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e perceberam que esses compostos inibiram o crescimento em 7,6% a 38% respectivamente.

Além dos efeitos sobre o crescimento da cianobactérias os fármacos podem causar alterações sobre a produção de microcistinas (YE *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2016; CEBALLOS-LAITA *et al.*, 2015). Tendo em vista os relatos de efeitos que fármacos podem causar sobre cianobactérias, especificamente a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, mais estudos são necessários para identificar quais são esses efeitos.

5.5.2. *Microrganismo teste: cianobactéria Microcystis aeruginosa*

Testes de toxicidade em organismos aquáticos podem ser realizados em qualquer espécie aquática, porém a escolha das espécies deve levar em conta as características: a) seletividade constante e elevada aos contaminantes; b) elevadas disponibilidade e abundância; c) uniformidade e estabilidade genética nas populações; d) representatividade de seu nível trófico, e) significado ambiental em relação à área de estudo; f) ampla distribuição e importância comercial; g) facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. (COSTA *et al.*, 2008).

Entre as características mencionadas acima as cianobactérias possuem elevada disponibilidade e abundância; representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial; facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório.

As cianobactérias, comumente chamadas de algas verdes ou azuis, são microrganismos procariontes e fotoautótrofos, ou seja, utilizam luz para produzir oxigênio e compostos orgânicos essenciais. Acredita-se que tenham contribuíram para a geração de oxigênio na atmosfera da Terra há mais de 3 bilhões de anos. São amplamente distribuídas pelo mundo em diferentes ambientes como: oceanos, água doce, rocha e solo (PERCIVAL & WILLIAMS, 2014; RASMUSSEN *et al.*, 2008). Nos sistemas aquáticos podem crescer na coluna de água (planctônica), agregada a superfície

d'água (metafítica), fixadas a outras algas, cianobactérias ou macrófitas (epífitas), ou fixadas ao substratos (bentônica) (CATHERINE *et al.*, 2013).

Outra característica desse microrganismo é a síntese de compostos secundários entre eles substâncias tóxicas (cianotoxinas). As toxinas são produzidas e armazenadas dentro das células de cianobactérias, produtoras de cianotoxinas, durante o seu crescimento. A liberação ocorre quando o microrganismo morre ou com a lise e senescência das células (MÜLLER & RAYARODRIGUEZ & CYBIS, 2009). As cianotixinas geralmente são divididas em três grandes grupos: hepatotoxinas, neurotoxinas e substâncias irritantes ao contato (dermatotoxinas) (CARMICHAEL & BOYER, 2016). Bortoli & Pinto (2015) compilaram informações sobre as principais cianotoxinas, bem como os microrganismos produtores, mecanismos de ação e toxicidade. Essas informações estão apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24. Principais cianotoxinas, organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia da exposição aguda

Toxina	Organismos Produtores (Gêneros)	Mecanismo de ação	DL50 *	Sintomatologia a exposição aguda
Microcistinas	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon, Synechocystis, Aphanocapsa, Oscillatoria</i>	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	50 - >1200 µg/Kg i.p. ratos	Prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Nodularinas	<i>Nodularia</i>	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	30 – 50 µg/Kg i.p. ratos	Prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Saxitoxinas (PSPs)	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cyndrospermopsis</i> e também algumas espécies de dinoflagelados	Bloqueio dos canais de sódio.	10 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada
Anatoxina-a	<i>Anabaena, Oscillatoria, Cyndrospermum, Aphanizomenon, Microcystis</i>	Agonista nicotínico irreversível	200 – 250 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia.
Anatoxina-a (S)	<i>Anabaena</i>	Inibição da acetilcolinesterase	20 µg/Kg i.p. ratos	Paralisia progressiva, fraqueza muscular, diminuição da frequência respiratória e convulsões. Salivação intensa. Morte ocorre por falência respiratória.
Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis raciborskii, Umezakia, Aphanizomenon, Raphidiopsis, Anabaena</i>	Inibição da síntese protéica	2100 µg/Kg i.p. ratos em 24h; e 200 µg/Kg i.p. ratos em 72h	Desestruturação e necrose do fígado, danos em células renais, cardíacas, pulmonares e também da mucosa gástrica.
Dermatotoxinas	Cianobactérias em geral	Induz inflamação e também resposta imune do tipo IgE.	-	Dermatites em geral e prurido. Irritação nos olhos, pele, febre tontura, fadiga e gastroenterite.
Lyngbyatoxina	<i>Lyngbyamajuscula</i>	Efeitos gastrointestinais	250 µg/Kg i.p. ratos	Aumento da secreção gástrica, promove a inflamação, edema pulmonar, irritação gastrointestinal e promoção de tumor dérmico.
Aplysiatoxina	<i>Stylocheilus longicauda, Lyngbyamajuscula</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal.
Debromoaplysiatoxina	<i>Schizotrix calcicola e Oscillatoria nigroviridis</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal.

Legenda: * A DL50 representa o valor da dose de toxina letal a 50% dos animais expostos. Representada por µg de toxina/Kg de peso corpóreo. (i.p. – via de administração intraperitoneal).

Fonte: BORTOLI & PINTO, 2015.

Por meio da tabela acima, nota-se que o gênero *Microcystis sp.* é produtor das cianotoxinas: microcistina e anatoxina-a.

- ***Microcystis aeruginosa***

A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* é um microrganismo de água doce com morfologia celular esférica (de 3 a 7 µm de diâmetro), distribuída de modo irregular, de conteúdo verde-azulado, acinzentado ou amarelado, dependendo da espécie e se organizam em colônias (BICUDO & MENEZES, 2006; GUIRY & GUIRY, 2015) (ver Figura 22) . **Erro! Fonte de referência não encontrada.**Em situações favoráveis podem se proliferar em excesso, ocasionando as florações e em episódios de floração tóxica é a espécie mais comumente encontrada (RASTOGI & SINHA & INCHAROENSAKDI, 2014). Esse microrganismo está relacionado a inúmeros relatos de florações tóxicas na Itália (FUNARI *et al.*, 2017), China (SU *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2012), Angola (NDLELA *et al.*, 2016), Estados Unidos (LOFTIN *et al.*, 2016; CARMICHAEL & BOYE, 2016) Índia (CHATURVEDI *et al.*, 2015), Canadá (PERRI & GREGORY & BOYER, 2015); França (TRINCHET *et al.*, 2013).e Brasil (BORTOLI *et al.*, 2014; DÖRR *et al.*, 2010).

Figura 22. Fotomicrografia da espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing.

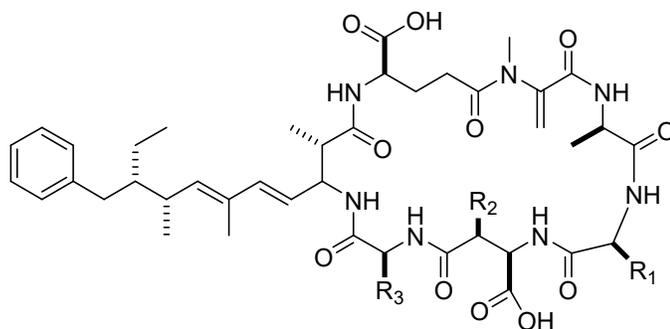


Fonte: GUIRY & GUIRY, 2015.

Entre as cianotoxinas produzidas por essa espécie está microcistina. A microcistina é hepatotóxica e apresenta massa molecular que varia de 900 a 1100 Da. Essa diferença na massa é fruto do grande número de variantes descritas (BORTOLI & VOLMER, 2014), e atualmente já foram apresentadas mais de 100 (VESTERKVIST *et al.*, 2012).

As microcistinas são peptídeos monocíclicos compostos por 7 aminoácidos, ligados por meio de ligações peptídicas a estrutura geral que é ciclo(-D-Ala-X-D-eritro-p-metil-Asp-Y-Adda-D-Glu-N-metil-dehidro-Ala), onde X e Y são dois aminoácidos variáveis (X= leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y); e Y= arginina (R), alanina (A) ou metionina (M)). As combinações XY de heptapeptídeos geram as variantes LR, LA, YA, YM, YR, RR, e Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico (PREECE *et al.*, 2017; CARMICHAEL *et al.*,1992). Na Figura 23 é representada a fórmula estrutural geral dessa toxina.

Figura 23. Fórmula estrutural geral da microcistina.



Entre as centenas de variantes existentes, a LR é a mais comum e também a mais tóxica já relatada (SHARMA *et al.*, 2012). Esse composto pode ser produzido por uma variedade de espécies de *Microcystis* sp. como: *M. viridis*, *M. botrys* e *M. novacekii*. Entretanto a *M. aeruginosa* é a principal espécie produtora desse composto, e normalmente a presença dessa espécie está associada a florações tóxicas (CARMICHAEL & BOYER, 2016). As microcistinas são solúveis em água e absorvidas rapidamente pelo organismo e se acumulam no fígado (MEREL *et al.*, 2013). O mecanismo de ação tóxica da microcistina consiste na inibição irreversível das fosfatases hepáticas PP1 e PP2A que levam a alterações no metabolismo celular e normalmente estão relacionados à origem dos sintomas decorrentes da intoxicação. Os sintomas incluem: gastroenterite, reações de irritação e doenças hepáticas, incluindo necrose hepática, câncer e, eventualmente, morte (FONTANILLO & KÖHN, 2017).

Relatos de casos de intoxicação por microcistina em animais são comuns (RANKIN *et al.*, 2013; BACKER *et al.*, 2013; SEBBAG, *et al.*, 2013). Entretanto o maior incidente envolvendo humanos ocorreu no Brasil, em Caruaru (1996) (POURIA

et al., 1998). A partir desse caso a Organização Mundial de Saúde – OMS, orientou que o valor máximo permitido em água potável fosse de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a MC variante LR (WHO, 1997). No Brasil a Portaria 2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) segue o estabelecido pela OMS e incluiu o monitoramento dessa toxina para água destinada ao abastecimento público.

5.6. Objetivos do capítulo

O presente capítulo tem por objetivo avaliar a ecotoxicidade causada pela cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) sobre o crescimento celular, produção de microcistina total e viabilidade celular da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08). Para isso foi necessário determinar o crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08) exposta a diferentes concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF por espectrofotometria; Quantificar a produção de microcistinas totais por LC-MS/MS pelo microrganismo teste em relação à exposição aos fármacos pesquisados e verificar o efeito dos fármacos sobre a viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo.

5.7. Parte experimental

5.7.1. Avaliação da ecotoxicidade da CAF, FLX, LVX e BZF sobre o crescimento, produção de microcistina e viabilidade celular da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08)

Para avaliação da ecotoxicidade da CAF, FLX, LVX e BZF sobre as cepas toxigênicas *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 foram monitorados os seguintes parâmetros: crescimento celular; produção de cianotoxinas (microcistinas) intra e extracelular, e viabilidade celular. O preparo do experimento para a verificação dos efeitos de fármacos sobre a cianobactéria *M. aeruginosa* (LTPNA 08) foi realizado conforme o descrito a seguir.

- **Manutenção da cultura da cepa *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08)**

A linhagem *M. aeruginosa* cepa LTPNA 08, produtora de microcistinas MC-LR, MC-YR e MC-RR, foi isolada do reservatório Salto Grande, em Americana - SP (22°45'40"S, 47°09'5"W) (CARNEIRO et al., 2013). A cepa tem sido mantida na coleção de cianobactérias do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP) desde seu isolamento, em 2007.

Para manutenção da cultura, a linhagem LTPNA 08 foi cultivada em meio ASM-1 (GORHAN et al., 1964), pH 8,0, cuja composição está descrita a seguir. As culturas foram mantidas sem aeração, à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com um fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro) e sob baixa intensidade luminosa ($20 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A medida de irradiância foi avaliada empregando-se um sensor qu\u00e2ntico (QSL-100, Box – Biospherical Instruments Inc.) imerso at\u00e9 o fundo de um Erlenmeyer contendo \u00e1gua destilada, com o mesmo volume das culturas, e os subcultivos foram realizados a cada 20 dias.

- **Preparo do meio ASM-1**

Primeiramente foram preparadas as solu\u00e7\u00f5es estoque A, B, C e D que comp\u00f5em o meio ASM-1 utilizado como fonte de nutrientes pelos microrganismos:

- i. Solu\u00e7\u00e3o estoque A: em balan\u00e7a anal\u00edtica foram pesados: 1,70 g de NaNO_3 , 0,41 g de $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, 0,49 g de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ e 0,29 g de $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$, em seguida, os

respectivos sais foram transferidos para um balão de 200 mL e solubilizados em água ultra pura. Após completa solubilização, o volume foi completado com água ultra pura.

- ii. Solução estoque B: 0,68 g de KH_2PO_4 e 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram pesados em balança analítica e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Os mesmos foram solubilizados e o volume do balão completado com água ultra pura.
- iii. Solução estoque C: pesou-se em balança analítica 2,48 g de H_3BO_3 ; 1,39 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,08 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,335 g de ZnCl_2 ; 0,019 g de CuCl_2 e 0,0014 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os sais foram transferidos para um balão de 100 mL e o volume completado com água ultra pura.
- iv. Solução estoque D: 1,86 g de $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ previamente pesados em balança analítica foram transferidos para um balão de 100 mL e volume completado com água ultra pura.

Todas as soluções foram homogeneizadas e na seqüência o conteúdo foi acondicionado em frascos de vidro devidamente identificados em geladeira a -8°C . Feito isto, aproximadamente 300 mL de água ultra pura foram acrescentados em balão de 1 L e depois adicionou-se 20 mL da solução estoque A; 2 mL da solução estoque B; 0,1 mL da solução estoque C e 0,4 mL da solução estoque D. A seguir, completou-se o volume (q.s.p) com água ultra pura e homogeneizou-se a solução por inversão do balão (10X). A mesma foi transferida para um béquer de 1 L e, com o auxílio de um pHmetro, o pH foi ajustado para 8,0.

- Preparo inóculo da cianobactéria LTPNA 08

Em dois Erlenmeyers de 1 L foram colocados aproximadamente 400 mL de meio ASM-1 e o frasco foi fechado com rolhas previamente preparadas com gaze e algodão. Após serem autoclavados (121°C por 20 minutos), os mesmos foram deixados a temperatura ambiente até que esfriassem. Em uma capela de fluxo, previamente higienizada com álcool 70% e Luz UV por 20 min, com o auxílio de um bico de Bunsen, aproximadamente 300 mL de inóculo da cepa *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08 foram transferidos para os frascos contendo meio ASM-1. Feito isto, os frascos foram fechados e colocados na incubadora por 21 dias, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), intensidade luminosa ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de

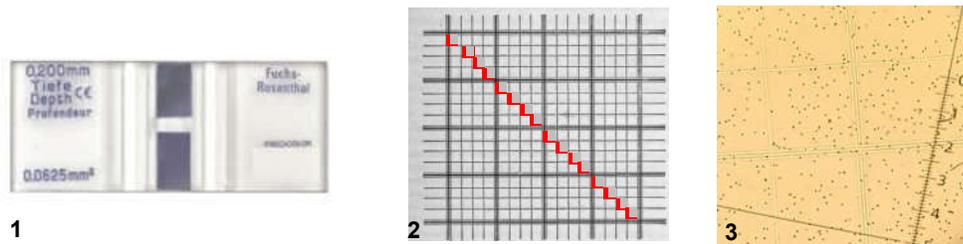
14:10 h (claro:escuro), afim de que o crescimento celular do inóculo atingisse a fase exponencial.

- **Contagem celular do inóculo de *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08)**

Para a determinação do volume de inóculo, utilizado no experimento o mesmo foi definido a partir da contagem celular. Para isso um pequeno volume da cultura de células foi aliqotado em capela de fluxo laminar, previamente desinfetada. Após, as amostras foram fixadas com lugol, e a contagem realizada em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, com o auxílio de microscópio óptico (Primo Star, Zeiss). Se necessário, foram realizadas diluições do inóculo em 1:10, 1:100 e 1:1000 respectivamente, sendo o fator de diluição incluso no cálculo para se determinar o número de células.mL⁻¹.

A contagem de células foi realizada a partir de pelo menos 16 campos, dispostos em diagonal e para diminuir a incerteza da contagem (Figura 24) apenas as células no interior destes campos e sobre as linhas da esquerda e inferiores foram consideradas. O resultado da contagem foi expresso em número de células. mL⁻¹. Na Figura 24 estão representados (1) o hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, (2) os critérios de contagem adotados, e (3) a imagem real das células de *Microcystis aeruginosa* observadas por meiodo microscópio, com aumento de 10 vezes.

Figura 24. Hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal (1), critérios de contagem adotados (2) e a imagem real vista através do microscópio, aumento de 10X (3).



Legenda: 1 = hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal; 2 = 16 campos contados e os critérios de contagem adotados; 3 = Imagem da contagem celular de uns dos controles, diluído 1:10, corado com lugol e visualizado através da objetiva de 10X.

Após a contagem celular o número de células contadas foi então multiplicado por um fator de correção (5000) e pelo fator de diluição (10, ou 100 ou 1000).

- Preparo das soluções de cafeína, fluoxetina, levotiroxina e bezafibrato utilizadas no experimento com *Microcystis aeruginosa*

- **Solução mãe de Cafeína**

A solução mãe de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) foram preparadas no dia do experimento a partir de padrão analítico, obtidos da *Sigma-Aldrich*[®] e *Council of Europe (European Pharmacopeia Standard)*. E o padrão secundário de FLX obtido por doação do LAT– USP. Em balança analítica pesou-se os fármacos, separadamente, e após os mesmos foram transferidos para *vials* âmbar de 4 mL e o volume completado com água ultra pura até que a concentração de 1 mg.mL⁻¹ fosse atingida.

- **Solução de trabalho**

Duas soluções de trabalho (100 mg.L⁻¹ e 10 mg.L⁻¹) foram preparadas para cada fármaco a partir das respectivas soluções mãe, nos dias de experimento, utilizando como diluente água ultrapura. As diluições foram realizadas em capela de fluxo, devidamente desinfetada utilizando-se frascos, seringas e membranas de filtração estéreis.

5.7.1.1. Experimento com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08)

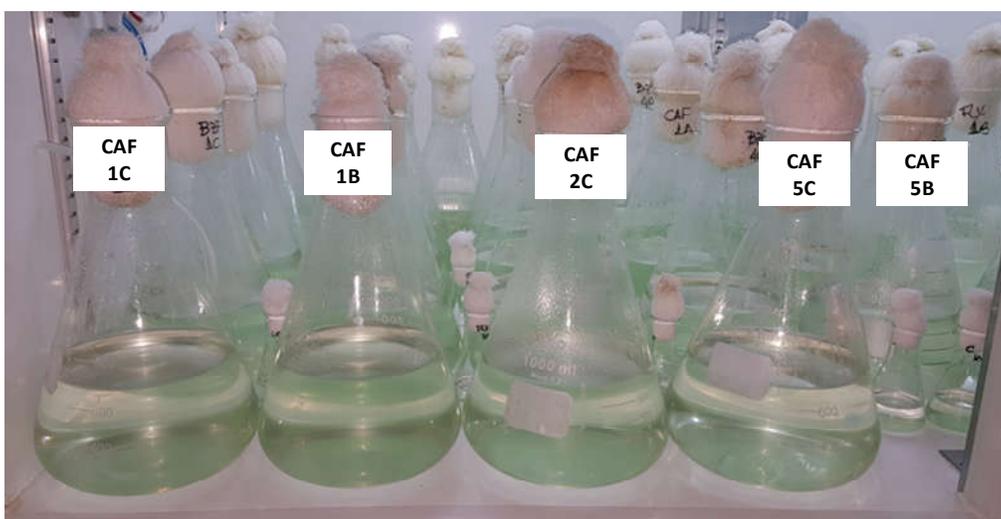
Em frascos de 1L foram adicionados 700 mL de meio ASM-1 e na sequência foram autoclavados. Após o completo resfriamento dos mesmos, em capela de fluxo laminar (previamente desinfetada) 20 mL do inóculo foi adicionado a fim de que a concentração celular inicial fosse de aproximadamente 10⁵. Por causa da falta de espaço na incubadora o experimento foi conduzido em batelada, sendo o mesmo dividido em dois momentos de cultivo. Um grupo foi exposto a FLX e outro a LVX durante 24 dias e os dois grupos restantes, expostos a CAF e BZF também foram cultivados por 24 dias, assim como seus respectivos controles. As culturas foram expostas as concentrações de 5, 10, 20, 30 e 50 µg.L⁻¹ de CAF, FLX, LVX e BZF, em triplicata, e seis culturas (não expostas) compuseram o grupo controle em cada um dos períodos monitorados. Com o intuito de promover a comparação dos resultados obtidos para o efeito da exposição aos fármacos sobre a produção de microcistina total, buscou-se o preparo de mais 6

cultivos, expostos a maior concentração de FLX e LVX durante o mesmo período de incubação dos grupos exposto a CAF e BZF.

Todos os frascos foram incubados durante 24 dias sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), intensidade luminosa ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoper\u00edodo de 14:10 h (claro:escuro). Amostragens foram realizadas a cada tr\u00eas dias para acompanhar o crescimento celular (t3; t6; t9; t12; t15; t18; t21 e t24) e a cada seis dias (t6; t12; t18 e t24), para verificar a produ\u00e7\u00e3o de microcistina total (fra\u00e7\u00e3o intra e extracelular) e viabilidade celular.

Na Figura 25 as culturas expostas aos f\u00e1rmacos no T=0, montagem do experimento, podem ser visualizadas.

Figura 25. Erlenmeyers contendo os cultivos de *M. aeruginosa* LTPNA 08, expostos as cinco diferentes concentra\u00e7\u00f5es dos compostos CAF, FLX, LVX e BZF (n=3).



- **Avalia\u00e7\u00e3o do crescimento celular da *Microcystis aeruginosa***

O crescimento celular foi avaliado por meio de espectrofotometria. Tal an\u00e1lise foi poss\u00edvel porque existe uma correla\u00e7\u00e3o entre densidade \u00f3ptica e n\u00famero de c\u00e9lulas (Myers & Curtis & Curtis; 2013). Por isso, tendo em vista o grande n\u00famero de amostras e a correla\u00e7\u00e3o existente optou-se por realizar o acompanhamento do crescimento com base na an\u00e1lise espectrofotom\u00e9trica.

As medidas foram realizadas em triplicata (com homogeneiza\u00e7\u00e3o das culturas entre as medidas), em cubetas de 1,5 mL, com caminho \u00f3ptico de 1 cm, a 750 nm (Espectrofot\u00f4metro *Thermo Scientific Evolution 200*). Os controles foram monitorados

por espectrofotometria e contagem celular (ver item 5.4.3.), para que ao final do experimento uma equação de reta pudesse ser gerada a partir da correlação entre absorbância e número de células.mL⁻¹. Essa equação foi utilizada para converter os valores de absorbância medidos em número de células.mL⁻¹.

- **Avaliação da produção de microcistina total**

O monitoramento da produção de microcistina (variantes MC-LR; MC-RR e MC-YR) pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa* cepa LTPNA 08 foi realizado com o objetivo de investigar se a exposição à CAF, FLX, LVX e BZF seria capaz de interferir na produção da mesma pelo microrganismo teste.

A quantidade de microcistina produzida pelo microrganismo foi determinada utilizando-se um método por LC-MS/MS desenvolvido pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) e utilizado na dissertação de Kinoshita (2015).

Para avaliar o efeito dos fármacos sobre a produção de microcistina (MC), alíquotas de cada frasco nos tempos t6, t12, t18 e t24 foram coletadas e filtradas por meio de pré-filtros de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro (Sartorius, Alemanha), com o auxílio de um sistema de filtração a vácuo. O material retido no filtro foi utilizado para a determinação da fração intracelular (fração particulada) da MC e o filtrado para quantificação da fração extracelular (fração dissolvida) (NICHOLSON *et al.*, 1994; LAWTON *et al.*, 1994).

Os filtros com material retido, dobrados ao meio, foram embalados em papel alumínio e armazenados em *freezer* a -20°C por até 1 mês. O filtrado foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL sob as mesmas condições do material retido até a análise.

- **Preparo das amostras para a determinação da fração intracelular**

Para o preparo das amostras contendo a fração intracelular os filtros foram cortados ao meio e transferidos para tubos Falcon de 15 mL. Em seguida 3 mL de metanol 70% foi adicionado ao mesmo e então os tubos contendo as culturas foram submetidos à lise celular e extração, com o auxílio de uma sonda de ultrassom (OmniSonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer - OMNI International, EUA) sob intensidade de 30% por 1 minuto. Após, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm/5 min a 15°C, para que o sobrenadante fosse aliquoteado e reservado. O procedimento foi repetido por mais duas

vezes, totalizando assim três ciclos de extração. O material extraído foi seco utilizando-se um concentrador de amostras a 35 °C sob fluxo de nitrogênio, e então ressuspendido em 1 mL de metanol 70%. Na seqüência o mesmo foi filtrado em membranas de PVDF de 0,45 µm (Millipore, EUA) para posterior análise cromatográfica.

- **Preparo das amostras para a determinação da fração extracelular**

Para a análise da fração extracelular de MC, 50 mL do filtrado foi congelado e submetido à liofilização por 7 dias. Em seguida, o material seco foi ressuspendido em 1 mL de MeOH 70%. Antes da análise cromatográfica filtrou-se a amostra, com o auxílio de uma seringa, utilizando-se uma membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore, EUA).

Em todas as etapas de preparo das amostras para a determinação das frações intra e extracelular o padrão interno foi adicionado.

✓ Determinação de microcistina total (LR, YR e RR) frações intra e extracelular por LC-MS/MS

Para a avaliação da produção de microcistina intra e extracelular foi utilizado um cromatógrafo líquido (*Agilent*[®] 1260 *Infinity*), acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo (6460 *Triple Quad LC/MS*, Agilent Technologies, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo. Os parâmetros da fonte estão apresentados na Tabela 25 abaixo.

Tabela 25. Parâmetros da fonte utilizados no espectrômetro de massa para o método de quantificação das MC's

Parâmetros da fonte	Valor/unidades
Capilar	3500V
Gás nebulizador	45 psi
Gás secante	Vazão 5L.min ⁻¹ ; Temperatura 300° C

Por meio do analisador triplo quadrupolo foi possível realizar o Monitoramento de Reações Múltiplas – MRM, sendo que o íon precursor monitorado para a MC-YR, MC-LR e MC-LA estava na forma $[M+H]^+$, enquanto que para a MC-RR na forma $[M+2H]^{2+}$. As transições iônicas (íons precursores e produtos) monitoradas pelo método estão apresentadas na Tabela 26.

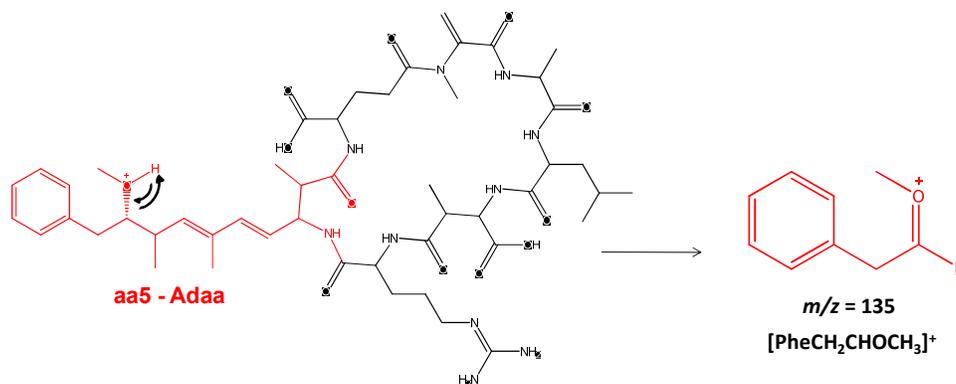
Tabela 26. Íons qualificadores e quantificadores monitorados por MRM no método por LC-MS/MS.

Composto	Íon Precursor(<i>m/z</i>)	Íon Produto(<i>m/z</i>)
MC-YR	1045,5	135*
MC-YR	1045,5	213
MC-LR	995,5	135*
MC-LR	995,5	213
MC-LA	910,5	135*
MC-LA	910,5	213
MC-RR	519,9	135*
MC-RR	519,9	213
PI (Ciclosporina)	1220,7	1203,3*
PI (Ciclosporina)	1220,7	309,3

*Legenda = íon quantificador.

Ao se observar a Tabela 26 percebe-se a presença de íons produtos comuns as três variantes de microcistinas. Isto ocorre porque o íon produto característico (*m/z* 135) forma-se pela clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda das MC's (ver Figura 26). Tal característica pode ser utilizada para a identificação de MC's no ambiente diferenciando-as de possíveis interferentes (YUAN *et al.*, 1999; MCELHINEY & LAWTON, 2005).

Figura 26. Clivagem alfa da cadeia lateral do resíduo Adda das MC-LR e formação do íon *m/z* 135 (analisado por ESI em modo positivo).



Fonte : Dörr *et al.*, 2010.

Para a análise cromatográfica utilizou-se uma coluna Synergi 4 μ Fusion-RP 80A (150 x 2,0 mm, 4 μ m; Phenomenex, EUA), bem como uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel era composta por H₂O a 2 mM de formiato de amônio e

0,1% de ácido fórmico (A) e ACN:H₂O (90:10; v/v) (B) a 2mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (B). A eluição foi realizada empregando-se gradiente (ver Tabela 27) sob vazão de FM igual a 0,25 mL.min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 5µL.

Tabela 27. Gradiente utilizado para a análise de MC-LR e RR por LC-MS/MS.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	65	35
10	50	50
11	0	100
13	0	100

O retorno as condições iniciais do gradiente de FM e re-equilíbrio da coluna foi realizado após 13 minutos de análise e teve duração de 6 minutos.

- **Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular da linhagem LTPNA 08 foi avaliada com o intuito de verificar se a exposição à CAF, FLX, LVX e BZF foi capaz de alterar a permeabilidade das membranas celulares dos microrganismos. Para isso utilizou-se a técnica de citometria de fluxo.

A viabilidade celular foi determinada inicialmente após 24 horas (t= 1 dia) e 72 horas (t= 3 dias) de exposição aos fármacos, caracterizando um ensaio de toxicidade aguda. Porém as culturas celulares foram acompanhadas até o vigésimo quarto dia, a cada seis dias (t6= 6 dias, t12= 12 dias, t18= 18 dias e t24= 24).

De cada frasco teste foram preparados 2 tubos de citometria. Por isso 1 mL das culturas foi aliqotado e transferido para tubos de citometria novos e previamente limpos. A um deles adicionou-se corante SYTOX® Green (Invitrogen, USA) e ao outro tampão fosfato-salino (PBS) diluído em água MilliQ (1:10). Os controles positivos do corante foram preparados a partir de 1 mL de controle do experimento, submetido a lise (sonicador por 30" a potencia > 50%).

Na seqüência todos os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos e o meio ASM-1 contendo os fármacos foi descartado por inversão completa do tubo. Após transferiu-se 300 µL de SYTOX 0,2 µmol.L⁻¹ para metade do tubos e 300 µL de PBS

para os tubos restantes (grupo de células não marcadas). O grupo marcado com corante foi incubado no escuro por 5 minutos.

As soluções de $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (solução de trabalho) e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (solução intermediária) de SYTOX® Green foram preparadas nos dias de análise utilizando-se como diluente PBS diluído em água ultrapura (1:10). A solução intermediária por sua vez foi preparada a partir de uma solução mãe de SYTOX $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, cujo diluente usado pelo fabricante era dimetil sulfóxido. A mesma foi acondicionada a -20°C e só era retirada do *freezer* nos momentos de preparo das soluções. As soluções do corante foram preparadas em frascos âmbar sob condições de baixa luminosidade. Todas as etapas que envolveram o preparo das amostras foram padronizadas por Kinoshita (2015) e Dörr (2016).

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, para isso um citômetro de fluxo do tipo FACS CANTOTM II (*Becton Dickinson*, USA) foi utilizado, com o auxílio da Mestre Renata Chaves Albuquerque. Os parâmetros avaliados pelo citômetro foram: granulosidade/complexidade (*SideScatter*, SSC), tamanho das células (*ForwardScatter*, FSC), e viabilidade celular. Sendo esta última monitorada por meio de 4 fluorocromos: FITC, para detecção de células marcadas com SYTOX® Green, e PerCP, APC e PE, para detecção da autofluorescência da clorofila, ficocianina e ficoeritrina, respectivamente. Sendo estes pigmentos naturalmente presentes nas células testadas. O SYTOX® Green (*Invitrogen*, USA) possui alta afinidade com ácido nucléico e penetra apenas nas membranas celulares danificadas, emitindo fluorescência verde quando excitado a fontes de 450-490 nm. Os canais usados nas leituras estão representados na Tabela 28.

Tabela 28. Canais de leitura dos fluorocromos analisados e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.

Laser / Canal	Pigmento	λ excitação	λ emissão
Azul / PerCP	Clorofila a	448	670
Azul / PE	Ficoeritrina	448	585
Azul / FITC	SYTOX® Green	448	530
Vermelho / AC	Ficocianina	633	660

A viabilidade celular foi determinada com base na fluorescência de cada fluorocromo. Para isso foi necessário delimitar os *gates* para selecionar as populações celulares e determinar a intensidade de fluorescência das células situadas nas regiões de

interesse. A aquisição de 10.000 eventos para a linhagem LTPNA 08 foram realizadas, utilizando o *software* FACS DIVA e o *software* FlowJo para o processamento dos mesmos. Nesta pesquisa de doutorado os resultados foram apresentados com base na porcentagem de células não-viáveis.

- **Determinação do decaimento da concentração de CAF, FLX, LVX e BZF**

Durante o experimento foi realizado o monitoramento do decaimento da concentração de fármacos ao longo dos 24 dias de exposição nos seguintes intervalos: t6, t12, t18 e t24. Um mililitro do filtrado utilizado para a determinação das microscistinas na fração extracelular, foi aliquoteado em *vials* de 1,8 mL e posteriormente analisado, por meio do método desenvolvido e validado nessa pesquisa de doutorado (capítulo I). Antes da análise cromatográfica foi adicionado a cada *vial* o PI (FLX-d6) a fim de que a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ fosse atingida.

- **Análise estatísticas dos resultados**

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) e para cada variável experimental foi avaliada a normalidade. Quando os dados foram considerados paramétricos, uma análise de variância (One-way ANOVA) foi realizada, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas e pelo teste de Dunnet para comparar os tratamentos *versus* controle. Todos os testes foram realizados com uma significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o *Software* estatístico *Graphpad prism 5*®.

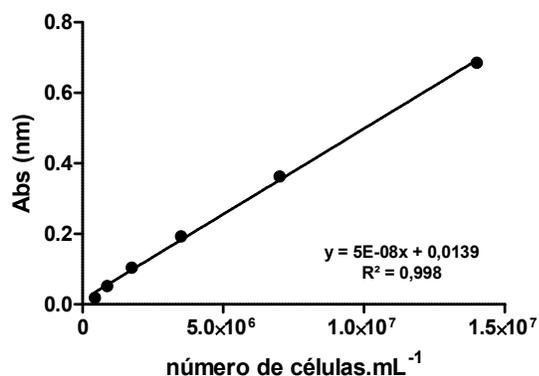
5.8. Resultados e Discussões

5.8.1. Avaliação da ecotoxicidade da CAF, FLX, LVX e BZF sobre o crescimento, produção de microcistinas e viabilidade celular da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (cepa LTPNA 08)

- **Avaliação do crescimento celular da *Microcystis aeruginosa***

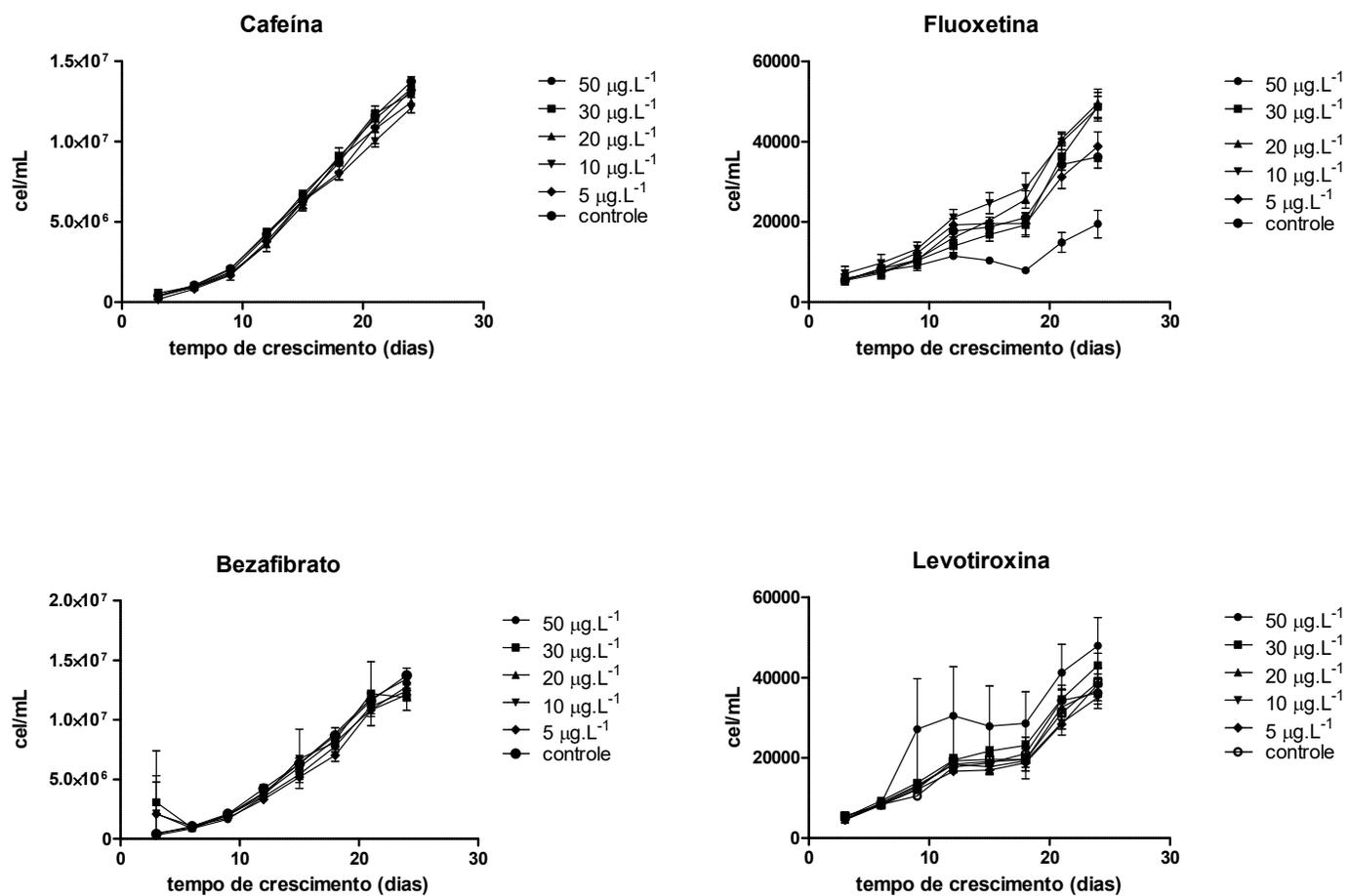
Para a avaliação do crescimento celular foram realizadas contagens dos controles ao longo do tempo de experimento e estas foram correlacionadas com a absorbância. Na Figura 27 o gráfico e a equação de reta são apresentados.

Figura 27. Curva de Linearidade, equação de reta e R^2 obtidos por meio do nº de células.mL⁻¹ versus absorbância (nm) (n=3).



As leituras de absorbância foram normalizadas pela equação de reta (Figura 25) e os valores obtidos para a curva de crescimento foram expressos em termos de número de células.mL⁻¹. As culturas expostas aos fármacos foram monitoradas durante 24 dias e as curvas de crescimento em relação às concentrações avaliadas podem ser visualizadas na Figura 28.

Figura 28. Curvas de crescimento da *Microcystis aeruginosa* (LTPNA 08) ao serem expostas a cinco concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF, e controle, ao longo de 24 dias de exposição. Cada ponto do gráfico é representado pela média \pm desvio padrão.



Com base na Figura 28 nota-se que apenas a concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de FLX e LVX parecem influenciar o crescimento celular. Porém, para que tal inferência pudesse ser realizada, buscou-se a aplicação de análises estatísticas para averiguar o efeito dos fármacos sobre o crescimento celular. Para isso, a taxa de crescimento de cada grupo exposto às diferentes concentrações foi determinada, ao longo do tempo. O modelo matemático aplicado levou em consideração a fase exponencial do crescimento celular, ou seja, até o décimo oitavo dia de experimento. Por meio das curvas de crescimento foi possível determinar as taxas intrínsecas de crescimento, pela equação da regressão exponencial [1], de acordo com Reynolds (2006).

$$[1] N = N_0^{rn.t},$$

Onde, N é o número de células no tempo (t), N_0 é o número inicial de células e rn é a taxa intrínseca de crescimento. Na Tabela 29 os valores das taxas de crescimento são expressos em termos de média e desvio padrão.

Tabela 29. Taxas de crescimento da *M. aeruginosa* frente às diferentes concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF, bem como do controle. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão.

Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Taxa de crescimento (Média \pm DP)				
	Cafeína	Fluoxetina	Levotiroxina	Bezafibrato	Controle
50	0,218 \pm 0,011	0,015 \pm 0,001	0,093 \pm 0,012	0,214 \pm 0,021	
30	0,196 \pm 0,020	0,087 \pm 0,016	0,091 \pm 0,001	0,187 \pm 0,006	
20	0,202 \pm 0,014	0,102 \pm 0,013	0,088 \pm 0,006	0,197 \pm 0,002	
10	0,188 \pm 0,016	0,098 \pm 0,013	0,084 \pm 0,005	0,201 \pm 0,024	
5	0,254 \pm 0,040	0,089 \pm 0,016	0,089 \pm 0,109	0,169 \pm 0,011	
					0,201 \pm 0,010 ^a
					0,085 \pm 0,002 ^b

Legenda: ^a = Controle (CAF e BZF); ^b = Controle (FLX e LVX);

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se as taxas de crescimento. Com base nesse parâmetro foram observadas diferenças entre as taxas de crescimento para os microrganismos exposto a FLX, entretanto a diferença foi percebida apenas para a concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,05$) após análise estatística pelo teste de Tukey, tanto em relação ao controle quanto as demais concentrações de fármaco avaliadas. Para a CAF, LVX e BZF não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações averiguadas e os controles.

Com base nas análises estatísticas pode-se inferir que a concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de FLX inibiu o crescimento da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* LTPNA 08. Por meio das taxas de crescimento foram determinadas as porcentagens de inibição. Segundo Liu *et al.* (2014), a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) pode ser determinada pela seguinte equação:

$$\text{PIC (\%)} = 100 \times (\mu_c - \mu_t) / \mu_c$$

Onde, μ_c = taxa de crescimento do controle e μ_t taxa de crescimento dos grupos expostos as concentrações testadas.

Em relação ao controle a concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de FLX inibiu o crescimento em 82,3 % após 18 dias. Esse valor de inibição foi semelhante àqueles causados pela exposição a antibióticos. Wang & Zhang & Guo (2017) verificaram que os antibióticos florfenicol e tiamfeicol inibiram o crescimento em 46% e 56% quando as concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram avaliadas. Wan *et al.* (2015) obtiveram valores de inibição do crescimento igual a 81,6% quando expôs a *M. aeruginosa* a concentração de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de eritromicina. Liu *et al.* (2014) também observaram inibição decorrente da exposição a esse mesmo antibiótico.

Para antiinflamatórios não esteroidais como ibuprofeno e diclofenaco a porcentagem de inibição foi de 7,6% a 38% respectivamente, para o décimo dia de exposição (BÁCSI *et al.*, 2016). Outros compostos além de fármacos também causaram inibição no crescimento da *M. aeruginosa*. Park *et al.* (2009) verificaram que os compostos extraído da casca do arroz (*Oryza sativa*), β -sitosterol- β -D-glicosídeo e dicitohexanil, inibiram o crescimento da *M. aeruginosa* em 66% e 80% respectivamente.

A concentração efetiva que causa efeito a 50% dos organismos-teste, CE_{50} , foi determinada com base nas curvas de crescimento obtidas. Considerando o crescimento da condição controle 100%, ou seja, 0% de inibição sobre o crescimento, pôde-se calcular os valores de CE_{50} para a FLX por meio do *Software Graphpad Prism 5* ®. A CE_{50} obtida para a FLX foi de 31,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para a CAF, LVX e BZF não foram observados efeitos, de tal modo que a CE_{50} não pôde ser determinada, mas pode-se inferir que as mesmas sejam superiores a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Esse resultado foi semelhante ao verificado por Backhaus *et al.* (2011) que obteve CE_{50} igual a 35,84 $\mu\text{g.L}^{-1}$ quando a toxicidade da FLX foi investigada sobre os componentes fotossintéticos naturais de perifítons. A CE_{50} verificada por Johnson *et al.* (2007) foi igual a 44,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após a exposição da microalga verde *Pseudokirchneriella*

subcapitata a uma mistura de inibidores da recaptação de serotonina (fluoxetina, fluvozamina e sertralina).

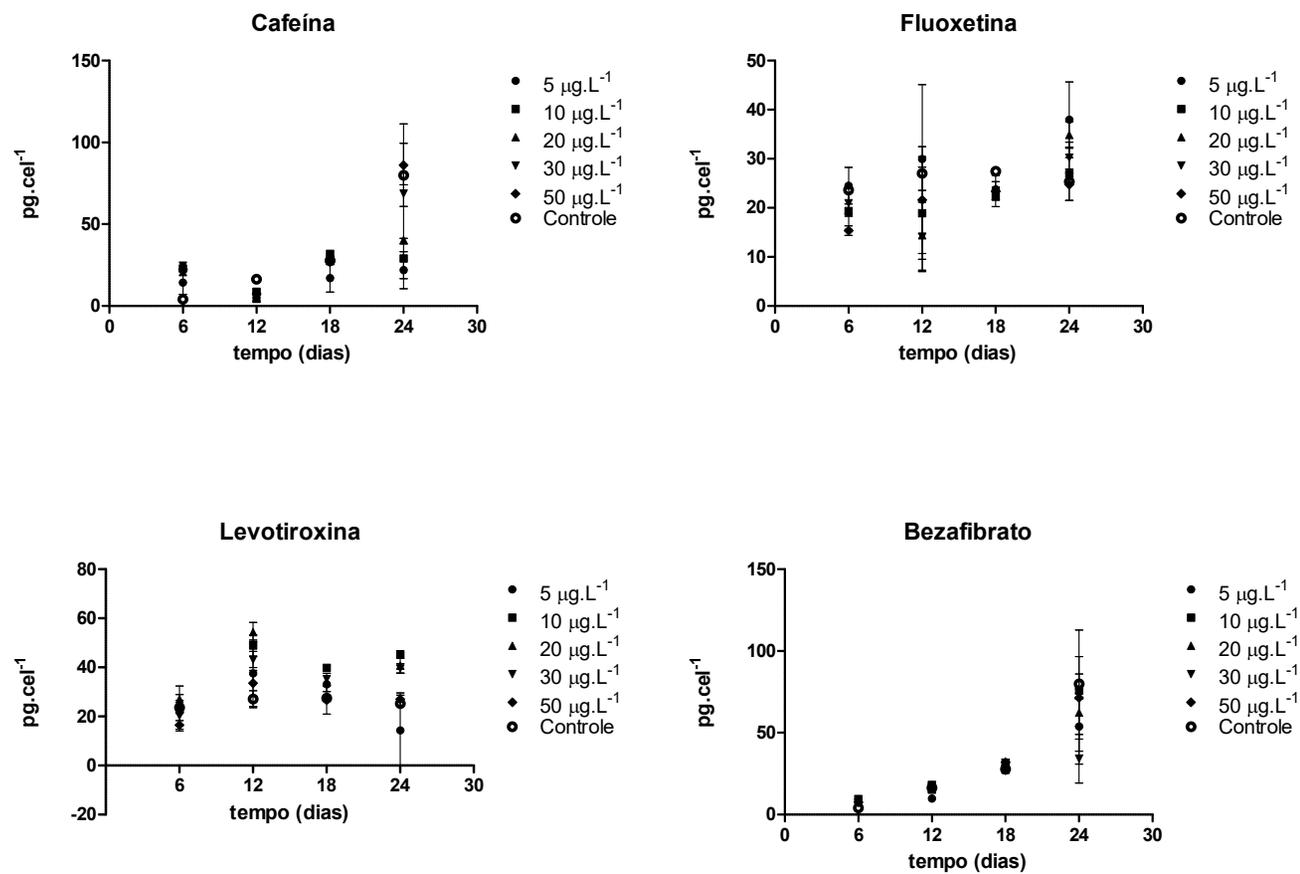
Atualmente os antidepressivos têm sido estudados em associação a outros fármacos no combate de infecções fúngicas e bacterianas. Os antidepressivos aparentemente alteram diversos mecanismos genéticos associados à virulência e síntese de proteínas em fungos (GU *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2012). Essas informações, embora sobre fungos, sugerem que a FLX poderia causar alterações genéticas em outros microrganismos. Recentemente Macedo *et al.* (2016) verificaram que antidepressivos causam efeito sobre bactérias presentes do intestino humano. Munoz-Bellido & Munoz-Criado & Garcia-Rodríguez (2000) verificaram que a fluoxetina, assim como a sertralina apresentam atividade antimicrobiana. Moreira *et al.* (2015) observaram o efeito da FLX sobre bactérias presentes em reator aeróbio granular, e esse composto foi capaz de interferir na remoção do fósforo e amônia realizada por esses microrganismos. Embora os estudos mencionados nesse parágrafo tenham aplicações diferentes, todos relatam o efeito da FLX sobre fungos e bactérias reforçando os resultados obtidos nessa pesquisa de doutorado, ou seja, que a FLX tem ação sobre o crescimento da cianobactéria *M. aeruginosa* (LTPNA 08).

- **Avaliação da produção de microcistina total**

- ✓ Produção de microcistina total frações intra e extracelular

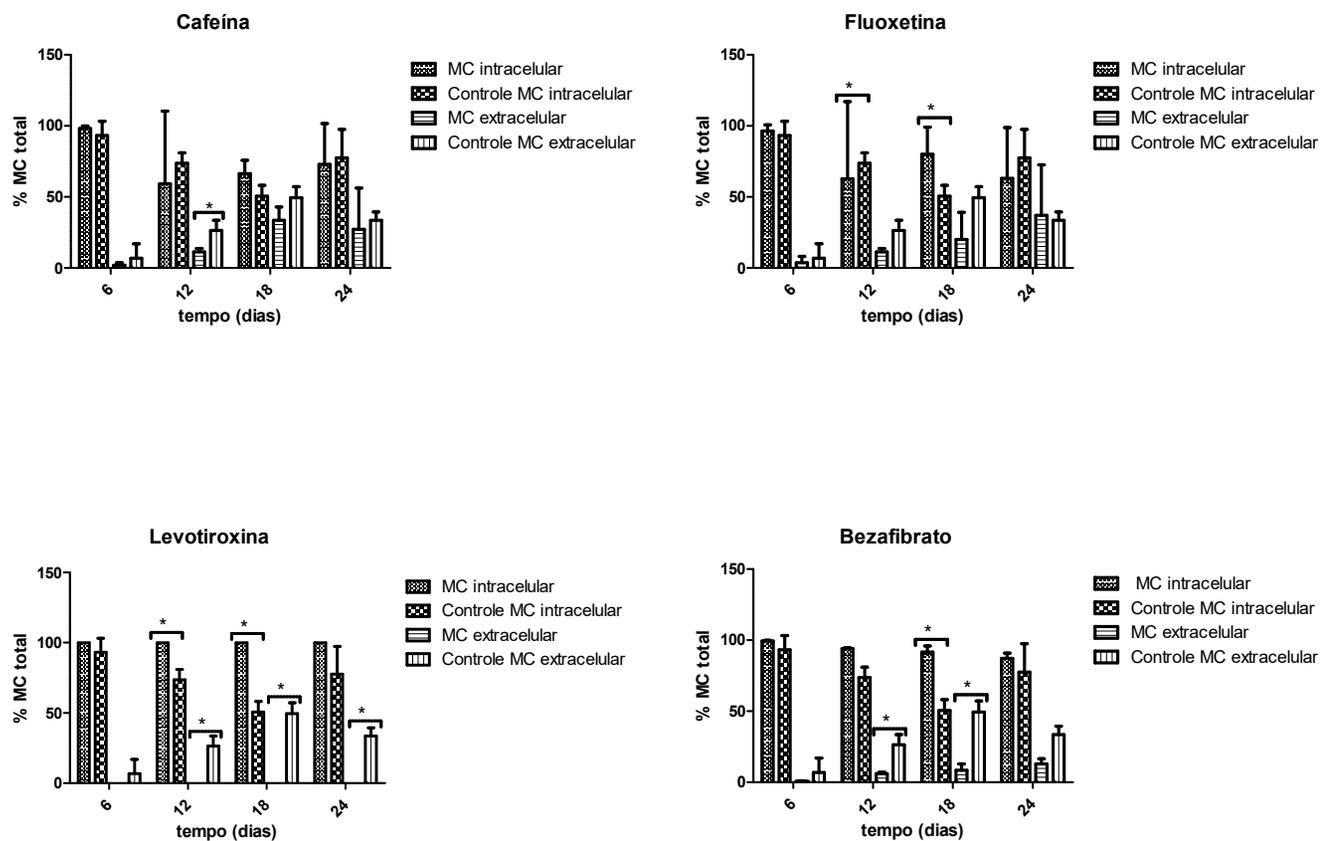
Ainda durante esse experimento a produção de microcistina total (LR, YR e RR), fração intracelular e extracelular foram avaliadas. Inicialmente optou-se por demonstrar a variação da microcistina total, fração intracelular para todas as concentrações dos fármacos testadas ao logo do tempo de monitoramento (ver Figura 29).

Figura 29. Produção de MC total intracelular (Média ± DP), frente às concentrações testadas e ao período amostrado.



Por meio da Figura 29 percebe-se que a produção de microcistinas (MC) intracelular aumenta ao longo do período monitorado para a CAF, BZF e o controle. Contudo para a FLX e LVX tem-se que a produção oscila ao longo o tempo. Entretanto, com base nos dados obtidos e com o intuito de favorecer a interpretação dos efeitos decorrentes da exposição aos fármacos, optou-se por representar os resultados em relação a MC total, frações intra e extracelular em relação à exposição à concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CAF, FLX, LVX e BZF ao longo do tempo. Para isso o somatório das microcistinas frações intra e extracelular foram considerados iguais a 100% e a partir desse valor as porcentagens de MC intra e extracelular foram determinadas. Os gráficos gerados para cada composto podem ser verificados na Figura 30.

Figura 30. Efeito da exposição à concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CAF, FLX, LVX e BZF sobre a produção de MC total, frações intra e extracelular (média \pm DP) produzidas pela *M. aeruginosa* durante 24 dias de exposição.



Legenda: As barras horizontais indicam entre quais grupos foi verificada a diferença e os asteriscos (*) representam valores de $p < 0,05$ após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet.

Observando-se o gráfico referente à CAF na Figura 30 tem-se que o composto parece não influenciar ($p > 0,05$) a produção de microcistinas totais tanto para a fração intracelular quanto para a extracelular em relação ao controle, nos tempos t6, t18 e t24, porém no t12 o composto parece ter inibido a liberação da fração extracelular sem interferir na produção da fração intracelular. A FLX parece não causar efeito ($p > 0,05$) sobre a produção de MC intracelular e liberação da fração extracelular no sexto dia de análise, entretanto no 12^o dia o composto inibiu a produção de MC intracelular em relação ao controle ($p < 0,05$), porém para a fração extracelular a FLX não causou efeito ($p > 0,05$). No dia 18 o efeito observado foi ao contrário, ou seja, o composto parece estimular ($p < 0,05$) a produção de MC intracelular em relação ao controle, contudo ele não influenciou na liberação da fração extracelular ($p > 0,05$). No vigésimo quarto dia de experimento não foram observadas diferenças quanto à produção de MC intracelular e liberação da fração extracelular em relação ao controle.

A LVX parece inibir a liberação da fração extracelular pela cianobactéria ao longo do tempo de exposição. Embora no tempo t6 não tenha sido verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre o grupo exposto e o controle. Todavia, para os demais tempos analisados a fração extracelular não foi liberada. Comparando-se a produção da MC intracelular com o controle observou-se que nos dias 12 e 18 o composto estimulou ($p < 0,05$) a produção de microcistina.

Por meio do gráfico apresentado para o BZF na Figura 28, percebe-se que no tempo 6 dias e 24 dias não houve diferença ($p > 0,05$) entre as MCs produzidas e liberadas (intra e extracelular) tanto pelo grupo exposto quanto pelo controle. No 12^o não houve diferença ($p > 0,05$) entre a produção de MC intracelular pelo grupo exposto ao BZF em relação ao controle, entretanto o composto parece ter inibido ($p < 0,05$) a liberação de microcistina extracelular ao comparar-se com o controle. Contudo no 18^o observou-se que o composto estimulou a produção de MC intracelular ($p < 0,05$) e inibiu a liberação da fração extracelular ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Ceballos-Laita *et al.* (2015) verificaram o efeito do ibuprofeno, atenolol, diclofenaco e paracetamol sobre o crescimento e a produção de MC total fração intracelular em cepas de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Entre os efeitos observados estava a redução da produção da MC intracelular pelos microrganismos expostos ao paracetamol. Tal resultado é semelhante ao verificado para a FLX no tempo 12 dias, LVX nos tempos t12 e 18 e BZF no 18^o dia. Entretanto, Ceballos-Laita *et al.* (2015) não verificaram efeito do ibuprofeno sobre a produção de MC total fração intracelular.

Nesse mesmo estudo os autores avaliaram o efeito dos fármacos sobre a expressão do gene relacionados à síntese de microcistina (*mcy*). O paracetamol gerou uma redução significativa na transcrição desse gene. Os dados produzidos por estes pesquisadores são indicativos de que fármacos podem interferir na regulação da produção de microcistina e que, mais estudos seriam necessários para verificar os efeitos da FLX, LVX e BZF sobre a expressão de genes relacionados à produção de microcistinas.

Em 2016, Daí *et al.* publicaram um estudo sobre os fatores que afetam a produção de microcistinas por cianobactérias em ambientes aquáticos. Entre os fatores relacionados pelos autores estão a presença de fármacos. Os efeitos mais comuns decorrentes da exposição de cianobactérias a fármacos e MPOP's são a inibição do crescimento e aumento da produção de microcistinas (LIU *et al.*, 2014; POLYAK & ZAYTSEVA & MEDVEDEV, 2013; LIU *et al.*, 2012).

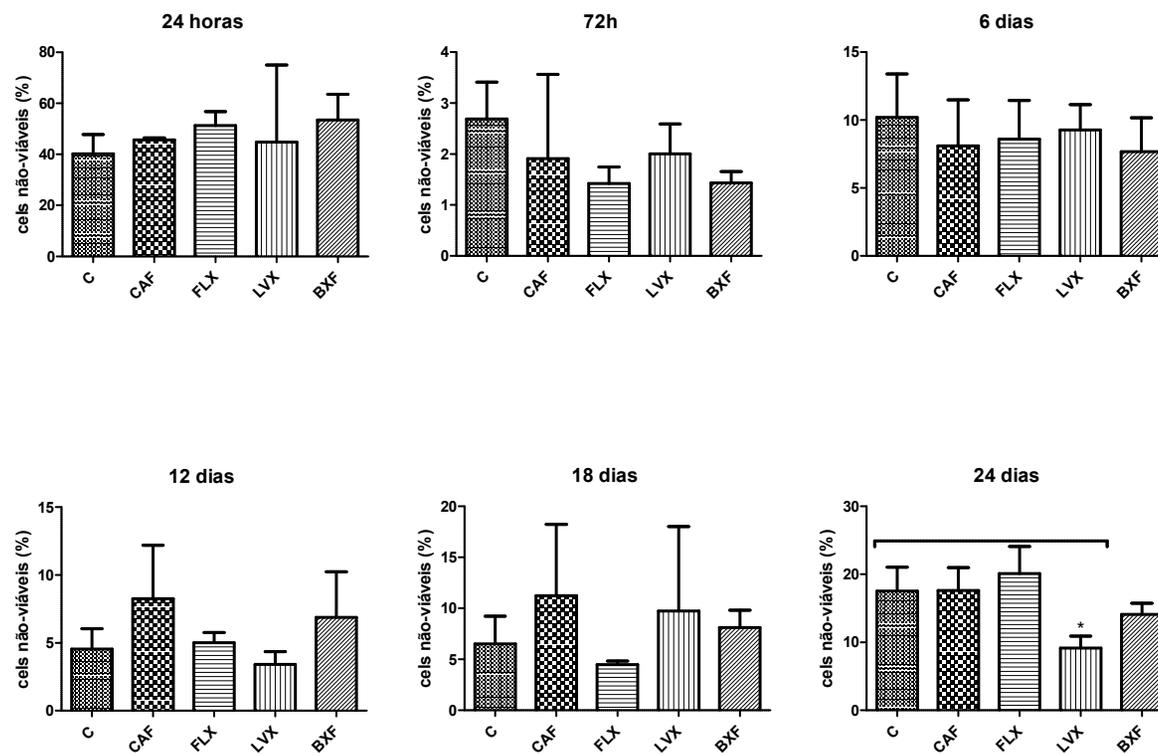
De modo geral nenhum dos compostos (CAF, FLX, LVX e BZF) parece ter favorecido a liberação de MC extracelular. Resultado semelhante foi obtido por recentemente por Ye *et al.* (2017). No estudo os pesquisadores investigaram os efeitos da tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina sobre a cianobactéria *M. aeruginosa* e verificaram que a clortetraciclina diminuiu a capacidade da célula liberar a fração extracelular da MC-LR enquanto que a produção da fração intracelular foi estimulada. Entretanto o composto que apresentou maior toxicidade para o microrganismo foi a tetraciclina, pois reduziu simultaneamente as frações intra e extracelular.

Os dados gerados por essa pesquisa de doutorado são interessantes, pois em termos ecotoxicológicos observou-se efeito sobre a produção e liberação de MC, ao longo dos 24 dias de cultivo pela *M. aeruginosa*. A liberação da fração extracelular pode estar associada à alteração da viabilidade celular (MÜLLER; RAYARODRIGUEZ & CYBIS, 2009). Por isso a análise da viabilidade celular foi verificada.

- **Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada para todos os tempos e concentrações monitorados. Entretanto, após a análise estatística optou-se por representar graficamente apenas os dados decorrentes da exposição à maior concentração de fármacos avaliada. Na Figura 31 os gráficos são representados em termos da porcentagem de células não viáveis em relação ao tempo amostrado para a concentração de 50 µg.L⁻¹ de CAF, FLX, LVX e BZF.

Figura 31. Variação da viabilidade celular (Média ± DP) ao longo de 24 dias em relação à exposição à CAF, FLX, LVX e BZF na concentração de 50 µg.L⁻¹.



Legenda: As barras horizontais indicam entre quais grupos foi verificada a diferença e os asteriscos (*) representam valores de $p < 0,05$ após análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey.

Analisando-se a Figura 31 tem-se que no tempo de 24 horas o número de células não viáveis é o maior de todos os tempos observados, seguido pelo tempo de 24 dias. Entretanto, ao se comparar os grupos monitorados (CAF, FLX, LVX, BZF e o controle) para esse tempo, tem-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$), ou seja, nenhum grupo foi considerado diferente do controle. Portanto, a alteração observada, pode ter ocorrido por uma questão de adaptação ao novo meio de cultivo. Valentim (2004) diz que a primeira fase de crescimento é a de latência (fase lag) e ocorre logo após a inoculação de uma cepa em um meio de cultivo, sendo uma fase de curta duração, na qual não se nota crescimento celular, podendo inclusive ocorrer um declínio na quantidade de células. Portanto isso poderia justificar as maiores porcentagens observadas para o tempo 24horas.

Com base na comparação entre os grupos avaliados tem-se que nos tempos de 24h e 72h de exposição não se verificou toxicidade aguda, pois as alterações na permeabilidade da membrana também ocorreram no controle. Não foi possível correlacionar o tempo de exposição aos fármacos com uma possível toxicidade crônica. Pois, ao se comparar a viabilidade celular ao longo dos 24 dias de monitoramento não houve diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$) para esse parâmetro avaliado.

A integridade da membrana celular da *M. aeruginosa* foi avaliada por DALY & HO & BROOKES (2007) após processo de cloração e os autores observaram correlação entre integridade e eficiência do processo de cloração. Outros estudos também utilizaram citometria de fluxo para verificar a viabilidade celular (FAN *et al.*, 2014; LOU *et al.*, 2013). Tendo em vista que esta técnica é eficiente para verificar a integridade/permeabilidade da membrana celular os resultados obtidos corroboram com o verificado anteriormente no qual os compostos não estimularam a liberação da fração extracelular das microcistinas, sugerindo que a CAF, FLX, LVX e BZF não alteraram a permeabilidade celular da *M. aeruginosa*.

- **Decaimento da concentração de CAF, FLX, LVX e BZF**

O decaimento das concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF foi monitorado ao longo dos 24 dias. Os gráficos apresentados na Figura 32 e 33 representam o decaimento observado apenas para a maior concentração de fármacos analisada. Isso porque houve um padrão semelhante para as demais concentrações.

Figura 32. Decaimento da concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Média \pm DP) de CAF e BZF ao longo do tempo.

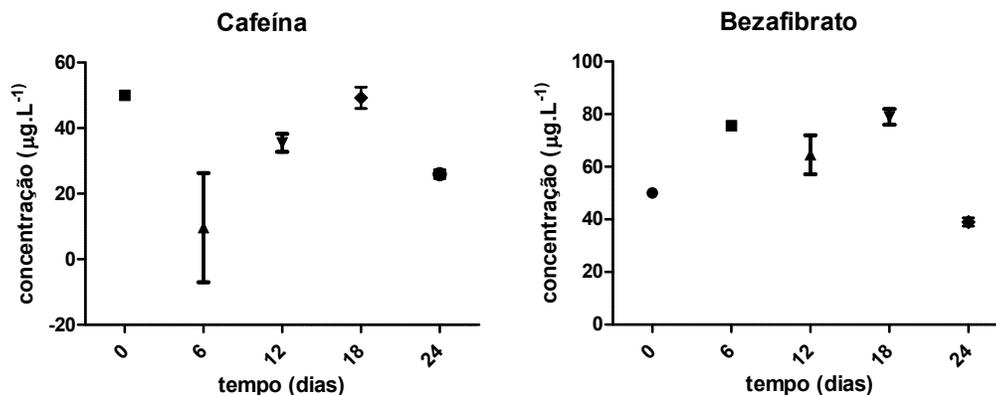
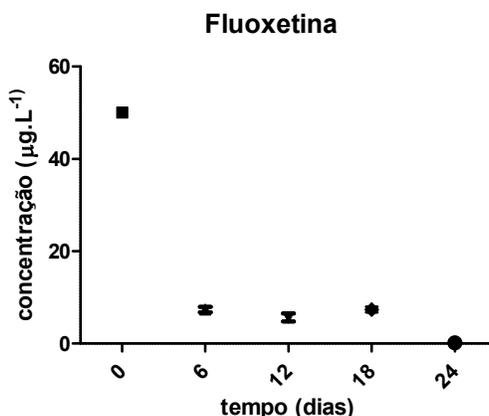


Figura 33. Decaimento da concentração de FLX (Média \pm DP) ao longo de 24 dias.



Para a concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de CAF e BZF o decaimento oscilou ao longo do tempo, porém foi observado decaimento da concentração em relação ao tempo inicial. Cermola *et al.* (2005) verificaram que o BZF pode ser estável sob certas condições ambientais. O decaimento da LVX não pôde ser determinado, pois conforme mencionado no capítulo I a mesma provavelmente foi degradada a T3 e a outros compostos intermediários.

O declínio da concentração de FLX (Figura 31) sugere que a mesma pode ter sido assimilada pelos microrganismos, principalmente nos primeiros dias de cultivo. Entretanto com base apenas nos experimentos realizados não se pode afirmar que isso tenha ocorrido, pois a FLX pode ter sido degradada ao longo do tempo. Trawiński & Skibiński (2017) publicaram uma revisão bibliográfica sobre processos de

fotodegradação de fármacos psicotrópicos, e nesse estudo há inúmeras citações a instabilidade desse fármaco sob a exposição à luz.

Os dados resultantes desse estudo permitem inferir que o efeito da FLX sobre o crescimento da cianobactéria é bastante semelhante aos efeitos causados pelos antibióticos (Wang & Zhang & Guo, 2017; Wan *et al.* 2015). Isso pode ter ocorrido por causa da ação antibacteriana que os antidepressivos possuem (Munoz-Bellido & Munoz-Criado & García-Rodríguez, 2000). Efeitos semelhantes aos causados por antibióticos também foram observados em relação a liberação da fração extracelular das MC's (Ye *et al.*, 2017). A inibição da liberação da fração extracelular foi confirmada por meio da análise da viabilidade celular, na qual foi verificada que os compostos não causaram alteração na permeabilidade da membrana em relação ao controle.

Em relação ao valor de CE_{50} determinada para a FLX tem-se que os valores obtidos são cerca de 10.000 vezes maiores do que o verificado no Rio Cotia (Capítulo II). Entretanto, seria relevante averiguar os efeitos tóxicos sobre a cianobactéria *M. aeruginosa* decorrentes da exposição a concentrações ambientais de FLX.

5.9. Conclusões do capítulo

O presente capítulo avaliou os efeitos ecotoxicológicos causados pela exposição da cianobctérias *M. aeruginosa* linhagem toxigênicas (cepa LTPNA 08) à diferentes concentrações de CAF, FLX, LVX e BZF. Para isso verificou-se os efeitos sobre o crescimento celular, produção de microcistinas totais (frações intra e extracelular) e viabilidade celular. A partir dos resultados pode-se concluir que:

- A maior concentração de FLX ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) inibiu o crescimento celular da *M. aeruginosa* (cepa LTPNA 08).
- A CAF, LVX e BZF não causaram efeito sobre o crescimento celular do microrganismo avaliado.
- Todos os fármacos inibiram a liberação da fração extracelular de MC's totais em pelo menos um dos tempos averiguados para a maior concentração de fármacos investigada.
- A produção de MC intracelular foi estimulada pela LVX no décimo segundo e oitavo dia, enquanto que para a FLX e BZF isso foi observado apenas no dia 18.
- Os compostos não alteraram a viabilidade da membrana celular ao longo dos 24 dias de monitoramento para a maior concentração testada.
A LVX parece ter diminuído a permeabilidade celular da membrana em relação ao controle no vigésimo quarto dia de experimento.

Os resultados apresentados acima são inéditos, pois não foram encontrados na literatura estudos que tenham avaliado o efeito desses fármacos sobre a cianobactéria *M. aeruginosa*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a presença de CAF, FLX, LVX e BZF em amostras de água oriundas de oito mananciais do estado de São Paulo, bem como os efeitos ecotoxicológicos decorrentes da exposição da cianobactéria *M. aeruginosa* a esses compostos e as considerações finais são apresentadas a seguir.

A determinação da presença de cafeína (CAF), fluoxetina (FLX), levotiroxina (LVX) e bezafibrato (BZF) em mananciais do estado de São Paulo foi realizada e para isso um método foi desenvolvido e validado de acordo com a RDC nº 166 da ANVISA e demonstrou-se adequado pois permitiu a detecção de CAF, FLX e BZF em amostras ambientais de água.

Os mananciais estudados estavam impactados pela presença de fármacos principalmente CAF (16466 - 6,6 ng.L⁻¹) que foi detectada em todas as amostras analisadas. Tais resultados são semelhantes aqueles relatados pela CETESB e outros estudos para os Rios Cotia, Sorocaba e Reservatório do Guarapiranga.

Os níveis de FLX (3,2 – 1,2 ng.L⁻¹) e BZF (11 – 322,0 ng.L⁻¹) monitorados também são próximos aqueles verificados por outros pesquisadores em diferentes regiões do globo. A LVX não foi detectada nas amostras analisadas ou estava abaixo do seu limite de detecção.

A FLX inibiu o crescimento da *M. aeruginosa* em 82,3% após a exposição à maior concentração avaliada (50 µg.L⁻¹) e a CE₅₀ encontrada foi de 31,4 µg.L⁻¹. Os demais fármacos parecem não influenciar o crescimento do microrganismo. A concentração de 50 µg.L⁻¹ de FLX, LVX e BZF aparentemente inibiram a liberação de microcistinas totais (fração extracelular) em relação ao controle. A CAF parece não alterar a produção de MC extracelular, exceto para o décimo segundo dia de análise. Porém mais estudos são necessários para averiguar os mecanismos envolvidos.

A CAF não interferiu na produção de MC intracelular, porém os demais compostos possivelmente interferiram na produção nos tempos 12 e 18 dias. Os fármacos parecem não causar efeito sobre a viabilidade celular, exceto para a LVX na maior concentração ao vigésimo quarto dia, que aparentemente diminuiu a permeabilidade da membrana em relação ao controle.

Ao final desse estudo, constatou-se que os reservatórios Guarapiranga e Billings, rios Sorocaba, Cotia, Grande, Paraíba e Taiçupeba estão contaminados por fármacos (principalmente CAF) e danos ecotoxicológicos podem ser observados sobre a *M.*

aeruginosa após exposição à CAF, FLX, LVX e BZF, principalmente FLX. Tais informações são relevantes, pois este estudo é pioneiro no país em relação aos efeitos ecotoxicológicos causados por CAF, FLX, LVX e BZF sobre a *M. aeruginosa*. Entretanto, mais estudos são necessários para averiguar os efeitos decorrentes da exposição a concentrações ambientais desses fármacos, bem como seria interessante averiguar alterações genéticas relacionadas à inibição da liberação da fração extracelular da microscistina.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café. Indicadores da indústria de café no Brasil - 2014 . Desempenho da Produção e do Consumo Interno, Período Novembro/2013 a Outubro/2014. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publicue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61>> Acesso em 14/08/2015.

ACEÑ, J.; STAMPACHIACCHIERE, S.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Advances in liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.407, p.6289–6299. 2015.

AFONSO-OLIVARES, C.; CADKOVÁ, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J.; NOVÁKOVÁ, L. Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. **Journal of chromatography A**, n. 1487, p. 54–63, 2017.

AFONSO-OLIVARES, C.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J. Analysis of anti-inflammatory, analgesic, stimulant and antidepressant drugs in purified water from wastewater treatment plants using SPE-LC tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A. v. 47, p. 887–895. 2012.

ALMEIDA, G.A.D.; WEBER, R.R. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 6, n. 2, p. 7 – 13, 2005.

ÁLVAREZ, E.; MADRID, Y.; MARAZUELA, M.D. Comparison of sample preparation strategies for target analysis of total thyroid hormones levels in serum by liquid chromatography quadrupole time-of-flight-mass spectrometry. **Talanta**, v. 164, p. 570-579, 2017.

ALVARINO, T.; SUAREZ, S.; LEMA, J.; OMIL, F. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment Technologies. **Science of the Total Environment**, n. 615, p. 297 – 306, 2008.

AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; ORTEGA, D. J. P.; ORTIZ, I. A. S.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R.; MANOEL, L. O.; CARVALHO, S. L. Monitorio del anti-inflamatorio piroxicam y del anti-hipertensivo atenolol en un arroyo urbano en três lagoas, brasil. **Interciência**, v. 40, n. 10, 2015.

AMY-SAGERS, C.; REINHARDT, K.; LARSON, D.E M. Ecotoxicological assessments show sucralose and fluoxetine affect the aquatic plant, *Lemna minor*. **Aquatic Toxicology**. n.185, p. 76-85, 2017.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: 2013. Brasília-DF, 2013.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Indicadores de Qualidade - Índice de Qualidade das Águas (IQA), 2017.** Disponível em: <<http://portalpnqa.ana.gov.br/indicadores-indice-aguas.aspx>> Acesso em: 02/09/2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC. n.1, 2012. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/boletins/2012/boletim_sngpc_1_2012_modificado.pdf> Acesso em: 30/07/2015.

ASSINI, F. L.; BACK, J. T. Análise das prescrições de psicotrópicos em farmácias privadas na cidade de Monte Carlo, Santa Catarina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 14, n. 2, p. 5-14, 2017.

BACKHAUS, T., PORSBRING, T., ARRHENIUS, A. S., BROSCHE, S., JOHANSSON, P., BLANCK, A. Single-substance and mixture toxicity of five pharmaceuticals and personal care products to marine periphyton communities. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 30, n. 9, p. 2030–2040, 2011.

BACSI, I.; BERES, V. B.; KOKAI, Z.; GONDA, S.; NOVAK, Z.; NAGY, S. A.; VASAS, G. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 508 - 518, 2013, 2016.

BARCELO, D.; DURAN, J. J.; LOPEZ-MARTÍNEZ, J.; ACENA, J.; PEREZ, S.; MASTROIANNI, N.; SILVA, A.; CATALA, M.; VALCARCEL, Y. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 241 – 254, 2017.

BERETTA, M.; BRITTO, V.; TAVARES, T. M.; SILVA, S.M. T.; PLETSCHE, D. L. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. **Soils Sediments**. v. 14, p. 1278 – 1286, 2014.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2ª ed. São Carlos: RiMa, 502 p., 2006.

BIEL-MAESO, M.; BAENA-NOGUERAS, R. M.; CORADA-FERNÁNDEZ, C.; LARA-MARTÍN, P. A. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 646 – 659, 2018.

BITTENCOURT, S.; AISSE, M. M.; SERRAT, B. M.; AZEVEDO, J. C. R. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 43 – 53, 2016.

BOIX, C.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; RAMBLA, J.; ARANDA, J. L.; BALLESTER, S.; HERNÁNDEZ, F. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 131, p. 719–727, 2015.

BORTOLI, S.,PINTO, E. In:Pompeo et al. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios e interfaces**.Sao Paulo : Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Paulo. 2015, cap 21.p. 321-339.

BORTOLI, S.; VOLMER, D. Characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1-19, 2014.

BORTOLI, S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; KRÜGER, T.; DÖRR, F.A.; COLEPICOLO, P.; VOLMER, D. A.; PINTO, E. Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 24, p. 389 – 398, 2014.

BRASIL a. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166/ 2017**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html> Acesso em: 27.09.2017.

BRASIL. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA 357/2005**.Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 11 /06/ 2013.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003**.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria MS 2914/ 2011**. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf>Acesso em: 06/06/2013.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166/ 2017**. Disponível em: < <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>> Acesso em: 07/09/2017.

BRILHANTE, OM., CALDAS, LQA., coord. *Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999. 155 p. ISBN 85-85676-56-6. Disponível em: SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

BU, Q.; SHI, X.; YU, G.; HUANG, J.; WANG, B.; WANG, J. Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments. **Chemosphere**, v. 165, p. 515 – 518, 2016.

BUENO, M.J. M.; AGÜERA, A.; HERNANDO, M. D.; GÓMEZ, M. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 5995–6002, 2009.

C. C. MONTAGNER,*G. A. UMBUZEIRO, C. PASQUINIB AND W. F. JARDIM. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. **Environmental Science Processes & Impacts**. 2014.

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; ARIAS, J. L. O.; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal

care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, v. 146, p. 676-688, 2016.

CAMARGO, R.Y., TOMIMORI, E.K., NEVES, S.C., RUBIO, I.G., GALRÃO, A.L., KNOBEL, M. Thyroid and the environment: exposure to excessive nutritional iodine increases the prevalence of thyroid disorders in Sao Paulo, Brazil. **Eur J. Endocrinol.** v.159, p.293-9, 2008.

CAMPANHA, M. B.; AWAN, A. T.; SOUSA, D. N. R.; GROSSELI, G. M.; MOZETO, A. A.; FADINI, P.S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.7936–7947, 2015.

CAMPOS, K. M.; AFONSO, W. B. B.; ROEWER, S. P. Avaliação do uso de medicamentos antidepressivos dispensados na farmácia básica no município de Barra do Garças – MT. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1, n. 17, p. 318 – 323, 2017.

CANTWELL, M. G.; KATZ, D. R.; SULLIVAN, J. C.; BORCI, T.; CHEN, R.T. F. Caffeine in Boston Harbor past and present, assessing its utility as a tracer of wastewater contamination in an urban estuary. **Marine Pollution Bulletin**, 2016.

CAPOLUPO, M.; VALBONESI, P.; KIWAN, A.; BURATTI, S.; FRANZELLITTI, S.; FABBRI, E. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Science of the Total Environment**. v. 563–564, p. 538 – 548, 2016.

CARDOSO, L. V.; TOMASINI, D.; SAMPAIO, M. R. F.; CALDAS, S. S.; KLEEMANN, N.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F F. Optimization and Validation of a Method using SPE and LC-APCI-MS/MS for Determination of Pharmaceuticals in Surface and Public Supply Water. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 22, n. 10, p. 1944-1952, 2011.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W.; BOYER, G. L. Implications for the North American Great Lakes. **Harmful Algae**, v. 54, p. 194 – 2012, 2016.

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.146, p.117–125, 2017.

CARNEIRO, R. L.; SILVA, A. P. R.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Use of the cell quota and chlorophyll content for normalization of cylindropermopsin produced by two *Cylindrospermopsis raciborskii* strains grown under different light intensities. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 93-100, 2013.

CBH- Comitês de Bacias Hidrográficas. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica 2015. São Paulo. Brasil, (2016). Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/relatoriosituacaodosrecursosohidricos>>. Acesso em: 15.09.2017.

- CEBALLOS-LAITA, L.; CALVO, L.; TERESA BES, M.; FILLAT, M. F.; PELEATO, M. L. Effects of benzene and several pharmaceuticals on the growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Limnetica**, v.34, n.1, p. 237-246, 2015.
- CERMOLA, M.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M.R.; PREVITERA, L.; RUBINO, M.; TEMUSSI, F.; BRIGANTE, M. Phototransformation of fibrates drugs in aqueous media. **Environmental Chemistry Letters**. (2005) 3:43–47
- CERQUEIRA, M. B.R.; GUILHERME, J. R.; CALDAS, S. S.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere**, v. 107, p. 74 – 82, 2014.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2015. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo (2014), São Paulo. Brasil.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2016. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo (2015), São Paulo. Brasil.
- CHANG, X.; MEYER, M. T.; N LIU, X.; ZHAO, Q.; CHEN, H.; CHEN, J.; QIU, Z.; YANG, .; CAO, J.; SHU, W. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1444 – 1450, 2010.
- CHATURVEDI, P.; GRAWAL, M.A.; NATH BAGCHI, S. Microcystin-producing and non-producing cyanobacterial blooms collected from the Central India harbor potentially pathogenic *Vibrio cholerae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 67 – 74, 2015.
- CHEN , W.; HUANG, H.; CHEN, C.; QI , S.; PRICE , O. R.; ZHANG, H.; JONES , K. C.; SWEETMAN, A. J. Simultaneous determination of 20 trace organic chemicals in waters by solid-phase extraction (SPE) with triple-quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS) and hybrid quadrupole Orbitrap high resolution MS (Q-Orbitrap-HRMS). **Chemosphere**, v. 163, p. 99-107, 2016.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, n.3, p.623-636, 2008.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G.;. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1820 - 1830, 2008.
- CRH – Coordenadoria de Recursos Hídricos Situação dos Recursos Hídricos no Estado de São Paulo 2015. São Paulo, Brasil (2017).
- CROTTI, A. E. M. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova** v.29, n. 2, p.287-292, 2006.

CRUZ, F. F.; LEITE, C. E.; KIST, L. W.; OLIVEIRA, G. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B. Effects of caffeine on behavioral and inflammatory changes elicited by copper in zebrafish larvae: Role of adenosine receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 194, p. 28 – 36, 2017.

DAÍ, R.; WANG, P.; JIA, P.; ZHANG, Y.; CHU, X.; WANG, Y. A review on factors affecting microcystins production by algae in aquatic environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, Ed, 51, 2016.

DALY, R.; HO, L.; BROOKES, J.. Effect of Chlorination on *Microcystis aeruginosa* Cell Integrity and Subsequent Microcystin Release and Degradation. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4447 – 4453, 2007.

DENADAI, M.; CASS, Q. B. Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with direct injection: A green approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1418, p. 177 – 184, 2015.

DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 82, p. 199–207, 2016.

DING, J.; ZOUA, H.; LIU, Q.; ZHANG, RAZANAJATOVO, R. M. Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 142, p. 102 – 109, 2017.

DONG, Z.; SENN, D. B.; MORAN, R. E.; SHINE, J. P. Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. n.65, p. 60–67, 2013.

DÖRR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.6, p. 1247 – 1256, 2010.

DRURY B., SCOTT, J., MARSHALL, E. J. R., KELLY, J. J. Triclosan Exposure Increases Triclosan Resistance and Influences Taxonomic Composition of Benthic Bacterial Communities. **Environ. Sci. Technol.** v.47, p. 8923–8930, 2013.

ELLIOTT, S. M.; VANDERMEULEN, D.D. A regional assessment of chemicals of concern in surface waters of four Midwestern United States national parks. **Science of the Total Environment**. 2016.

EMPLASA – EMPRESA PAULISTA DE PLANEJAMENTO METROPOLITANO S/A. Região Metropolitana de São Paulo: Sobre a RMSP. Disponível em: <<https://www.emplasa.sp.gov.br/RMSP>>. Acesso em 05.05.2016.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2.ed. 2014.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7^a Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2010.

EC (2001a): Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2001_82/dir_2001_82_en.pdf. Acesso em: 15.10.17.

EC (2001b): Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_en.pdf>. Acesso em: 15.10.2017.

EC (2002). Decisão da Comissão, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN-PT-ES/TXT/?uri=CELEX:32002D0657&fromTab=ALL&from=EN>> Acesso em: 22.09.2017;

FAN, J.; HOBSON, P.; HO, L.; DALY, R.; BROOKES, J.N. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 264, p. 313 – 322, 2014.

FATTA-KASSINOS, D.; MERIC, S.; NIKOLAOU, A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.399, p. 251 – 275, 2011.

FEREIRA, A. M.P.T.; SILVA, L. J.G.; LARANJEIRO, C. S.M.; MEISEL, L. M.; LINO, C. M.; PENA, A. Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1182-1192, 2017.

FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystem. **Caderno Saúde Pública**, v. 21, p. 1884–1892, 2005.

FERRER, I.; ZWEIGENBAUM, J.A.; THURMAN, E. M. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5674–5686, 2010.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**, v.1043, p. 44-62, 2017.

FONG, P.P., HUMINSKI, P.T., D'URSO, LM. Induction and potentiation of parituration in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). **J Exp Zool**. v.4, p.280 – 260,1998.

FONTANILLO, M.;KÖHN, M. Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2017.

FORCISI, S.; MORITZ, F.; KANAWATI, B.; TZIOTIS, D.; LEHMAN, R. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **Journal of Chromatography A**. v.1292, p. 51-6531, 2013.

FUNARI, E.; MANGANELLI, M.; BURATTI, F. M.; TESTAI, E. Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities. *Science of the Total Environment*. v. 598, p. 867–880, 2017.

FURLONG, E. T.; BATT, A. L.; GLASSMEYER, S. T.; NORIEGA, M. C.; KOLPIN, D. W.; MASH, H.; SCHENCK, K. M. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States: Pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, v. 579, p. 1629 – 1642, 2017.

GEADA, P.; PEREIRA, R. N.; VASCONCELOS, V.; VICENTE, A. A.; FERNANDES, B.D. Assessment of synergistic interactions between environmental factors on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production. *Algal Research*. n. 27, p. 235–243, 2017.

Ghiselli, G., & Jardim, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, n.3, p.695–706, 2007.

GIEBUŁTOWICZ, J.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.104, p. 103–109, 2014.

GKELIS, S.; ZAOUTSOS, N. Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach. *Toxicon*, n.78, p. 1 – 9, 2014.

GLASSMEYER, S. T.; FURLONG, E. T.; KOLPIN, D.; BATT, A. L.; BENSON, R.; BOONE, J. S.; CONERLY, O.; DONOHUE, M. J.; KING, D. N.; KOSTICH, M. S.; MASH, H. E.; PFALLER, S. L.; SCHENCK, K.M.; SIMMONS, J.E.; VARUGHESE, E. A.; VESPER, S.J.; VILLEGAS, E. N.; WILSON, V.S. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. *Science of the Total Environment*, 2016.

GOMEZ, M.J.; AGÜERA, A.; MEZCUA, M.; HURTADO, J.; MOCHOLI, F.; FERNANDEZ-ALBA, A.R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by Gas Chromatography –Tandem Mass Spectrometry in wastewater. *Talanta*, v.73, p. 314 - 320. 2007.

GONZALEZ-ALONSO, S.; MERINO, L.M.; ESTEBAN, S.; ALDA, M. L.; GORHAN, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRABIC, R.; FICK, J.; LINDBERG, R. H.; FEDOROVA, G.; TYSKLIND, M. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, n. 100, p. 183–195, 2012.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. n.1248, p. 104–121, 2012.

GU, W.; GUO, D.; ZHANG, L.; XU, D.; SUN, S. Synergistic Effect of Azoles and Fluoxetine against Resistant 2 *Candida albicans* Attributed to Attenuating Fungal Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.60, n.10, p. 61798 – 6188, 2016.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 10/01/2015.

GUMBI, B. P.; MOODLEY, B.; BIRUNGI, G.; NDUNGU, P. G. Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, n., p. 1042-1050, 2017.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3. ed. **The Atrium, Southern Gate, Chichester,; John Wiley & Sons Ltd**, 2007. 502 p.

HYLAND, K.C.; DICKENSON, E. R.V.; DREWES, J.; HIGGINS, C.P. Sorption of ionized and neutral emerging trace organic compounds onto activated sludge from different wastewater treatment configurations. *Water Research*, v. 46, p. 1958 – 1968, 2012.

IBEGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. São Paulo > São Paulo. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=355030>>. Acesso em: 20/10/2017.

ICH – International Conference on Harmonisation. **HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of analytical procedures: Text and Methodology q2(r1)**. Current *Step 4* version Parent Guideline. 1994.

INTRAFARMA (Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa) Guia 2017- Saúde se fax com ética e informação. Dados do Setor. Capítulo 3. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2017/dados-do-setor>. Acesso em: 07.10.2017.

JANK, L.; HOFF, R. B.; COSTA, F. J.; PIZZOLATO, T. M. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and highperformance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. v. 94, n. 10, p.1013–1037, 2014.

JARDIM, W.F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology*, v. 84, p. 3 – 8, 2012.

JOHNSON, D. J., SANDERSON, H., BRAIN, R. A. WILSON, C. J. SOLOMON, K. R. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 67, p. 128–139, 2007.

JOMAA, B.; HERMSEN, S. A. B.; KESSELS, M. Y.; VAN DEN BERG, J. H. J.; PEIJNENBURG, A. A. C. M.; AARTS, J. M. M. J. G.; PIERSMA, A. H.; RIETJENS, I. M. C. M. Developmental Toxicity of Thyroid-Active Compounds in a Zebrafish Embryotoxicity Test. *Altex*, v. 32, n. 3, p. 303 – 317, 2014.

JURADO, A.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, J.; ALDA, M. L.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment*, v. 440, p. 82 – 94, 2012.

KLATTE, S.; SCHAEFER, H. C.; HEMPEL, M. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 5, p. 61 – 66, 2017.

KRUVE a, A.; RIIN, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, n. 870, p. 29–44, 2015.

KRUVE b, A.; RIIN, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, n. 870, p. 8–28, 2015.

KURISSERY, S.; KANAVILLIL, N.; VERENITCH, S.; MAZUMDER, A. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecological Indicators*, v. 23, p. 501–508, 512.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. D. A.; DE ALDA, M. L.; NETO, F. A.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro Brazil. *Environment Int*, v. 35, 397– 1003, 2009.

LANÇAS, F. M.. Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. *Scientia Chromatographica*, v. 5, p. 27-46, 2013.

LARDY-FONTAN, S.; DIOURON, V. L.; DROUIN, C.; LALERE, B.; VASLIN-REIMANN, S.; DAUCHY, X.; ROSIN, C. Validation of a method to monitor the occurrence of 20 relevant pharmaceuticals and personal care products in 167 bottled Waters. *Science of the Total Environment*, v.587–588, p. 118–127, 2017.

LAWRENCE, J.R., ZHU, B., SWERHONE, D.W., ROY, J., TUMBER, V., WAISER, M J., TOPP, E., KORBER, D.R. Molecular and microscopic assessment of the effects of caffeine, acetaminophen, diclofenac, and their mixtures on river biofilm communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 508–517, 2012.

LAWTON, L.A., EDWARDS, C., CODD, G. Extraction and High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. *Analyst*, v.119, p.1525 – 1530, 1994.

LEE, T. A.; ROLLWAGEN-BOLLENS, G.; BOLLENS, S. M.; FABER-HAMMOND, J. J. Environmental influence on cyanobacteria abundance and microcystin toxin production in a shallow temperate lake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.114, p. 318 – 325, 2015.

LEVOTIROXINA . Levotiroxina sódica. Merck S/A. [201 ?]. Bula de remédio.

- LI, H., XU, B., QI, SUN, F. D., CHEN, Z. Degradation of bezafibrate in wastewater by catalytic ozonation with cobalt doped red mud: Efficiency, intermediates and toxicity. **Applied Catalysis B: Environmental**. P.342–351, 2014.
- LISBOA, N.; FAHNING, C.; COTRIM, G.; ANJOS, J. C. P.; ANDRADE, J. B.; HATJE, V.; ROCHA, G.O. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disruptors determination in marine waters **Talanta**, v. 117, p. 168 – 175, 2013.
- LIU, Y., GAO, B., GUAN, Y., WANG, Y., HUANG, L. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.77, p. 79–87, 2012.
- LIU, Y.; ZHANG, J.; GAO, B.; FENG, S. Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 279, p. 145 – 155. 2014.
- LOCATELLI, M.A.F.; SODRÉ, F.F.; JARDIM, W.F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 60, p. 385–393, 2011.
- LOFTIN, K. A.; GRAHAM, J. L. HILBORN, E. D.; LEHMANN, S. C.; MEYER, M. T.; DIETZE, J. E.; GRIFFITH, C. B. Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007. **Harmful Algae**, v. 56, p. 77 - 90, 2016.
- LOPES, V. S.A.; RIENTE, R. R.; SILVA, A. A.; TORQUILHO, D. F.; CARREIRA, R. S.; MARQUES, M. R.C. Development of a solid-phase extraction system modified for preconcentration of emerging contaminants in large sample volumes from rivers of the lagoon system in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 2016.
- LÓPEZ-DOVAL, J. C.; MONTAGNER, C. C.; ALBURQUERQUE, A. F.; MOSCHINI-CARLOS, V.; UMBUZEIRO, G.; POMPÊO, M. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. **Science of the Total Environment**, 2016.
- BACKER, L. C.; LANDSBERG, J. H.; MILLER, M.; KEEL, K.; TAYLOR, T. K. Canine Cyanotoxin Poisonings in the United States (1920s–2012): Review of Suspected and Confirmed Cases from Three Data Sources. **Toxins** 2013, 5, 1597-1628;
- LORZ, C. ; ABBT-BRAUN, G.; BAKKER, F.; BORGES, P.; BÖRNICK, H.; FORTES, L.; FRIMMEL, F. H.; GAFFRON, A.; HEBBEN, HÖFER, N.; MAKESCHIN, F.; NEDER, K.; ROIG, L. H.; STEINIGER, B. STRAUCH, M.; WALDE, D.; WEIB, H.; WORCH, E.; WUMMEL, J. Challenges of an integrated water resource management for the Distrito Federal, Western Central Brazil: climate, land-use and water resources. **Environmental Earth Sciences**, v. 65, p. 1575 – 1586, 2012.
- LOU, L. P.; YUE, Q. K.; LIU, F. X.; CHEN, F.; HU, B. L.; CHEN, Y. X. Ecotoxicological analysis of fly ash and rice-straw black carbon on *Microcystis aeruginosa* using flow cytometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 92, p. 51-56, 2013.

- LUQUE-ESPINAR, J. A.; NAVAS, N.; CHICA-OLMO, M.; CANTARERO-MALAGÓN, S.; CHICA-RIVAS, L. Seasonal occurrence and distribution of a group of ECs in the water resources of Granada city metropolitan areas (South of Spain): Pollution of raw drinking water. **Journal of Hydrology**, n. 531, p. 612 – 625, 2015.
- MACEDO, D.; FILHO, A. J. M.C.; SOUSA, C. N. S.; QUEVEDO, J.; BARICHELLO, T.; JÚNIOR, H.V. N.; LUCENA, D. F. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal of Affective Disorders**, v. 208, p. 22 – 32, 2017.
- MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; SANTANA, J.; CANELA, M. C.; NUNES, C. R.O.; BICHINHO, K. M.; SEVERO, F. J.R. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v.572, p. 138-146, 2016.
- MACHADO, K. S.. Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba, Parana State, Brazil. **Acta Scientiarum. Technology Maringá**, v. 36, n. 3, p. 421-427, 2014.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química. Nova**, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.
- MARION, J. W.; ZHANG, F.; CUTTING, D.; LEE, J. Associations between county-level land cover classes and cyanobacteria blooms in the United States. **Ecological Engineering**, 2017.
- MCELHINEY, J., LAWTON, L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p.219 – 230, 2005.
- MEFFE, R.; BUSTAMANTE, I. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 280–295, 2014.
- MELO; S. M.; BRITO, N. M. Analysis and Occurrence of Endocrine Disruptors in Brazilian Water by HPLC-Fluorescence Detection. **Water Air Soil Pollut**, v. 225, p.1783, 2014.
- MEREL; S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v. 59, p. 303 – 327, 2011.
- MERWE, Deon van Der. Cyanobacterial (Blue-Green Algae): Toxins. In: GUPTA, Ramesh C. **Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents**. 2. ed. London: Academic Press Is An Imprint Of Elsevier, 2015. Cap. 31. p.1184.
- MOKH, S.; KHATIB, M. E.; KOUBAR, M.; DAHER, Z.; ISKANDARANI, M. AL. Innovative SPE-LC-MS/MS technique for the assessment of 63 pharmaceuticals and the detection of antibiotic-resistant bacteria: A case study natural water sources in Lebanon. **Science of the Total Environment**, n.609, p. 830-841, 2017.
- MONTAGNER (a), C. C.; JARDIM, W. F.; VON DER OHE, P. C.; UMBUZEIRO, G. A. Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 1850 -1858, 2014.

- MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W.F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011.
- MONTAGNER (b), C. C.; UMBUZEIRO, A G. A; PASQUINIB, A C.; JARDIM, W. F. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 2014.
- MONTEIRO, S.H.; FRANCISCO, J.G.; ANDRADE, G.C.; BOTELHO, R.G.; FIGUEIREDO, L.A.; TORNISIELO, V. L. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on line SPE-LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**. v. 9, p.634–643, 2016
- MORAES, M.C. B.;LAGO. C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, v. 4, p.556-563, 2003.
- MOREIRA, I. S.; AMORIM, C.L.; RIBEIRO, A. R.; MESQUITA, R.B.R.; RANGEL, A. O.S.S.; LOOSDRECHT, C.M. V.; TIRITAN, M. E.; CASTRO, P. M.L. Removal of fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 287, p. 93 – 101, 2015.
- MORENO-GONZÁLEZ, R. A; RODRIGUEZ-MOZAZ, S. B; GROS, M. B; BARCELÓ, D. B,C.; LEÓN, V.M. A. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). **Environmental Research**, v. 138, p. 326 – 344, 2015.
- MÜLLER, C.C., RAYA-RODRIGUEZ, M.T., CYBIS, L.F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, p. 29–28, 2009.
- MUNOZ-BELLIDO, J.L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCIA-RODRIGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs Selective serotonin reuptake inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 177 - 180, 2000.
- MURRAY, K. K.; BOYD, R. K. ; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, J. G.; LIANG, L.; NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure Appl. Chem**, v. 85, n. 7, p. 1515–1609, 2013.
- MYERS, A.; CURTIS, B. S.; CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. **MC Biophysics**, v. 6, n. 4, 2013.
- MYUNG-HWAN PARK, ILL-MIN CHUNG, ATEEQUE AHMAD, BAIK-HO KIM, SOON-JIN HWANG. Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. **Aquatic Botany**, v. 90, p. 309 – 314, 2009.
- NDLELA, L.L.; OBERHOLSTER, P.J.; VAN WYK, J.H.; CHENG, P.H. An overview of cyanobacterial bloom occurrences and research in Africa over the last decade. **Harmful Algae**, n. 60, p. 11 – 26, 2016.

NEWCORBE, G.; CHORUS, I.; FALCONER, I.; LIN, T. F. Cyanobacteria: Impacts of climate change on occurrence, toxicity and water quality management. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1347-1348, 2012.

NEWMAN, M.C. **Fundamentals of Ecotoxicology** – The Science of Pollution, Taylor & Francis: United States Of American. 4^{ed}, p.680, 2014.

NICA, V. D.; VILLA, S.; FINIZIO, A. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *aliivibrio fischeri*: experimental results for single compounds, considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 36, Ed.3, p. 815 - 822, 2017.

NICHOLSON, B.C., ROSITANO, J., BURCH, M.D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, v.28, n.6, p.1297–1303, 1994.

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Guidelines for the Testing of Chemicals. Environmental fate and behaviour, Seção 3. 2008.

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Guidelines for the testing of chemicals proposal for updating guideline 201. Draft revised guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. 2002.

OEHRLE, S.; RODRIGUEZ-MATOS, M.; CARTAMIL, M.; ZAVALA, C.; REIN, K. S. Toxin composition of the 2016 *Microcystis aeruginosa* bloom in the St.Lucie Estuary, Florida. **Toxicon**, v. 138, p. 169 – 172, 2017.

OIC – Organização Internacional de Café. Trade Statistics Tables – World coffee consumption. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf> Acesso em: 14/08/2015.

OLIVER, S. L, RIBEIRO,H. Variabilidade climática e qualidade da água do Reservatório Guarapiranga. **Sociedade e Ambiente**. v..28, n.82, 2014.

OMAR, T. F. T.; AHMAD, A.; ARIS, A. Z.; YUSOFF, F.M. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, n.85, p. 241–259, 2016.

PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. **Marine Pollution Bulletin**, v. 120, p. 355 – 363, 2017.

PALOMARES, I. R., PETRE, A. L., BOLTES, K., LEGANÉS, F., MELÓN, J. A. P., ROSAL, R., PIÑAS, F. F. Application of the combination index (CI)- isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. **Water Research**. v.44, p. 427 – 438, 2010.

PAPAVASILIOU, S. S.; MARTIAL, J. A.; LATHAM, K. R. Thyroid Hormonelike Actions of 3,3',5'-L-Triiodothyronine and 3,3'-Diiiodothyronine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 60, p. 1230 – 1239, 1977.

- PERCIVAL, Steven L.; WILLIAMS, David W.. Cyanobacteria. In: PERCIVAL, Steven et al. **Microbiology of Waterborne Diseases**. 2. ed. London: Elsevier Ltd, 2014. Cap. 5. p. 696.
- PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, D.A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L. L Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548–549, p. 148-154, 2016.
- PERRI; K. A.; SULLIVAN, J. M.; BOYER, G. L.; Harmful algal blooms in Sodus Bay, Lake Ontario: A comparison of nutrients, marina presence, and cyanobacterial toxins. **Journal of Great Lakes Research**, v. 41, Ed. 2, p. 326 – 337, 2015.
- PETROVIC, M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 1, p.25-33, 2014.
- PETROVIC, M.; HERNANDO, M. D.; DIAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÒ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v.1067, p. 1-14, 2005.
- PHILIP, J. M.; ARAVIND, U. K.; ARAVINDAKUMAR, C. T. Emerging Contaminants in Indian Environmental Matrices – A Review. **Chemosphere**, v. 190, p. 306 – 326, 2018.
- PIRES, A.; ALMEIDA, A.; CORREIA, J.; CALISTO, V.; SCHNEIDER, R. J.; ESTEVES, V. I.; SOARES, A. M.V.M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Long-term exposure to caffeine and carbamazepine: Impacts on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. **Chemosphere** , n. 146, p. 565 – 573, 2016.
- PLEITER, M. G., GONZALO, S., PALOMARES, I. R., LEGANÉS, F., ROSAL, R., BOLTES, K., MARCO, E., PIÑAS, F. F. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**. v.47, p.2050 – 2064, 2013.
- POLYAK, Y.; ZAYTSEVA, T.; MEDVEDEVA, N. Response of Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Environmental Pollution. **Water Air Soil Pollut**, v.224, n. 1494, 2013.
- POURIA, S., ANDRADE DE, A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R.L., BARRETO, V.T.S., PREISER, W., POON, G.K., NEILD, G.H., CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, v.352, n.9121, p.21–26, 1998.
- PREECE, E. P.; JOAN HARDY, F.; MOORE, B. C.; BRYAN, M. A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk. **Harmful Algae**, n. 61, p. 31 – 45, 2017.
- PUCKOWSKI, A.; MIODUSZEWSKA, K.; ŁUKASZEWICZ, P.; BORECKA, M.; CABAN, M.; MASZKOWSKA, J.; STEPNOWSKI, P. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 5, n. 127, p. 323 – 255, 2016.

QUADRA, G. R.; SOUZA, H. O.; COSTA, R. S.; FERNANDEZ, M. A. S.; Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems. in Brazil? A critical review of current studies. in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 1200 – 1218, 2017.

RANG, H.P; DALE, M. M; RITTER, J,M; MOORES, PK.; G. Farmacologia. 7. Ed. Rio de Janeiro (RJ) ELSEVIER, 2016, 742p.

RANKIN, K.A.; ALROY, K.N A.; KUDELA, R. M.; OATES, S.C.; MURRAY, M. J.; MILLER, M. A. Treatment of Cyanobacterial (Microcystin) Toxicosis Using Oral Cholestyramine: Case Report of a Dog from Montana. **Toxins**, v. 5, p. 1051 – 1063, 2013.

RASMUSSEN, B.; FLETCHER, I. R.; BROCKS, J. J.; KILBURN, M. R.. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. Letter: **Nature**, v.455, n. 23, 2008.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P; INCHAROENSAKDI, A. The cyanotoxin-microcystins: current overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, p. 215 – 249, 2014.

Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

REYNOLDS, C. **Growth and replication of phytoplankton**. In: Reynolds, C. (Ed.). Ecology of Phytoplankton: Ecology Biodiversity and Conservation. New York: Cambridge University Press, p.178-236, 2006.

RIBEIRO, A. R.; PEDROSA, M.; MOREIRA, N.F.F.; PEREIRA, M. F.R.; SILVA, A.M.T. Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the Directive 2013/39/EU and Decision 2015/495/EU. **Journal of Chromatography A**, n.418, p.140–149, 2015.

RIVERA-JAIMES, J. A.; POSTIGO, C.; MELGOZA-ALEMÁN, R. M.; ACEÑA, J.; BARCELÓ, D.; ALDA, M. L.. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**,v. 613–614, p. 1263–1274. 2018.

RODRÍGUEZ-GIL, J.L.; CÁCERES, N.; DAFOUZ, R.; VALCÁRCCEL, Y. Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1058 – 1071, 2018.

RYBAK, M.E.; STERNBERG, M. R.; PAO, C.; AHLUWALIA, N.; PFEIFFER, C. M. Urine Excretion of Caffeine and Select Caffeine Metabolites Is Common in the US Population and Associated with Caffeine Intake1–4. **The Journal of Nutrition Nutritional Epidemiology**. 2015.

SAARISTOA, M.; MCLENNANA, A.; JOHNSTONEA, C. P.; CLARKEC, B. O.; SCHOOL, B. B. M. W.. Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predatorbehaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 38 – 45, 2017.

SABESP, Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=31>> Acesso em: 17.09.2017.

SANTA-ROSA, C. A.; OLIVEIRA, A. M. S.; SAAD, A. R.. A expansão urbana e o IQA como ferramentas de avaliações e análises da evolução da qualidade das águas do rio Cotia, região metropolitana de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 19, n.4, p. 114 – 123, 2014.

SÃO PAULO (ESTADO). Lei nº N° 7.663, de 30 de dezembro de 1991. **Estabelece Normas de Orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos Bem Como Ao Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos**. São Paulo/ SP.

SÃO PAULO (Estado). Lei nº N° 9.034, de 27 de dezembro de 1994. **Ispõe Sobre O Plano Estadual de Recursos Hídricos - Perh, A Ser Implantado no Período 1994 e 1995, em Conformidade Com A Lei 7663, de 30/12/91, Que Instituiu Normas de Orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos**. São Paulo, SP.

SCHREIBER, A. Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. AB SCIEX. Concord, Ontario (Canada), 2010. Acesso em: 22.09.2017>Disponível em: <https://sciex.com/Documents/brochures/msTripleQuad-Pesticides-Testing.pdf>

SCHULTZ, G.; HENION, J. **Regulated Bioanalysis: Fundamentals and Practice**. In: Rocci, J.; Lowes, S. *Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*. Springer, v. 26, 2017. Cap. 6, p. 103-120. eBook.ISBN 978-3-319-54800-5 . ISBN 978-3-319-54802-9. Disponível em: < https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-54802-9_6>. Acesso em: 17.07.2017.

SEBASTINE, I. M.; WAKEMAN, R. J. Consumption and environmental hazards of Pharmaceutical substances in the UK. **Trans IChemE**, v.81, 2003.

SEBBAG, L.; SMEE, N.; MERWE, D. V. D.; SCHMID, D. Liver Failure in a Dog Following Suspected Ingestion of Blue-Green Algae (*Microcystis* spp.): A Case Report and Review of the Toxin. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 49, n. 5, p. 342-34, 2013.

SHARMA, V K.; TRIANTIS, T M.; ANTONIOU, M G.; HE, X.; PELAEZ, M.; HAN, C.; SONG, W.; O'SHEA, K.; DE LA CRUZ, A. A.; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3 – 17, 2012.

SIDRACH-CARDONA, R.; HIJOSA-VALSERO, M.; MARTI, E.; BALCÁZAR, J. L.; BECARES, E. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. **Science of the Total Environment**, v. 488–489, p. 220 – 227, 2014.

SILVA, J. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. A. J.; NETA. R. N. F. C. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 2, p. 409 – 18, 2015.

SILVEIRA, M. A. K.; CALDAS, S. S.; GUILHERME, J. R.; COSTA, F. P.; GUIMARÃES, B. S.; CERQUEIRA, M. B. R.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Quantification of Pharmaceuticals and Personal Care Product Residues in Surface and Drinking Water Samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n. 9, p. 1385-1395, 2013.

SISMOTTO, M., PASCHOAL, J. A. R., REYES, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p.449-461, 2013.

SODRÉ (b), F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut.** v. 206, p. 57 – 67, 2010.

SODRÉ, F. F.; PESCARA, I. C.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 92 – 98, 2010.

STOLKER, A.A.; NIESING, W.; HOGENDOORN, E.A.; VERSTEEGH, J.F.; FUCHS, R.; BRINKMAN, U.A. Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.378, Ed 4, p. 955–963, 2004

STUMPF, M.; TERNESA, T. A.; WILKENA, R.D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135 – 141, 1999.

SU, X.; STEINMAN, A. D.; TANG, X.; XUE, Q.; ZHAO, Y.; XIE, L. Response of bacterial communities to cyanobacterial harmful algal blooms in Lake Taihu, China. **Harmful Algae**, n. 68, p. 168 – 177, 2017.

SVANFELT, J.; ERIKSSON, J.; KRONBERG, L. Analysis of thyroid hormones in raw and treated waste water. **Journal of Chromatography A**, n.1217, p. 6469-6474, 2010.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science Total Environment**, v. 225, p. 81–90.

THOMAS, K. V; SILVA, F. M. A.; LANGFORD, K.H.; SOUZA, A. D. L.; NIZZETO, L.; WAICHMAN, A.V. Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of manaus, amazonas, brazil. **Journal of the american water resources association**, v. 50, n. 2. 2014.

TLILI, I.; CARIA, G.; OUDDANE, B.; GHORBEL-ABID, I.; TERNANE, R.; TRABELSI-AYADI, M.; NET, S. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application. **Science of the Total Environment**, v. 563–564, p. 424 – 433, 2016.

TORRES, N. H.; AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; AMÉRICO, J. H. P.; A. M.; MACHADO, CAVALCANTI, E. B.; TORNISIELO, V. L. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, n.187, p.379, 2015.

TRAWIŃSKI, J.; SKIBIŃSKI, R. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 1151 – 1199, 2017.

TRINCHET, I.; CADEL-SIX, S.; DJEDIAT, C.; MARIE, B.; BERNARD, C.; PUISEUX-DAO, S.; KRYS, S.; EDERY, MARC. Toxicity of harmful cyanobacterial blooms to bream and roach. **Toxicon**, v. 71, p. 121 – 127, 2013.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1, p.151-173. 1977.

VALCÁRCEL, Y.; ALONSO, S. G.; RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; GIL, A.; CATALÁ, M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, v. 84, p. 1336 – 1348, 2011.

VALENTIM, L. S. O. Avaliação integrada da qualidade dos mananciais e da água para consumo humano produzida na RMSP. **VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia – Recife/PE**. Junho/2004.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; KORSGAARD, B.; MADSEN, S. S.; BJERREGAARD, P. Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 107 – 118, 2011.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p.1875-1887, 2011.

VESTERKVIST, P. S. M.; MISIOREK, J. O.; SPOOF, L. E. M.; TOIVOLA, D. M.; MERILUOTO, J. A. O. Comparative Cellular Toxicity of Hydrophilic and Hydrophobic Microcystins on Caco-2 Cells. **Toxins**, n. 4, p. 1008 – 1023, 2012.

WANG, M.; ZHANG, Y.; GUO, P. Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of *Microcystis flos-aquae*. **Aquatic Toxicology**, v.186, p. 67 – 76, 2017.

WANG, C. H.; GARDINALIB, P. R. Comparison of multiple API techniques for the simultaneous detection of microconstituents in water by on-line SPE-LC-MS/MS. **Journal Mass Spectrom**, v.47, p. 1255–1268. 2012.

WATERS®. [Care and use manual] Oasis HLB Cartridges and 96 – Well Plates. Waters corporation, Milford, USA, 2014.

WEBER, F. A., BEEK, T.; BERGMANN, A.; CARIUS, A.; GRÜTTNER, G.; HICKMANN, S.; EBERT, I.; HEIN, A.; KÜSTER, A.; ROSE, J.; KOCH-JUGL, J.;

STOLZENBERG, H.C. **Pharmaceuticals in the environment – the global perspective.** Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM. German Environment Agency. p.1-13, 2014.

WEGNER, S.; BROWNEB, P.; DIXB, D. Identifying reference chemicals for thyroid bioactivity screening . **Reproductive Toxicology**, n. 65, p. 402 – 413, 2016.

WHO – **World Health Organization.** Depression, February 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em: 15.09.2017.

WHO a – World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality - 4th ed. 2011. Acesso em: 17/03/2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf. Acesso em: 17.03.2014

WHO b – World Health Organization. Pharmaceuticals in drinking-water. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals_2011_0601.pdf> Acesso em: 17/03/2014.

WHO. Report of the Working Meeting on Chemical Substances in Drinking Water, Geneva, 1997: 5.2 .

WILLE, K.; BRABANDER, H. F.; WULF, E.; CAETER, P.V.; JANSSEN, C. R.; VANHAECKE, L Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment .**Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, 2012.

WILM, M. Principles of electrospray ionization. **Molecular & Cellular Proteomics**.10(7):M111.009407. 2011.

WMO - World Meteorological Organization, International Glossary of Hydrology, n.385, 2012.

WON, C.M.; Kinetics of degradation of levothyroxine in aqueous solution and in solid state. **Pharmaceutical Research**, v.9, n.1, p. 131-7, 1992.

YE, J.; DU, Y.; WANG, L.; QIAN, J.; CHEN, J.; WU, Q.; HU, X.; Toxin Release of Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* after Exposure to Typical Tetracycline Antibiotic Contaminants. **Toxins**, v. 9, n. 53, p. 1 -13, 2017. 2017.

YOST, R. A. FETTEROLF, D. D. Tandem mass spectrometry (MS/MS) instrumentation. **Mass Spectrometry Reviews**, v.2, p.1 – 45, 1983.

YOST, R.A.; ENKE, C.G. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. **Analytical Chemistry**, v. 51, n.12, p. 1251-64, 1979.

YU, K.; LI, B.; ZHANG, T. Direct rapid analysis of multiple PPCPs in municipal wastewater using ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry without SPE pre-concentration. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 59–68, 2012.

YUAN, M.; NAMIKOSHI, M.; OTSUKI, A.; RINEHART, K. L.; SIVONEN, K.; WATANABE, M. F. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 33-43, 1999.

ZARRELLI, A.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; LAVORGNA, M.; TEMUSSI, F.; SCHIAVONE, L.; CRISCUOLO, E.; PARRELLA, A.; PREVITERA, L.; ISIDORI, M. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 453 – 458, 2014.

ZENKER, A.; RITA, CICERO, M.; PRESTINACI, F.; BOTTONI, P.; CARERE, M. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p. 378 – 387, 2014.

ZHAI, B.; WU, C.; WANG, L.; SACHS, M. S.; LIN, X. The Antidepressant Sertraline Provides a Promising Therapeutic Option for Neurotropic Cryptococcal Infections. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3758, 2012.

ZHANG, D. Q.; HUA, T.; GERSBERG, R. M.; ZHU, J.; NG, W. J.; TAN, S. K. Fate of caffeine in mesocosms wetland planted with *Scirpus validus*. **Chemosphere**, n. 90, p. 1568 – 1572, 2013.

ANEXO

FICHA DO ALUNO



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8721489/1 - Raquel Cardoso de Souza

Email: raquelcs@usp.br
Data de Nascimento: 13/06/1985
Cédula de Identidade: RG - 3.944.185 - SC
Local de Nascimento: Estado de Santa Catarina
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Habilitação Farmacêutico Bioquímico Opção Análises Clínicas - Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina - Brasil - 2010
Mestrado: Mestra em Engenharia Ambiental - Área: Engenharia Ambiental (1) - Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 02/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 02/07/2013
Data Limite para o Depósito: 30/10/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 02/07/2013 até o presente. Email: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/07/2013
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 02/07/2017 até 30/10/2017

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/09/2015

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 02/07/2013
 Prorrogação em 29/03/2017

30/10/2017

19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 02:46:10



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8721489/1 - Raquel Cardoso de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	06/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/3	Tópicos Avançados em Toxicologia I	06/08/2013	18/11/2013	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5784-3/3	Tópicos Avançados em Toxicologia II	06/08/2013	18/11/2013	15	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	8	83	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	09/12/2013	15/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0517 - Diagnóstico Laboratorial de Doenças Infecciosas e Parasitárias, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	-	-	-	-
FBC5813-4/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas	11/03/2014	14/04/2014	60	4	85	A	N	Concluída
FBC5784-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia II	11/03/2014	23/06/2014	15	1	100	A	N	Concluída
BIE5729-5/1	Ecologia de Águas Continentais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	25/05/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	24
Estágios:			
Total:	10	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- 1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 25/07/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 02:46:10



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 8721489/1 - Raquel Cardoso de Souza

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
453826	Ernani Pinto Junior	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 02:46:10