

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

**Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e
testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna***

NÁDIA HORTENSE TORRES

Piracicaba
2014

NÁDIA HORTENSE TORRES

**Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e
testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna***

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz
Tornisielo**

**Piracicaba
2014**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Torres, Nádia Hortense

Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e testes de toxicidade aguda com *Daphia magna* / Nádia Hortense Torres; orientador Valdermar Luiz Tornisielo. - - Piracicaba, 2014.

100 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Água de superfície 2. Bacia hidrográfica 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Ecotoxicologia 5. Fármacos 6. Monitoramento ambiental 7. Poluição ambiental I. Título

CDU 628.193 : 661.12

Aos meus pais, Vera e Mozart, pelo amor e dedicação comigo e por me ensinarem que a esperança e a fé nos levam longe. E também por estarem sempre presentes em todos os momentos que mais precisei.

Ao Luiz Fernando Romanholo Ferreira, por ter me apoiado e me acompanhado, com muito amor e carinho, nesta árdua e feliz caminhada.

À minha irmã, Mari.

Dedico.

***“Se queres vencer o mundo inteiro, vence-te a ti mesmo”.
(Fiódor Dostoievski)***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo por sua amizade e por ser um exemplo de ser humano humilde, bondoso e paciente.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por colocar à disposição o Laboratório de Ecotoxicologia para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

À minha querida amiga Juliana Pinê Américo, por ser parceira, amiga e uma irmã do peito, sempre!

À Carina Nazato, por toda sua ajuda e dedicação comigo e por uma amizade bonita e sincera que surgiu neste tempo!

Ao Prof. Dr. Edson Gomes de Oliveira (in memorian), do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da Unesp de Rio Claro, pela amizade e ajuda com a plotagem dos pontos de coleta nos mapas.

À amiga Angela Machado por toda ajuda com as “Daphnias”.

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, por ceder o espaço de seu laboratório na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, em Jaboticabal, para que eu realizasse os experimentos com as “Daphnias”.

À Lucineide Maranhão, por sua amizade e pela ajuda com as “Daphnias”.

Aos técnicos do laboratório Rodrigo Pimpinato e Carlos Dorelli, pela ajuda nas extrações e pela amizade.

Ao Franz Vilca e Aderbal Rocha pelo apoio com o LC-MS/MS.

Ao Rafael Grossi Botelho pelas coletas das amostras durante quase 1 ano, pelas muitas risadas que demos nesses momentos!

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Fábio, Soninha, Daiane, Neuda e Claudia por todo apoio durante todos estes anos.

A todos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia: Neide, Marcela, Franz, Sérgio, Jeane, Grazi, Leila, Renata, Aderbal, Cida, Carol Poppi, Carol, Aline, Rafael Leal, Rafael Botelho, Paulo, Felipe e Carina.

À bibliotecária Marília e aos amigos Franz, Neide e Jú pelas correções do trabalho.

RESUMO

TORRES, N. H. **Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna***. 2014. 100 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

É crescente a utilização de fármacos mundialmente, principalmente devido às inúmeras doenças existentes, tanto humanas quanto para a criação de animais. Contudo, estes compostos podem causar um grande impacto no ambiente, pois são descarregados nos cursos d'água através dos efluentes. Com isto, os fármacos podem contaminar também o solo e o sedimento, devido ao fato de serem desenvolvidos para apresentarem propriedades persistentes, como é o caso dos antimicrobianos e hormônios. Estes poluentes foram encontrados em estudos com água superficial, subterrânea, solo e sedimento em concentrações que variaram de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, e são capazes de provocar alterações no sistema endócrino de muitos organismos aquáticos, resistência microbiana, além de prejuízos à saúde humana. Assim, este trabalho teve como objetivos realizar um levantamento bibliográfico sobre os aspectos relacionados à presença de fármacos no ambiente, e as metodologias de detecção dos mesmos em amostras ambientais. Assim como determinar a presença de hormônios (estriol, estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona e testosterona) e antimicrobianos (ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e enrofloxacina) em amostras de água superficial e tratada; e também analisar a toxicidade destes antibióticos e hormônios em *Daphnia magna*. E, de acordo com o levantamento bibliográfico, concluiu-se que é necessário um aumento no volume de estudos destes compostos no ambiente, e principalmente, uma avaliação dos efeitos sinérgicos destes compostos nos organismos que têm contato com as matrizes ambientais como água, solo e sedimento. Para a detecção dos fármacos em amostras de água superficial e tratada, amostras foram coletadas ao longo do Rio Piracicaba (6 pontos) e em uma residência na cidade de Piracicaba, de março de 2011 a dezembro de 2012. Para as análises foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS/MS). E, de acordo com os resultados obtidos algumas amostras apresentaram contaminação com os hormônios estriol, estrona, progesterona, 17β -estradiol, e o 17α -etinilestradiol foram detectados em algumas das amostras durante o período de coleta, e suas maiores concentrações foram de 90, 28, 26, 137 e 194 ng.L^{-1} , respectivamente, e com o antimicrobiano norfloxacina (variando de 8 a 18 ng.L^{-1}), indicando aporte de esgoto sanitário em alguns pontos no Rio Piracicaba. Os resultados indicaram pouca toxicidade dos antimicrobianos norfloxacina, sulfadiazina e eritromicina, e do hormônio estriol, para a *Daphnia magna*.

Palavras-chave: Contaminação ambiental. Cromatografia líquida. *Daphnia magna*. Esgoto sanitário. Fármacos. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

TORRES, N. H. **Determination of hormones and antimicrobials in Piracicaba River and acute toxicity tests to *Daphnia magna***. 2014. 100 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

There is a growing use of drugs worldwide due to the numerous diseases both human and in animal husbandry. However, these compounds can have a big impact on the environment as they are discharged into waterways via wastewater. With this, drugs can also contaminate soil and sediment due to the fact that they are developed for presenting persistent properties, as is the case of antibiotics and hormones. These pollutants were found in studies with surface water, groundwater, soil and sediment concentrations from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$, being able to cause changes in the endocrine system of many aquatic organisms, microbial resistance, and damage to human health. Thus, this study aimed to conduct a literature survey on the aspects related to the presence of pharmaceuticals in environment, and methods of detection thereof in environmental samples. As determine the presence of hormones (estriol, estrone, 17β -estradiol, 17α -ethinylestradiol, progesterone and testosterone) and antimicrobials (ciprofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin and erythromycin) on surface samples and treated water, and also assess toxicity of antimicrobials and hormones in *Daphnia magna*. And, according to literature review, it was concluded that an increase in studies volume of these compounds in environment, and especially, a review of synergistic effects of these compounds in organisms that have contact with environmental matrices such as water, soil and sediment. For detection of drugs in surface and treated water samples were collected from March 2011 to December 2012, at 6 points along the Piracicaba River and in one point was collected treated water in a residence in the city of Piracicaba, São Paulo, Brazil. For analyzes a liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer with electrospray ionization source (LC-ESI-MS/MS) was used. And according to results obtained some samples were contaminated by hormones estriol, estrone, progesterone, 17β -estradiol and 17α -ethinylestradiol during the collection period, and its highest concentrations were 90, 28, 26, 137 and 194 ng.L^{-1} , respectively, and with antimicrobial norfloxacin (ranged from 8 to 18 ng.L^{-1}), indicating inflow of sewage at some points in Piracicaba River. Results indicated little toxicity of antimicrobials norfloxacin, sulfadiazine and erythromycin, and the hormone estriol, for *Daphnia magna*.

Keywords: Environmental Contamination. Liquid chromatography. *Daphnia magna*. Sanitary sewage. Pharmaceuticals. Acute Toxicity.

SUMÁRIO

1. Fármacos no ambiente – revisão	17
1.1. Introdução	19
1.2. Fármacos no ambiente	20
1.3. Hormônios no ambiente	23
1.4. Antibióticos no ambiente	24
1.5. Efeito da contaminação por fármacos em organismos aquáticos.....	25
1.6. Metodologias de análise de fármacos	25
1.7. Conclusões.....	27
2. Avaliação dos hormônios nas águas superficiais no Rio Piracicaba e água de abastecimento	33
2.1. Introdução	35
2.2. Materiais e métodos	38
2.2.1. Caracterização da área de estudo	38
2.2.2. Materiais.....	39
2.2.3. Instrumentação	40
2.2.4. Análises cromatográficas	41
2.2.5. Parâmetros do espectrômetro de massas.....	41
2.2.6. Validação	41
2.2.7. Coletas das amostras.....	42
2.3. Resultados e Discussão	43
2.3.1. Condições do espectrômetro de massas	43
2.3.2. Linearidade	44

2.3.3. Precisão.....	45
2.3.4. Determinação dos valores de LOD e LOQ	47
2.4. Análise de hormônios em água superficial e de abastecimento	47
2.5. Efeito de matriz	52
2.6. Conclusões	54
3. Análise de antimicrobianos em água superficial e de abastecimento urbano....	61
3.1. Introdução	63
3.2. Revisão da Literatura.....	65
3.2.1. Antimicrobianos no ambiente.....	65
3.2.2. Quinolonas e fluoroquinolonas	66
3.2.3. Análises de antimicrobianos em amostras ambientais	68
3.3. Materiais e Métodos.....	68
3.3.1. Caracterização da área de estudo: a Sub-bacia do Rio Piracicaba.....	68
3.3.2. Reagentes e padrões	70
3.3.3. Coletas das amostras de água e dados pluviométricos.....	70
3.3.4. Condições das análises realizadas no cromatógrafo líquido	71
3.3.5. Condições das análises no espectrômetro de massas	71
3.4. Resultados e Discussão.....	72
3.4.1. Otimização da metodologia de separação em cromatógrafo líquido e as condições do espectrômetro de massas para a quantificação e identificação dos antimicrobianos.....	72
3.4.2. Validação do método	73
3.4.3. Análises de antimicrobianos em amostras de água.....	78
3.5. Conclusões	81

4. Avaliação da toxicidade de antimicrobianos e hormônios para <i>Daphnia magna</i>	88
4.1. Introdução	90
4.2. Revisão da literatura.....	91
4.2.1. <i>Daphnia magna</i>	91
4.2.2. Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	92
4.2.3. Teste de toxicidade com <i>D. magna</i>	92
4.3. Materiais e Métodos	94
4.3.1. Local de realização dos testes	94
4.3.2. Manutenção do cultivo de <i>D. magna</i>	94
4.3.3. Testes de toxicidade aguda com os fármacos	95
4.3.4. Análise estatística	96
4.3.5. Classificação dos fármacos pela sua toxicidade aguda	96
4.4. Resultados e Discussão	96
4.4.1. Testes com os fármacos para <i>D. magna</i>	96
4.5. Conclusões.....	97

1. Fármacos no ambiente – revisão¹

Resumo: É crescente a utilização de fármacos no mundo todo. Contudo, estes compostos podem causar um grande impacto no ambiente, pois são descarregados nos cursos d'água através de efluentes sem tratamento adequado. Com isto, os fármacos podem contaminar também o solo e o sedimento, devido ao fato de serem desenvolvidos para apresentarem propriedades persistentes, como é o caso dos antibióticos e hormônios. Estes poluentes foram encontrados em estudos com água superficial, subterrânea, solo e sedimento em concentrações muito baixas (de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo capazes de provocar alterações no sistema endócrino de muitos organismos aquáticos além de prejuízos à saúde humana. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre os aspectos relacionados à presença de fármacos no ambiente, os efeitos causados por antibióticos e hormônios em organismos e as metodologias de detecção dos mesmos em amostras ambientais. E, de acordo com o levantamento bibliográfico, concluiu-se que é necessário um aumento no volume de estudos destes compostos no ambiente brasileiro e, principalmente, uma avaliação dos efeitos sinérgicos destes compostos nos organismos que têm contato com as matrizes ambientais como água, solo e sedimento.

Palavras-chave: Antibióticos. Hormônios. Organismos. Água. Sedimento.

¹TORRES, N.H.; AMÉRICO, J.H.P.; FERREIRA, L.F.R.; NAZATO, C.; MARANHO, L.A.; VILCA, F.Z.; TORNISIELO, V.L. Fármacos no ambiente – Revisão. **REA – Revista de estudos ambientais (Online)**, v. 14, n. 4, p. 67-75, jul./dez. 2012. ISSN 1983 1501.

Abstract: It is increasing the use of drugs worldwide. However, these compounds can have a big impact on the environment as they are discharged into waterways via wastewater without proper treatment. With this, drugs can also contaminate soil and sediment due to the fact that they are designed to present persistent properties, as is the case of antibiotics and hormones. These pollutants have been found in studies of surface water, groundwater, soil and sediment at very low concentrations (from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$), being able to cause changes in the endocrine system of many aquatic organisms as well as damage to human health. This study aimed to conduct a literature review on aspects related to the presence of pharmaceuticals in environment, effects caused by antibiotics and hormones in organisms and methods of detection in environmental samples. According to the literature review, it was concluded that it is necessary to increase the volume of studies of these compounds in the environment in Brazil and mainly an evaluation of synergistic effects of these compounds in organisms that have contact with the environmental matrices such as water, soil and sediment.

Keywords: Antibiotics. Hormones. Organisms. Water. Sediment.

1.1. Introdução

Uma significativa quantidade de medicamentos tem sido utilizada de maneira crescente no mundo, dos quais cerca de 4.000 são empregados em 10.000 finalidades distintas (ARAÚJO et al., 2010). Estes compostos, uma vez no ambiente, podem comprometer a qualidade dos recursos hídricos, interferindo na biodiversidade e no equilíbrio de ecossistemas aquáticos (MASSARO, 2011).

Após sua administração, os fármacos são excretados via urina e fezes, como substância inalterada ativa, metabólitos ou ainda sob a forma de conjugado de glucorônico ou ácido sulfúrico. Tal fenômeno pode ser provocado devido à remoção incompleta nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) (BARCELÓ, 2007; GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2009; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011, AMÉRICO et al., 2012) podendo chegar às águas superficiais e subterrâneas por meio da lixiviação (FARRÉ et al., 2008; KUMAR; MOHAN, SARMAH, 2009), através do lançamento de esgotos domésticos em cursos d'água (CARVALHO et al., 2009), efluentes de indústrias farmacêuticas e também da disposição imprópria de fármacos após a expiração do prazo de validade (MASSARO, 2011).

Outra via de contaminação que pode ser significativa é a eliminação de resíduos de antibióticos e hormônios usados na medicina veterinária através dos dejetos dos animais. O próprio esterco, utilizado como fertilizante, contribui para contaminar águas superficiais e subterrâneas, além do solo (FLAHERTY; DODSON, 2005).

Os hormônios femininos sintéticos utilizados em contraceptivos orais, como os estrógenos e progestógenos, são contaminantes emergentes que despertam maior preocupação, pois podem afetar negativamente o sistema endócrino de diversos organismos aquáticos, principalmente porque não há leis que vigorem sobre os valores máximos permissíveis para estas substâncias em diferentes matrizes ambientais (JELIĆ; PETROVIĆ; BARCELÓ, 2009; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010; KUSTER et al., 2010). Hormônios femininos têm sido detectados em esgoto sanitário, águas superficiais e subterrâneas em concentrações da ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em diversas regiões do mundo (FARRÉ et al., 2008; LÓPEZ-SERNA et al., 2010; MASSARO, 2011; SIREs; BRILLAS, 2012).

Dentre os fármacos encontrados no ambiente aquático destacam-se também os antibióticos, como a eritromicina, pertencente ao grupo dos macrolídeos, a qual é amplamente utilizada na criação de frangos e gado (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Muitos destes antibióticos utilizados na produção animal não são totalmente absorvidos no intestino destes animais sendo que de 30 a 90% destes fármacos são excretados de forma inalterada (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), seja por meio da urina ou por meio das fezes (HALLING-SØRENSEN, 2001).

Há uma preocupação com os possíveis efeitos destes compostos farmacológicos em organismos aquáticos expostos, bem como com os diversos elos da cadeia trófica que possam alimentar-se destes organismos contaminados principalmente porque o ser humano encontra-se no topo desta cadeia. Dessa forma, faz-se necessário além de um monitoramento destas substâncias no ambiente a realização de testes de toxicidade aguda e crônica buscando-se entender como os fármacos podem interferir no metabolismo dos organismos expostos direta ou indiretamente. Devido ao comportamento e o destino dos fármacos e seus metabólitos no ambiente não serem bem conhecidos (FARRÉ et al., 2008; LÓPEZ-SERNA et al., 2010), tem ocorrido o desenvolvimento progressivo de novos métodos e de técnicas analíticas sensíveis utilizando análises multiresíduos destes compostos por cromatografia (em concentrações da ordem de ng.L^{-1}), as quais auxiliam na detecção e quantificação destes compostos nos corpos hídricos (GINEBREDÁ et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre os aspectos relacionados à presença de fármacos no ambiente, os efeitos causados por antibióticos e hormônios em organismos expostos e as metodologias analíticas utilizadas na detecção dos mesmos em amostras ambientais.

1.2. Fármacos no ambiente

O contínuo aumento da presença de compostos farmacológicos nos mananciais de abastecimento representa uma das problemáticas mundiais do comprometimento da qualidade das águas destinadas para consumo humano e dos prejuízos inerentes sobre os ambientes aquáticos impactados por estes compostos (AMÉRICO et al., 2012).

Hormônios esteroides femininos sintéticos como o etinilestradiol e o mestranol contidos em pílulas contraceptivas, têm sido encontrados em muitos trabalhos realizados em diversos países, ambos em águas superficiais e residuárias (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; TORRES et al., 2012).

Estes hormônios considerados desreguladores endócrinos, por provocarem alterações no sistema endócrino de muitos organismos, são solúveis em gordura, assim, altos níveis podem estar presentes em carne, peixe, ovos e derivados do leite. Hartmann, Lacorn, e Steinhart (1998), relataram a ocorrência de hormônios sexuais (estrone, testosterona e progesterona) em carne (gado, suíno, aves, peixe), leite e seus derivados, ovos e plantas (gramíneas e leguminosas). Além disso, alguns desses resíduos no solo podem ser absorvidos e se acumular nos tecidos vegetais, resultando em risco à saúde humana quando consumidos (REGITANO; LEAL, 2010). Assim a utilização de excretas animais e do lodo de esgoto para fins de adubação consiste em uma das principais vias de disseminação destes compostos no ambiente (CHRISTIAN et al., 2003).

Muitos dos antibióticos de uso veterinário administrados não são plenamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (KEMPER, 2008), no entanto até 95% dos ingredientes ativos administrados aos animais podem ser integralmente eliminados sem sofrer qualquer metabolização no trato digestivo animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Fármacos apresentam propriedades físico-químicas persistentes, são lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, facilitando a sua dispersão no meio ambiente (TORRES et al., 2012) e, por isto, têm sido detectados em diversas matrizes ambientais por meio de técnicas analíticas, as quais se tornaram mais sensíveis e mais abrangentes (ANKLEY et al., 2007), para a determinação de aproximadamente 100 fármacos em matrizes ambientais aquosas (VERLICCHI et al., 2010).

Contudo, sabe-se pouco sobre os possíveis riscos ecológicos de muitos destes compostos, o que tem resultado em um aumento substancial do desenvolvimento de dados e abordagens provando a importância do acesso ao impacto de fármacos no ambiente (ANKLEY et al., 2007). O conhecimento da sua ocorrência águas subterrâneas e superficiais ainda é limitado a alguns países. Dados do comportamento e dos efeitos dos fármacos em rios e lagos, incluindo sedimento, são escassos (LÓPEZ-SERNA et al., 2010; TORRES et al., 2012). Os

baixos níveis de contaminação e a complexidade das matrizes ambientais exigem o uso de métodos com alta sensibilidade e seletividade para a análise de resíduos de estrógenos em corpos hídricos naturais (GINEBREDÁ et al., 2010; VALCÁRCEL et al., 2011).

Entretanto, a taxa de remoção dos fármacos em estações de tratamento de efluentes (ETEs) é dependente não somente do processo de tratamento aplicado, mas também de vários fatores, como a idade do lodo ativado, o tempo de retenção hidráulica e a temperatura dependendo da estação do ano (GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2007; LÓPEZ-SERNA et al., 2010; VERLICCI et al., 2010).

Por isto, os hormônios 17β -estradiol e o estriol são encontrados em ambientes aquáticos e são considerados os principais hormônios produzidos no corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo menstrual em conjunto com a progesterona e, sua presença em águas naturais é um forte indício da contaminação pelo aporte de esgoto doméstico (TORRES et al., 2012). O esteróide sintético, 17α -etinilestradiol, também é disposto em corpos d'água e efluentes (DINIZ et al., 2010) pois é introduzido continuamente no ambiente e suas propriedades bioativas e farmacêuticas podem colocar em risco a vida de organismos aquáticos e humanos (HERNANDO et al., 2006; BILA; DEZOTTI, 2007; FARRÉ et al., 2008; KUSTER et al., 2010; LÓPEZ-SERNA et al., 2010).

Embora muitas publicações reúnam dados sobre a ocorrência de resíduos de fármacos em ecossistemas aquáticos, poucas dizem respeito sobre a ocorrência em ecossistemas terrestres. Em sedimentos, os poucos dados encontrados sobre resíduos de fármacos encontrados na literatura, dizem respeito à ocorrência de estrógenos e antibióticos. Dada sua baixa polaridade, em particular para estrógenos com K_{ow} (2,5–5) (BEAUSSE, 2004), a sorção em sedimentos é ligada ao processo de cumulação. Hormônios esteróides tipicamente reportados na literatura são o 17α -etinilestradiol, dietilstilbestrol e o acetato de dietilstilbestrol, os quais têm sido detectados na concentração de $ng.kg^{-1}$ (BEAUSSE, 2004).

Assim como muitos hormônios, devido à sua elevada lipofilicidade, os antibióticos também têm sido encontrados em sedimento, na concentração de $\mu g/kg$, como é caso da ofloxacina, clortetraciclina, flumequina ou oxitetraciclina (BEAUSSE, 2004; LEE et al., 2007; MING et al., 2009).

Os efeitos e os meios de degradação dos fármacos lançados no ambiente dependem das propriedades físico-químicas dos compostos. A mobilidade dos compostos depende da sua solubilidade em água e do coeficiente de partição octanol-água (DÍAZ-CRUZ; ALDA; BARCELÒ, 2003). Por exemplo, as tetraciclinas mostram maior sorção se comparadas a outros antibióticos e as sulfonamidas são, em geral, relativamente móveis (KEMPER, 2008), colaborando com o rastreamento destes compostos no ambiente. Por exemplo, tetraciclinas têm sido encontradas a altas concentrações em matrizes de solo e de sedimento, indicando não somente características de forte sorção, mas também a tendência a acumular e persistir em matrizes de solo (REGITANO; LEAL, 2010).

Processos muito complexos podem estar envolvidos no mecanismo de sorção dos fármacos em matrizes sólidas. Não somente a hidrofobicidade, mas também a troca catiônica, o preenchimento catiônico, complexação superficial e as ligações de hidrogênio podem representar importantes meios para a retenção de fármacos em uma matriz sólida (KEMPER, 2008).

1.3. Hormônios no ambiente

Considerando a distribuição no ambiente dos hormônios, a elucidação da distribuição e do comportamento destes hormônios esteróides endógenos e exógenos no ambiente aquático é de grande importância. Nos ambientes aquáticos, os estrógenos endógenos como o 17β -estradiol e o estrona, prevalecem na atividade estrogênica (KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011).

Em uma avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas, São Paulo, alguns desses fármacos como estradiol, etinilestradiol e progesterona foram monitorados e frequentemente detectados em água superficial e potável (GHISELLI, 2006).

Os hormônios estrona e 17β -estradiol, foram detectados em águas superficiais da Áustria, Estados Unidos e China (HOHENBLUM et al., 2004; BENOTTI et al., 2009; JIANG et al., 2012). Há evidências de que os desreguladores endócrinos possam causar efeitos adversos em populações de animais expostos, contudo, as consequências na fauna exposta a esses químicos são indeterminadas (MASSARO, 2011). Segundo Bodzek e Dudziak (2006), foram encontrados os hormônios estrógenos, 17β -estradiol, estrona, e o estriol no ambiente após serem

excretados. O aumento crescente das concentrações dos metabólitos destes compostos como o 17 α -etinilestradiol, mestranol e o diestilbestrol, tem sido causado pela descarga de uma grande quantidade de medicamentos expirados (não utilizados) advindos de domicílios, resíduo de hospitais e indústrias farmacêuticas (PAIVA; SOUZA; Van HAANDEL, 2011).

Muitos efeitos de compostos desreguladores endócrinos em humanos e na fauna têm sido estudados. Um dos melhores exemplos documentados envolve a feminização de peixe macho exposto a efluentes municipais. Um trabalho pioneiro nesta área foi feito na União Européia e nos anos recentes a feminização de peixes tem sido descoberta em lugares impactados por efluentes em diversos países (ANKLEY et al., 2007).

1.4. Antibióticos no ambiente

Dentre os grupos dos fármacos terapêuticos, a atenção tem sido focada para os antibióticos, pois é documentada a resistência de bactérias patógenas devido ao uso indiscriminado destes compostos (MING et al., 2009). Para análise de sedimento, somente poucos métodos analíticos existem e a maioria deles está focada em antibióticos, como as tetraciclina (PENG et al., 2008). Com relação às metodologias de análise e quantificação de antibióticos de uso humano e veterinário em amostras de sedimento, ainda há uma grande lacuna (MARTINEZ, 2009).

Publicações recentes sobre organismos representativos mostram valores de EC₅₀ para a estreptomicina, flumequina ou oxitetraciclina, os quais podem ter efeitos prejudiciais ou muito tóxicos, como o exemplo da oxofloxacina para bactérias. Bioensaios desenvolvidos com sulfadimetoxinas ou oxitetraciclina mostram caráter tóxico aos invertebrados, inversamente, a flumequina não apresenta efeitos prejudiciais e tóxicos quanto a tilosina em invertebrados (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; KEMPER, 2008). Em consequência, baixas concentrações são suficientes para poderem alterar estruturas de comunidades (também comunidades bacterianas) ea cadeia alimentar (HERNANDO et al., 2006).

Alguns tipos de metodologias para tratamentos de efluentes contaminados por antibióticos vêm sendo estudadas, como é o caso do trabalho de Brito, Melo e Neto (2012), que propuseram um tratamento químico e biológico para efluente farmacêutico contendo ciprofloxacina utilizando processos de oxidação avançados.

1.5. Efeito da contaminação por fármacos em organismos aquáticos

No caso de peixes expostos a efluente de ETE, o efeito da “feminização” de peixes machos é considerado um indicativo da exposição a estrógenos. Pesquisas têm sido realizadas para rastrear estrógenos “reais” e/ou químicos que imitam estrógenos (também chamados de xenoestrogênios). Representantes de ambos os grupos químicos estão presentes nos efluentes como, por exemplo, estrógenos naturais (estradiol e estrona) e sintéticos (etinilestradiol) (SUMPTER, 1998).

O 17 α -etinilestradiol (EE2) é eliminado, principalmente, sob a forma de conjugados, ao passo que outras transformações metabólicas também ocorrem, mas são menos relevantes. Este composto também é um exemplo claro de um composto hormonalmente ativo (e muito potente) que, seguramente, pode ter algum impacto no sistema endócrino de organismos recipientes não-alvo, como os peixes (SUMPTER, 2005). De acordo com Thorpe et al. (2003), o EE2 foi encontrado em alguns ambientes aquáticos que recebem efluentes domésticos e é suficiente para induzir muitos dos efeitos relatados de feminização de peixes usados em testes de laboratório e dos que vivem em seu habitat natural.

Alguns estudos têm sido realizados utilizando o peixe “paulistinha” (*Danio rerio*) e foi observado que houve uma notável sensibilidade dos peixes para o EE2. A exposição crônica de “paulistinhas” machos jovens a concentrações muito baixas de EE2 (1,5 ng.L⁻¹) reverte o sexo (“*imposex*”) de machos em fêmeas fenotípicas (PAIVA; SOUZA; Van HAANDEL, 2011). A feminização induzida também tem sido demonstrada em machos jovens de paulistinha, quando expostos ao 17 β -estradiol, na concentração de 100 ng.L⁻¹, de 21 a 42 dias depois da fertilização, durante o período de diferenciação sexual (THORPE et al., 2003).

1.6. Metodologias de análise de fármacos

Para determinação de compostos farmacológicos em amostras ambientais os métodos mais utilizados de acordo com a literatura baseiam-se na extração em fase sólida (SPE) seguida por cromatografia líquida (CL) (TORRES et al., 2012). A extração em fase sólida (SPE) (LÓPEZ-SERNA et al., 2010; WANG et al., 2011; JONGH et al., 2012) apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta

forma, a seletividade analítica, possibilitando a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas (LANÇAS; QUEIROZ, 2005). Para tanto, uma amostra necessita de um pré-tratamento antes da análise cromatográfica, a qual é normalmente necessária, como a extração em fase sólida (SPE) (LAGANA et al., 2004; ALMEIDA; NOGUEIRA, 2006).

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de medicamentos justifica-se devido à inerente capacidade da técnica de separar os constituintes da amostra. Deste modo, procedimentos de CLAE são empregados na análise de amostras contendo vários fármacos concomitantemente, sendo possível separá-los e quantificá-los em uma única análise (WEINERT, 2008). Para a análise de estrógenos é utilizada, com frequência, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrômetro de massas (MS) (RODRIGUEZ-MOZAZ; ALDA; BARCELÓ, 2004; LÓPEZ-SERNA et al., 2010; SODRÉ et al., 2010). A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) tem boa sensibilidade e precisão.

Por ser necessária, a monitoração de uma ampla gama de compostos farmacêuticos, torna-se pré-requisito para se realizar uma avaliação com segurança. A maioria dos métodos realiza a extração das amostras à base de método demorado e “off-line”, a extração em fase sólida (SPE). No entanto, o crescente número de amostras a serem analisadas em laboratórios, levou à realização de estudos de monitoramento por meio do emprego de equipamentos totalmente automatizados para a realização das técnicas analíticas. Devido a isto, há um grande esforço no desenvolvimento de métodos alternativos para que as análises ambientais sejam mais rápidas, que tenham melhor relação custo-benefício e que sejam mais “sustentáveis” (LÓPEZ-SERNA et al., 2010). Ao longo dos últimos anos, houve um aumento no uso de equipamentos automáticos que integram a extração, purificação e a detecção. O equipamento SPE acoplado a LC-MS/MS foi utilizado para analisar hormônios, contaminantes emergentes em água (LÓPEZ-SERNA et al., 2010). Com respeito à análise de fármacos em ambiente aquoso, amostras de vários artigos foram publicados (FARRÉ et al., 2008; TRENHOLM; VANDERFORD; SNYDER, 2009; LÓPEZ-SERNA et al., 2010; DINH et al., 2011; PAIVA; SOUZA; Van HAANDEL, 2011). Como exemplo, Trenholm, Vanderford, e Snyder (2009), utilizaram SPE “on-line” na análise de seis fármacos em água, enquanto que Dinh et

al. (2011) relataram a aplicação de SPE “on-line” na análise de antibióticos macrolídeos.

No entanto, a utilização da cromatografia gasosa (GC-MS) não é a metodologia mais indicada, pois as amostras devem passar por mais uma etapa, a derivatização, a qual torna o procedimento mais caro e mais demorado (WANG et al., 2008). Contudo, alguns autores já relataram métodos analíticos para a detecção do etinilestradiol, β -estradiol e estrona por GC-EI-MS ou GC-NCI-MS após derivatização (KELLY, 2000; KUCH; BALLSCHMITER; 2001).

1.7. Conclusões

De acordo com a revisão de literatura realizada, ainda existem poucos estudos no Brasil relatando a ocorrência de fármacos no ambiente e seus possíveis efeitos nos seres vivos, a maioria dos estudos relatados são realizados em países desenvolvidos. Os estudos dos efeitos destes fármacos em organismos são relacionados a alterações no sistema endócrino e reprodutor como é o caso da feminização (peixes machos adquirindo características de fêmeas). Faz-se necessário um aumento no volume de estudos destes compostos no ambiente brasileiro e, principalmente, uma avaliação dos efeitos sinérgicos destes compostos nos organismos que têm contato com as matrizes ambientais como água, solo e sedimento contaminados.

Para a análise destes fármacos, diversas metodologias analíticas são utilizadas, como análise por cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos, fluorescência e espectrometria de massas, a metodologia utilizando cromatografia a gás é pouco usual, pois as amostras precisam passar pelo processo de derivatização para que seja analisada. As análises utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas é altamente precisa e sensível, sendo uma das mais indicadas para análise de fármacos. Uma solução para um dos problemas causados pela descarga de desreguladores endócrinos no ambiente aquático é uma reformulação nos meios de tratamento tradicionais, como utilização da ozonização e por raios UV.

Referências

- ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, p. 1303-1311, 2006.
- AMÉRICO, J. H. P. et al. Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-oeste do Brasil e os riscos aos recursos hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 61-67, 2012.
- ANKLEY, G. T. et al. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 15, p. 8211-8217, 2007.
- ARAUJO, K. et al. Fármacos residuais: um problema de caráter ambiental. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 5., 2010, Maceió, AL. **Anais...** Maceió: Instituto Federal de Alagoas, 2010.
- BARCELÓ, D. Pharmaceutical-residue analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 454-455, 2007.
- BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 753-761, 2004.
- BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, n. 3, p. 597-603, 2009.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. **Desalination**, Oxford, v. 198, p. 24-32, 2006.
- BRITO, C. R. F.; MELO, I. P.; NETO, J. C. Tratabilidade química e biológica de efluente farmacêutico contendo ciprofloxacino. **Revista de Estudos Ambientais (Online)**, Blumenau, v.14, n.3, p. 6-16, 2012.
- CARVALHO, E.V. et al. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 22, n. 1-2, p.1-8, 2009.
- CHRISTIAN, T. et al. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 36-44, 2003.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÒ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

DINH, Q. T. et al. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. **Talanta**, London, v. 85, p. 1238–1245, 2011.

DINIZ, M. S. et al. Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 22, n. 10, p. 1613-1622, 2010.

FARRÉ, M. et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 11, p. 991-1007, 2008.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 76, p. 122-159, 2006.

FLAHERTY, C. M.; DODSON, S. I. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, p. 200–207, 2005.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). **Talanta**, London, v. 81, p. 355–366, 2010.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas**: Ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. 190 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GINEBRED, A. et al. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in river: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environment International**, New York, v. 36, p. 153-162, 2010.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 26, n. 8, p. 1553-1562, 2007.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 81, p. 989-912, 2009.

HALLING-SØRENSEN, B. Algal toxicity of antibacterial agents in intensive farming. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, p. 731-739, 2000.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 1, p. 7-20, 1998.

HERNANDO, M. D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, London, v. 69, p. 334–342, 2006.

HOHENBLUM, P. et al. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 333, n. 1-3, p. 185–193, 2004.

JELIĆ, A.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 80, p. 363–371, 2009.

JIANG, W. et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 24, n. 2, p. 320-328, 2012.

JONGH, C. M. et al. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 427-428, p. 70–77, 2012.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial. **Ecological Indicators**, Kiel, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 15, p. 3201-3206, 2001.

KUMAR, K. A.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: Kinetic and mechanistic evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, p. 820-828, 2009.

KUSTER, M. et al. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, p. 880-886, 2010.

KÖCK-SCHULMEYER, M. et al. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat River (NE Spain). **Chemosphere**, Oxford, v. 82, p. 670-678, 2011.

LAGANA, A. et al. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 501, p. 79–88, 2004.

LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida no tubo e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

LEE, H.-B.; SARAFIN, K.; PEART, T. E. Determination of β -blockers and β 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1148, p. 158–167, 2007.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 83, p. 410-424, 2010.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, London, v. 157, p. 2893–2902, 2009.

MASSARO, F. C. **Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de Hydra (Cnidaria: Hydrozoa)**. 2011. 502 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MING, C. T. et al. Multiresidue determination of sulfonamides, macrolides, trimethoprim, and chloramphenicol in sewage sludge and sediment using ultrasonic extraction coupled with solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Beijing, v. 37, p. 1119–1124, 2009.

PAIVA, F. V.; SOUZA, N. C.; Van HAANDEL, A. C. Identificação de compostos orgânicos e farmacêuticos em esgoto hospitalar utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 37-44, 2011.

PENG, X. et al. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, p. 73–79, 2008.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 601-616, 2010.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L. de; BARCELO, D. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 76, p. 6998-7006, 2004.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 725-759, 2006.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 96, p. 92-98, 2010.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 102-103, p. 337-342, 1998.

SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2005.

THORPE, K. L. et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 37, p. 1142-1149, 2003.

TORRES, N. H. et al. Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17alpha-ethinylestradiol and 17beta-estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. **IOSRJEN Journal of Engineering**, New Delhi, v. 2, p. 984-989, 2012.

TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. On-line solid phase extraction LC-MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: a green alternative to conventional methods. **Talanta**, London, v. 79, p. 1425-1432, 2009.

VALCÁRCEL, Y. et al. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river - and drinking - water of the Madrid Region in Spain. **Chemosphere**, Oxford, v. 2, p. 1062–1071, 2011.

VERLICCHI, P. et al. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 389, p. 416-428, 2010.

WANG, S. et al. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, p. 194-201, 2008.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, New York, v. 45, p. 1818-1828, 2011.

WEINERT, P. **Desenvolvimento de métodos para determinação de sulfonamidas, dipirona e citrato de sildenafil em matrizes diversas**. 2008. 298 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

2. Avaliação dos hormônios nas águas superficiais no Rio Piracicaba e água de abastecimento

Resumo: Há um impacto significativo sobre o meio aquático causado pela descarga de esgotos em cursos de água. Consequentemente, nos últimos anos, a atenção tem sido focada em algumas substâncias, tais como hormônios, que têm propriedades persistentes e estão presentes nos efluentes. Detecção e investigação sobre o destino desses fármacos em ecossistemas aquáticos tornaram-se uma prioridade em química ambiental. Os objetivos deste trabalho foram adaptar e validar um método para analisar e monitorar os hormônios (17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, testosterona, progesterona, estriol e estrona) nas águas de superfície e água tratada coletada em residência (cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil), utilizando um sistema cromatográfico de fase líquida acoplado a uma fonte de ionização por *electrospray* e um sistema de analisador de massas triplo quadrupolo (LC-ESI-MS/MS). As amostras foram coletadas no período de março de 2011 a dezembro de 2012, em seis pontos ao longo do Rio Piracicaba e em um ponto foi coletada a água tratada em uma residência na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os limites de detecção foram de 0,7 ng.L⁻¹ para o estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, e 0,5 ng.L⁻¹ para estrona e testosterona, e 0,3 ng.L⁻¹ para a progesterona. A linearidade foi obtida no intervalo de 7-100 ng.L⁻¹ para o estriol e 17 β -estradiol, 7-200 ng.L⁻¹ para 17 α -etinilestradiol, 5-100 ng.L⁻¹ para estrona e testosterona, e 3-100 ng.L⁻¹ para a progesterona. Os coeficientes de regressão (r^2) variaram de 0,98-0,99 e as recuperações foram 74-97% das amostras fortificadas com 20 ou 100 ng.L⁻¹. Este método foi utilizado com sucesso para determinar os níveis de estrógenos em amostras de água coletadas ao longo do Rio Piracicaba, Estado de São Paulo. Os hormônios estriol, estrona, progesterona, 17 β -estradiol, e o 17 α -etinilestradiol foram detectados em algumas das amostras durante o período de coleta, e suas maiores concentrações foram de 90, 28, 26, 137 e 194 ng.L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Água Superficial. Cromatografia Líquida. Hormônios. Espectrômetro de Massas. Contaminação Ambiental. Ambiente Aquático.

Abstract: There is a significant impact on the aquatic environment caused by the discharge of sewage into water ways. As a result, in recent years attention has been focused on some substances, such as hormones, that have persistent properties and are present in effluents. Detection and investigation of the fate of these pharmaceuticals in aquatic ecosystems have become a priority in environmental chemistry. The objectives of this study were to adapt and validate a method for analysing and monitoring hormones (17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, testosterone, progesterone, estriol, and estrone) in surface and treated water, using a method based on electron spray coupled to liquid chromatography and a mass spectrometer (ESI-LC-MS/MS) detector. Samples were collected from March 2011 to December 2012, at 6 points along the Piracicaba River and in one point was collected treated water in a residence in the city of Piracicaba, São Paulo, Brazil. Detection limits were 0.7 ng.L⁻¹ for estriol, 17 β -estradiol, and 17 α -ethinylestradiol, and 0.5 ng.L⁻¹ for estrone and testosterone, and 0.3 ng.L⁻¹ for progesterone. Linearity was achieved in range of 7-100 ng.L⁻¹ for estriol and 17 β -estradiol, 7-200 ng.L⁻¹ for 17 α -ethinyl estradiol, 5-100 ng.L⁻¹ for estrone and testosterone, and 3-100 ng.L⁻¹ for progesterone. The regression coefficients (r^2) ranged from 0.98 to 0.99 and recoveries were 74–97% of water samples spiked with 20 or 100 ng.L⁻¹. This method was successfully used to determine the levels of estrogens in water samples collected along the Piracicaba River, State of São Paulo. Hormones estriol, estrone, progesterone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol were detected in some samples during the collection period and their highest concentration were 90, 28, 26, 137 and 194 ng.L⁻¹, respectively.

Keywords: Surface Water. Liquid Chromatography. Hormones. Mass Spectrometer. Environmental Contamination. Aquatic Environment.

2.1. Introdução

Atualmente, cerca de 15 mil substâncias diferentes são utilizadas como produtos farmacêuticos no mundo. No entanto, somente 150 compostos têm sido investigadas em estudos ambientais (KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011). Sendo que, dentre os trabalhos realizados, alguns estudam o ambiente aquático, o qual recebe grandes quantidades de contaminantes advindas de diversas fontes de descarga de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE). Rios, lagos e aquíferos que são expostos a estes contaminantes são principalmente situado perto de locais onde há muitas pessoas que utilizam grandes volumes de água (KUSTER et al., 2010).

Estudos sobre a presença de fármacos no ambiente iniciaram na década de 1970 (TABAK; BRUNCH, 1970; GARRISON et al., 1976; HIGNITE; AZARNOFF, 1977), e resultou na detecção de alguns destes compostos em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) nos Estados Unidos. Vários estudos têm revelado a presença destes compostos em corpos hídricos em muitos países (SIREs; BRILLAS et al., 2012; TORRES et al., 2012). Hormônios foram detectados em águas residuárias, águas superficiais e subterrâneas em várias regiões do mundo, em concentrações no intervalo de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ALDA; BARCELÓ, 2001; FARRÉ et al., 2008; LÓPEZ-SERNA et al., 2010). Uma quantidade significativa de fármacos está sendo cada vez mais utilizada e são substâncias químicas bioativas (SIREs; BRILLAS, 2012). Estes compostos, uma vez no meio ambiente, podem comprometer a qualidade dos recursos hídricos, da biodiversidade e do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (ALDA; BARCELÓ, 2001; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011).

Alguns medicamentos, como os estrógenos e progestógenos, são considerados contaminantes emergentes (GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2009), e não pode-se, ainda, determinar seus efeitos na saúde humana. Além disso, não existem leis que regulamentam o limite máximo permitido em vários habitats ambientais (KUSTER et al., 2010; SIREs; BRILLAS, 2012; TORRES et al., 2012). Estes compostos são considerados disruptores endócrinos (DE), afetam negativamente o sistema endócrino tanto de organismos aquáticos, quanto de seres humanos. Pesquisas desenvolvidas por alguns autores, concluíram que os

organismos aquáticos desenvolveram distúrbios reprodutivos decorrentes da presença de estrogênios no ambiente (CÉSPEDES et al., 2005; WANG et al., 2008; DINIZ et al., 2010; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011).

Existem várias maneiras dos fármacos e seus metabólitos alcançarem o ambiente. Além do esgoto sanitário, a falta de descarte correto de embalagens, subprodutos da produção de medicamentos e lavagens de recipientes industriais, constituem as principais vias de contaminação. Outra via potencial significativa de contaminação, é a eliminação de resíduos de antimicrobianos e hormônios por meio de resíduos de origem animal, advindos de práticas veterinárias. Mesmo o esterco animal utilizado como fertilizante contribui para a contaminação de água superficial, bem como a água subterrânea (FARRÉ et al., 2008). Pesquisas estimam que 70 a 80% dos fármacos administrados em fazendas são descartados no ambiente (KÜMMERER, 2003).

No entanto, muitos medicamentos são desenvolvidos para terem efeitos a longo prazo, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir ao seu propósito terapêutico. Contudo, após sua administração, uma porção significativa do fármaco é excretada. Enquanto algumas das substâncias são degradadas, outras persistem no ambiente e podem resistir às várias etapas dos processos de tratamento de água convencionais (FARRÉ et al., 2008). A persistência dos fármacos em água residuária pode resultar de remoção incompleta em ETE (BARCELÓ, 2007; GROS et al., 2010; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2011), assim como sua lixiviação para as águas subterrâneas (FARRÉ et al., 2008; KUMAR; MOHAN; SARMAH, 2009), da liberação de efluentes nos cursos d'água (JONGH et al., 2012), da fertilização do solo com esterco animal, das águas residuais provenientes de indústrias farmacêuticas e do descarte inadequado de medicamentos com a validade expirada (ALDA; BARCELÓ, 2001).

Contudo, a remoção eficiente de drogas em ETE é dependente, não só no processo de tratamento aplicado, mas também de alguns fatores, tais como, a idade do lodo, o tempo de retenção hidráulica e a temperatura, que depende da época do ano (LÓPEZ-SERNA et al., 2010; GROS et al., 2010; JONGH et al., 2012; VERLICCHI et al., 2010). Devido à remoção incompleta de hormônios (17 β -estradiol e estriol) em águas residuárias, estes são encontrados em ambientes aquáticos. Estes são considerados os principais hormônios produzidos pelo corpo humano e, em combinação com a progesterona, desempenham papéis importantes no controle

do ciclo menstrual. Sua presença em águas naturais é um forte indício de contaminação por esgotos sanitários (AL AUKIDY et al., 2012). O esteróide sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) também é descartado em corpos d'água e efluentes (DINIZ et al., 2010). Sua introdução contínua no ambiente e suas propriedades bioativas e farmacêuticas podem colocar em perigo a vida de organismos aquáticos e humanos (HERNANDO et al., 2006; FARRÉ et al., 2008; KUSTER et al., 2009; LÓPEZ-SERNA et al., 2010). Portanto, estudar a contaminação por hormônios em bacias hidrográficas tornou-se de extrema importância.

Como o destino e o comportamento dos fármacos e seus metabólitos no ambiente não é bem conhecida (FARRÉ et al., 2008; LÓPEZ-SERNA et al., 2010), têm sido desenvolvidos, progressivamente, novos métodos e técnicas analíticas altamente sensíveis para as análises multiresiduais de compostos farmacêuticos por meio de cromatografia (em concentrações de ng.L⁻¹).

A cromatografia permite a detecção e quantificação destes compostos em corpos d'água (GINEBREDÁ et al., 2010; VALCÁRCEL et al., 2011; PEREIRA et al., 2012), e para estas análises, pode-se utilizar extração em fase sólida (SPE) (LÓPEZ-SERNA et al., 2010; FATTA-KASSINOS et al., 2011; JONGH et al., 2012), e subsequente detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS) (FARRÉ et al., 2008; LÓPEZ-SERNA et al., 2010; WANG et al., 2011). No entanto, a utilização da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) não é o método mais rápido e barato de análise, pois as amostras devem passar pela etapa de derivatização (WANG et al., 2008).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram adaptar e validar a metodologia para analisar e monitorar os hormônios 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona, estriol, progesterona e testosterona em amostras de água coletadas em sete pontos ao longo do Rio Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil. A técnica utilizada foi baseada em um método validado e otimizado em análises por SPE e posteriormente por LC-MS/MS.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Caracterização da área de estudo

O Rio Piracicaba começa no município de Americana, pela junção dos rios Jaguari e Atibaia, seguindo depois até a represa de Barra Bonita (SP), onde ocorre sua foz junto ao Rio Tietê (SAAE, 2004).

Na Sub-bacia do Rio Piracicaba, que inclui as sub-bacias dos rios Jaguari, Atibaia, Camanducaia e Corumbataí, 45 municípios lançam fortes cargas remanescentes de esgotos domésticos. Grande número de indústrias dos ramos de papel e celulose, alimentício, têxtil, petroquímico e sucroalcooleiro, também contribuem para que os corpos d'água sejam continuamente deteriorados. Abaixo da cidade de Americana (SP), a Sub-bacia do Rio Piracicaba (trecho do Rio Piracicaba) abrange 21 municípios, sendo que 6 deles pertencem também à Sub-bacia do Corumbataí, ainda preservada e atualmente responsável por 100% dos abastecimentos para o município de Piracicaba (SP) (SAAE, 2004).

O Rio Piracicaba abastece cidades que compõem um importante pólo industrial e agrícola. A principal via de contaminação deste rio é causada pelo descarte de águas residuárias, as quais têm cada vez mais poluentes devido ao aumento da densidade populacional (mais de 4 milhões de pessoas, utilizando em torno de 95% da Sub-bacia do Rio Piracicaba para seu abastecimento) (TORRES et al., 2012).

A bacia hidrográfica do Rio Piracicaba se caracteriza por invernos secos (abril-agosto) e verões chuvosos (outubro-março). A precipitação média anual varia de 1300 a 1800 mm; as médias mensais indicam que os meses menos chuvosos são julho e agosto e as maiores precipitações ocorrem em dezembro e janeiro (MANSOR; FILHO; ROSTON, 2006). Os sete pontos de coleta foram plotados em mapa do *Google Earth* (Figura 1).

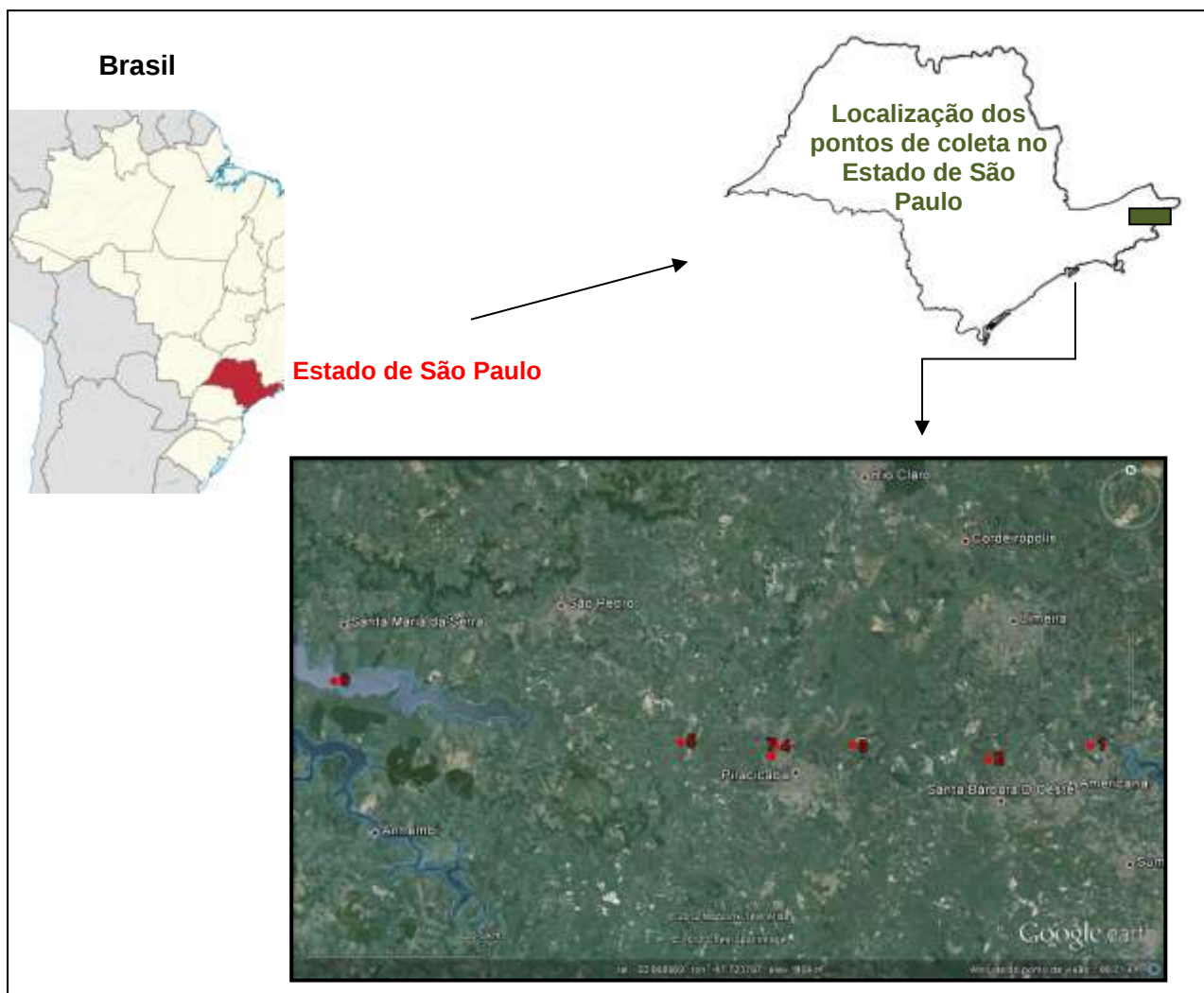


Figura 1 – A região em verde escuro no mapa do Estado de São Paulo é a localização dos pontos de coleta ao longo do Rio Piracicaba e os pontos em vermelho são os pontos de coleta

2.2.2. Materiais

Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC (MTedia Company, EUA), água ultrapura (Pura-Q, Brasil), formiato de amônio (Vetec, Brasil) e ácido fórmico (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA). Os padrões analíticos utilizados foram estriol (E3; pureza 99,0%, adquirido da Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha), 17α -etinilestradiol (EE2; pureza 98,5%, adquirido da Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha), 17β -estradiol (E2; pureza 99,0%, adquirido da

Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha), estrona (E1; pureza 99,0%, adquirido da ChemService, EUA), progesterona (PROG; pureza 99,5%, adquirido da Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha), testosterona (TEST; pureza 99,0%, adquirido da Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha), e filtros de fibra de vidro de 0,47 e 0,22 μm (Mackerey-Nagel, Alemanha). A Tabela 1 mostra a pureza, a fórmula molecular e o peso molecular de cada hormônio estudado.

Tabela 1 - Pureza, fórmula molecular e Peso Molecular dos hormônios estudados

Hormônio	Pureza	Fórmula molecular	Peso Molecular (g.mol ⁻¹)
E1	99,0%	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270
E2	99,0%	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38
EE2	98,5%	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,40
E3	99,0%	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,39
PROG	99,5%	C ₁₂ H ₃₀ O ₂	314,47
TEST	99,0%	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288,39

Fonte: USDL (2007)

2.2.3. Instrumentação

As análises de LC-MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200 acoplado a um espectrômetro de massas Triple Quad Agilent modelo 6410. O sistema cromatográfico consistiu de uma bomba binária, amostrador automático e um compartimento com controle de temperatura da coluna. O sistema triplo quadrupolo (QQQ) é composto de uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e todos os instrumentos foram controlados por meio do *software* Mass Hunter, versão B.02.01 beta (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

2.2.4. Análises cromatográficas

A separação foi realizada utilizando uma coluna Zorbax Eclipse Plus (3,0 x 100 mm, tamanho de partícula de 3,5 μm ; Agilent Technologies) a 30°C no modo isocrático. A fase móvel foi de 20% de água ultrapura (5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico) e 80% de metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico. A corrida cromatográfica foi realizada em 5 minutos, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 μL .

2.2.5. Parâmetros do espectrômetro de massas

Depois da separação cromatográfica, os analitos foram ionizados utilizando uma interface ESI operando no modo de ionização negativo. A otimização adequada dos parâmetros do ESI foi necessária para aumentar a resposta analítica e obter elevadas sensibilidades para o íon molecular. Injeções sucessivas de uma solução padrão a 2 ppm de cada composto foram realizadas, variando os parâmetros do ESI. Foram selecionados os seguintes parâmetros: fluxo de gás de 10 L.min⁻¹, temperatura do gás 300°C, pressão do gás de nebulização a 40 psi e a voltagem do capilar a -4000V. Nitrogênio foi utilizado como gás de secagem. Os parâmetros utilizados nas análises para identificar e quantificar os compostos-alvo, foram otimizados pelo “Optimizer”, software Mass Hunter, versão B.02.01 beta (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

2.2.6. Validação

A validação da metodologia para analisar os hormônios EE2, E2, E3, E1, PROG e TEST foi obtida através da verificação de alguns parâmetros como linearidade, precisão, recuperação e especificidade por LC-MS/MS. A determinação dos coeficientes de correlação (r^2) foram baseadas na variação dos dados. Para precisão, cinco repetições de padrão mix a 60 ng.L⁻¹ foram analisadas no mesmo dia pelo mesmo operador. O limite de detecção observado (LOD) foi definido como a menor concentração na qual um pico cromatográfico apareceu e foi possível “enxergar” na relação sinal/ruído de 3,3 S/N. O limite de quantificação observado (LOQ) foi calculado utilizando uma relação sinal/ruído de 10 S/N. Os testes de

recuperação foram realizados em triplicata utilizando 200 mL de água filtrada através de um filtro de membrana de vidro (0,47 µm) contendo 20 ng ou 100 ng de cada composto-alvo. A quantificação foi realizada por meio de calibração de padrão externo.

2.2.7. Coletas das amostras

As amostras foram coletadas em 6 pontos ao longo do Rio Piracicaba, e água tratada coletada em residência na cidade de Piracicaba, conforme mostrado na Figura 1 e na Tabela 1. As coletas foram realizadas no período de março de 2011 a dezembro de 2012 (n = 154 amostras), seguindo recomendações citadas no APHA (2005) e EPA (2007).

As amostras foram coletadas em triplicata de 1 L em garrafas de vidro âmbar. Antes das coletas, as garrafas de vidro âmbar foram descontaminadas com sabão alcalino, depois de lavagens com água corrente, água deionizada, solução de 5% de dimetildiclorosilano em tolueno, e água do rio no momento da coleta. As garrafas foram completamente cheias no momento da coleta a fim de minimizar o contato entre a água e o ar. Em seguida, as garrafas foram transportadas ao laboratório.

Todas as amostras foram imediatamente submetidas à extração ao chegarem ao laboratório. As amostras de água (200 mL), valor do volume próximo ao utilizado por Plotan et al. (2012), foram filtradas em filtro de fibra de vidro de 0,47 µm e inseridas em frascos de vidro envoltos em papel alumínio para evitar interferência de luz (PROG e E1 degradam cerca de 37% na presença da luz, de acordo com Pereira et al. 2012). O *clean-up* nas amostras foi realizado utilizando cartucho OHASIS HLB (500 mg, 6 mL; Waters Milford, EUA) e uma câmara de vácuo. O processo de extração incluiu o condicionamento com 4 mL de água ultrapura e metanol; carregamento da amostra (200 mL); lavagem com 4 mL de água e eluição com 8 mL de metanol. O eluente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40 °C e ressuspendido em 4 mL de metanol:água ultrapura (50:50 v/v).

Tabela 1 - Pontos de coleta e suas coordenadas correspondentes

Local	Tipo	Coordenadas
Rodovia Anhanguera na cidade de Americana (P1)	Água superficial	22°41.260'S, 47°18.678'W
Saída da Rodovia Luiz de Queiroz (P2)	Água superficial	22°42.651'S, 47°25.708'W
Ponte na entrada da Cooperçúcar (P3)	Água superficial	22°41.748'S, 47°35.003'W
Ponte do Caixão na cidade de Piracicaba (P4)	Água superficial	22°41.748'S, 47°40.285'W
Artemis (P5)	Água superficial	22°41.580'S, 47°46.737'W
Ponte sobre a represa de Santa Maria da Serra (P6)	Água superficial	22°37.666'S, 48°10.430'W
Residência na cidade de Piracicaba (P7)	Água tratada	22°42'27"S, 47°40'27"W

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Condições do espectrômetro de massas

Foram utilizados formiato de amônio e ácido fórmico como aditivos de ionização na fase móvel do cromatógrafo líquido, estimulando a formação de íons. A injeção dos padrões nesta metodologia foi otimizada, de acordo com seguintes parâmetros: íon precursor, energia de fragmentação, energia de colisão e abundância de cada composto-alvo. A Tabela 2 mostra as condições otimizadas para o espectrômetro de massas para as análises dos hormônios-alvo deste trabalho.

Tabela 2 – Íon precursor, energia de fragmentação, íon produzido, energia de colisão e abundância das moléculas hormônios na fonte ESI e polaridade positiva

Composto	Íon precursor	Energia de fragmentação (eV)	Íon produzido	Energia de colisão (eV)	Abundância
E1	271,2	120	157	16	5802
	271,2	120	133	20	5742
E3	289,2	115	107	28	1007
	289,2	115	77	68	666
TEST	289,4	125	97	20	42623
	289,4	125	109	24	38498
EE2	297,2	85	107	24	1247
	297,2	85	77	64	921
E2	273,2	90	107	28	1150
	273,2	90	77	64	810
PROG	315,2	115	97	20	47183
	315,2	115	109	24	45308

2.3.2. Linearidade

As regressões lineares e os valores dos coeficientes de correlação (r^2) para o método cromatográfico que foi aplicado para os hormônios, são apresentados na Tabela 3. Para cada ponto da curva de calibração, utilizou-se de sete a oito pontos, os quais foram obtidos a partir da média de injeções em triplicata. O método mostrou ser mais sensível para a progesterona, a qual obteve sensibilidade na concentração de 3 ng.L^{-1} (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de regressão linear e coeficiente de correlação (r^2) para o método cromatográfico aplicado aos hormônios

Hormônio	Curva de calibração (ng.L ⁻¹)	Coeficiente de correlação (r^2)
E3	7; 10; 20; 40; 60; 80 e 100	0,9937
E2	7; 10; 20; 40; 60; 80 e 100	0,9935
EE2	7; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200 e 500	0,9915
E1	5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100	0,9903
PROG	3; 10; 20; 40; 60; 80 e 100	0,9965
TEST	5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100	0,9956

2.3.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio de cinco injeções do padrão mix de hormônios dissolvidos em solvente na concentração de 60 ng.L⁻¹ e também de amostras branco fortificadas nas concentrações de 40 e 100 ng.L⁻¹. Calculou-se o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) para os hormônios alvo deste trabalho (Tabela 4). A última coluna da Tabela 4 mostra a concentração medida relatados de águas superficiais de outros rios no Brasil e em outros países do mundo. As variações analíticas causadas pelas análises variaram de 0,007 a 0,04% (RSD).

Tabela 4 - Fármacos, valores de desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR%) na concentração de 60 ng.L⁻¹, para os hormônios analisados por LC-MS/MS

Fármaco	Desvio padrão (s)	Desvio padrão relativo (DPR%)
E2	5,59	0,04
EE2	3,19	0,02
E3	1,63	0,01
E1	1,13	0,007
PROG	1,25	0,008
TEST	1,19	0,009

Os valores das recuperações variaram de 80-96%, e estes valores são satisfatórios quando se está analisando baixos níveis de contaminantes em amostras complexas, tais como as amostras de água superficiais (SODRÉ et al., 2010). Os maiores percentuais de recuperações foram obtidas para o E1 ($96,7 \pm 3,04\%$), PROG ($93,98 \pm 2,43\%$), e EE2 ($92,99 \pm 2,19\%$), seguidos do E2 ($83,97 \pm 1,9\%$), TEST ($80,44 \pm 6,7\%$) e E3 ($74,47 \pm 5,17\%$). O valor da recuperação média para o PROG obtido neste trabalho ($93,98 \pm 2,43\%$), foi maior que o reportado por Plotan et al., em 2013 ($80 \pm 4\%$). Os valores das recuperações, o desvio padrão (s) e coeficiente de variação para cada hormônio alvo deste trabalho, e os valores das recuperações obtidos por alguns autores, também estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de recuperação (%), desvio padrão(s) e coeficiente de variação (CV%), e suas médias ($\bar{x}$) aos níveis de 20 e 100 ng.L⁻¹ para os hormônios analisados por LC-MS-MS

Hormônio	Fortificações (ng.L ⁻¹)	Recuperação (%) e desvio padrão (s)	CV (%)	Valores obtidos por Sodré et al. (2010)	Valores obtidos por Plotan et al. (2013)
E1	20	96,13± 2,27	2,36	81%	-
	100	97,27± 3,82	3,93		
	$\bar{x}$	96,7± 3,04	3,14		
E2	20	82,14± 0,82	1,00	109%	94 ± 6%
	100	85,8± 2,99	3,48		
	$\bar{x}$	83,97± 1,9	2,24		
EE2	20	92,44± 0,98	1,06	103%	-
	100	93,55± 3,4	3,63		
	$\bar{x}$	92,99± 2,19	2,34		
E3	20	74,12± 7,05	9,51	140%	-
	100	74,83± 3,29	4,39		
	$\bar{x}$	74,47± 5,17	6,95		
PROG	20	93,31± 1,32	1,41	-	86 ± 7%
	100	94,66± 3,55	3,75		
	$\bar{x}$	93,98± 2,43	2,58		
TEST	20	81,82± 9,63	10,68	-	80 ± 4%
	100	79,06± 3,77	4,76		
	$\bar{x}$	80,44± 6,7	7,72		

2.3.4. Determinação dos valores de LOD e LOQ

Os limites de detecção observados (LOD) foram calculados pelo método visual (HAMID; ESKICIOGLU, 2012), observou-se a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser detectado visualmente, mas não quantificada pelo equipamento. O limite de quantificação observado (LOQ) para cada um dos hormônios foi determinado utilizando o primeiro nível de concentração da curva analítica. Os valores de LOD e LOQ são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores observados para os Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ) para os hormônios estudados

Hormônios	LOD (ng.L ⁻¹)	LOQ (ng.L ⁻¹)
E3	0,7	7,0
E2	0,7	7,0
EE2	0,7	7,0
E1	0,5	5,0
PROG	0,3	3,0
TEST	0,5	5,0

2.4. Análise de hormônios em água superficial e de abastecimento

De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica de São Paulo (DAEE), a Figura 2 mostra os valores das precipitações médias nos anos de 2011 e 2012 no Rio Piracicaba, e foram mensuradas mensalmente nos três postos de monitoramento localizados no Rio Piracicaba nas cidades de Americana, Santa Bárbara D'Oeste, e Piracicaba.

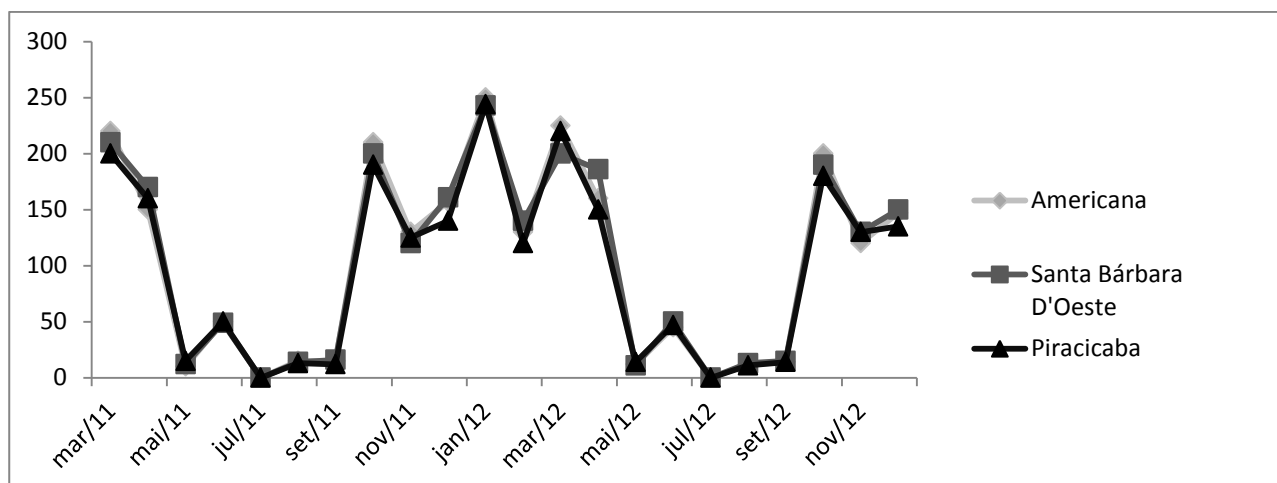


Figura 2 – Valores das precipitações médias nos anos de 2011 e 2012 nas cidades de Americana, Santa Bárbara D'Oeste e Piracicaba, que pertencem à Sub-bacia do Rio Piracicaba

Fonte: Dados fornecidos pelo DAEE (2014).

A Tabela 7 mostra as concentrações de cada um dos compostos selecionados mensurados nas amostras de água na superfície dos sete pontos de coleta. Os fármacos foram organizados de acordo com o seu grupo terapêutico. Em geral, cinco dos seis fármacos selecionados foram detectados nas águas superficiais, como o E3, E2, EE2, E1 e PROG. A TEST não foi detectada. Cinco compostos foram detectados em amostras de água de superfície, e as concentrações mais elevadas obtidas foram para o E2 (137 ng.L^{-1}) e EE2 (194 ng.L^{-1}), enquanto que concentrações menores foram observadas para o E1 (82 ng.L^{-1}), E3 (26 ng.L^{-1}), valor abaixo dos 182 ng.L^{-1} , encontrados por Sodré et al. (2010), e PROG (3 ng.L^{-1}). Dos seis compostos selecionados investigados neste trabalho, nenhum deles havia sido monitorado no Rio Piracicaba.

Nos meses de estiagem na Sub-bacia do Rio Piracicaba, que vai dos meses de maio a agosto, pôde-se observar, através da Figura 2, que a detecção de alguns hormônios está diretamente relacionada à baixa vazão do rio na referida época.

Tabela 7 – Concentrações dos hormônios nos pontos de coleta ao longo do Rio Piracicaba e água tratada de março de 2011 a dezembro de 2012

Grupo terapêutico	Composto	Concentração (ng.L ⁻¹)						
		Pontos de coleta ao longo do Rio Piracicaba						Água tratada
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Estrógenos naturais	E1	28 (mai ¹)	nd	nd	nd	Nd	14 (ag ¹);	nd
	E2	nd	nd	nd	137 (set ¹)	116 (set ¹)	82 (set ¹)	nd
	E3	nd	nd	nd	nd	nd	90 (set ¹)	nd
	PROG	nd	nd	3 (jul ¹)	nd	nd	26 (set ¹)	nd
	TEST	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Estrógenos sintéticos	EE2	nd	Nd	150 (set ¹)	93 (jul ¹)	194 (ag ¹);	26 (jul ¹); 92 (set ¹)	nd
						135 (set ¹); 75 (out ¹)		

nd: não detectado

¹mai (maio); jun (junho); jul (julho); ag (agosto); set (setembro); out (outubro)

As quantidades dos hormônios E1, E2 e E3, que são excretadas diariamente por um indivíduo, de acordo com Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000), foram comparadas aos níveis encontrados no Rio Piracicaba e estão apresentados na Tabela 8. As concentrações do hormônio E1 que foram detectadas nas amostras de água superficiais nos locais de coleta, foram maiores do que o valor da excreção diária humana descrita na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores estimados dos estrógenos E1, E2, e E3 excretados por humanos diariamente ($\mu\text{g}/\text{dia}$)^a e os valores máximos encontrados em amostras de água neste trabalho (ng.L^{-1})^b

Hormônios	E1 ^a ($\mu\text{g.dia}^{-1}$)	E1 ^b (ng.L^{-1})	E2 ^a ($\mu\text{g.dia}^{-1}$)	E2 ^b (ng.L^{-1})	E3 ^a ($\mu\text{g.dia}^{-1}$)	E3 ^b (ng.L^{-1})
Homens	3,9		1,5		7	
Mulheres em ciclo menstrual	8	82	4,8	37	16,3	26
Mulheres na menopausa	4		1		7,3	
Mulheres grávidas	600		6000		6859	
Total (μg)	615,9	0,082	6007,3	0,137	6889,6	0,026
Porcentagem de diferença comparando a quantidade de hormônios excretados por humanos e os encontrados neste trabalho (%)	2,1 1,02 2,05 0,013	-	5,4 1,7 8,2 0,001	-	0,4 0,16 0,35 0,0004	-

^a Dados coletados de Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000).

As faixas de concentração para quatro compostos estrogênicos (E1, E2, E3 e EE2) encontrados na Sub-bacia do Rio Atibaia, variaram entre 2,2 e 39 ng.L^{-1} (SODRÉ et al., 2010). Estes valores são inferiores aos determinados no presente estudo, que variou de 58 a 194 ng.L^{-1} (Tabela 7). As concentrações mais altas de hormônio mensuradas foram a do EE2, que também foi o estrogênio mais frequentemente detectado nas amostras de água superficiais. Isto se deve ao EE2 ser um estrógeno (consumido via oral), ser usado intensivamente nas formulações modernas de contraceptivos orais combinados (HAN et al., 2012). A maior concentração de EE2 foi encontrada nos locais próximos às cidades de Santa

Bárbara D'Oeste e Americana, que lançam grandes quantidades de esgoto sanitário sem tratamento no Rio Piracicaba (P3) (Tabela 7). Estes resultados são devidos, provavelmente, ao elevado número de mulheres que utilizam anticoncepcionais compostos de etinilestradiol, os quais chegam ao rio através do esgoto sanitário sem o devido tratamento.

Jiang et al. (2012) detectaram que os hormônios E2 e EE2 foram os que apresentaram maior atividade estrogênica nas amostras analisadas pelos autores na China, assim como neste trabalho os mesmos hormônios também foram detectados em amostras de água em concentrações que indicam alto aporte de esgoto sanitário.

A comparação entre os dados obtidos neste trabalho e os mesmos compostos encontrados em corpos de água em outros países (FATTA-KASSINOS; MERIC; NIKOLAOU, 2011; SPONGBERG et al., 2011; JONG et al., 2012), revela que as concentrações encontradas em amostras de água superficiais relatadas em outros países, é significativamente maior do que aquelas encontradas neste trabalho. Esta variabilidade encontrada entre os trabalhos, provavelmente reflete diferentes padrões de consumo de produtos farmacêuticos (Tabela 9).

De acordo com os valores mostrados na Tabela 9, concentrações menores do E1 foram encontradas na Alemanha, EUA, Áustria, Coreia do Sul e China, se comparadas ao valor encontrado no Rio Piracicaba. A concentração de EE2 encontrada no Rio Piracicaba foi muito mais elevada que as concentrações encontradas na Alemanha (KUCH; BALLSCHMITER, 2001), EUA (BENOTTI et al., 2009), Áustria (HOHENBLUM et al., 2004) e China (GROS et al., 2010). Isto ocorre também no caso do E3, as concentrações deste estrógeno encontradas na Áustria e China foram menores que a encontrada neste trabalho.

Tabela 9 - Comparação das concentrações de compostos estrogênicos mensurados em corpos hídricos de diversos países (em ng.L⁻¹)

Local	E1	E2	EE2	E3	Referência
Alemanha	0,1-4,1	0,15-3,6	0,1-5,1	-	KucheBallschmitter (2001)
Grécia	Nd	nd	nd	nd	Arditsoglou e Voutsas (2010)
Portugal	Nd	nd	nd	-	Ribeiro et al. (2009)
EUA	nd-0,9	nd-17	nd-1,4	-	Benotti et al. (2009)
Áustria	nd-4,6	nd-1,2	nd-0,33	nd-1,9	Hohenblum et al. (2004)
Coreia do Sul	nd-5,0	nd	nd	nd	Kim, Cho e Kim (2007)
China	nd-3,8	nd-0,97	-	nd-5,79	Lu et al. (2010)
China	0,45-3,0	nd-1,8	nd-4,4	nd-4,4	Gros et al. (2010)
Brasil	14-82	90-137	24-194	nd-26	Este trabalho

-: não disponível. nd: não detectado.

As características hidrodinâmicas do corpo receptor de água, especialmente sua vazão, afeta sua capacidade de diluir estes compostos e são de extrema importância para a redução e o controle dos possíveis efeitos toxicológicos dos hormônios liberados no ambiente, bem como ajudar a mitigar os riscos para o ambiente.

E, se a análise do risco ambiental é estendida a uma mistura de compostos, os efeitos são ainda mais prejudiciais, devido aos efeitos sinérgicos. Por isso mais medições são necessárias para reduzir o risco ambiental provocado por hormônios, incluindo o controle da origem dos compostos mais críticos. Os resultados apresentados neste trabalho podem ser úteis no direcionamento da questão norteadora no desenvolvimento de novas tecnologias no tratamento de água.

2.5. Efeito de matriz

O efeito de matriz (EM) tem sido um problema comum na análise de fármacos, e deve ser considerado para cada substância e para cada tipo de matriz analisada, devido à variabilidade das propriedades físico-químicas e à complexidade das matrizes. Contudo, têm sido feitos alguns esforços para eliminar ou compensar

os efeitos da matriz, como procedimentos de extração seletiva seguidos de etapas eficientes de limpeza das amostras (PENG et al., 2008).

O EM que ocorre em matrizes extraídas contendo os analitos alvo, pode causar supressão ou aumento do sinal durante a ionização por *electrospray* (ESI) (LEE; PEART; SVOBODA, 2007; LEE; SARAFIN; PEART, 2007; XIAO et al., 2008), e pode resultar em baixa precisão analítica e reprodutibilidade utilizando LC-ESI-MS/MS (VAN DE STEENE; MORTIER; LAMBERT, 2006; ZHAO; METCALFE, 2008). Portanto, é importante eliminar este problema para obter resultados analíticos confiáveis (WU et al., 2010).

O EM em águas superficiais pode ocorrer devido a alguns interferentes, como os ácidos húmicos e fúlvicos, e também, em água tratada, na qual os sais contidos ou mesmo os produtos utilizados para purificar a água podem ser interferentes na análise (CARDOSO, 2011). Além dos interferentes da matriz, o processo de extração pode trazer para o extrato interferente, como resíduos de polímeros e ftalatos liberados dos tubos de plástico utilizados na extração em fase sólida (SPE) ou em colunas do cromatógrafo líquido. Os reagentes adicionados à fase móvel para melhorar a formato do pico cromatográfico e auxiliar no processo de ionização dos compostos, como sais, tampões e ácidos orgânicos também podem ser responsáveis pelo EM (CARDOSO, 2011).

O método mais utilizado para avaliar o efeito de matriz é o da fortificação pós-extração (MATUSZEWSKI et al., 2010), o qual avalia quantitativamente o EM através da comparação da resposta do analito adicionado ao extrato branco da matriz e a resposta do padrão preparado em um determinado solvente ou na fase móvel (VARGAS et al., 2011). Valores em 100% indicam a ausência de qualquer EM, enquanto valores <100% significam supressão e valores >100% indicam melhoria do processo de ionização (LAMBERT, 2004).

Considerando o forte e variável EM e a falta de padrões de controle apropriados para a análise de hormônios (PENG et al., 2008), uma amostra fortificada foi preparada para cada amostra de água coletada (7 pontos), adicionando uma quantidade conhecida de padrão mix contendo todos os compostos investigados em outra alíquota da amostra filtrada, neste caso foram utilizadas as seguintes concentrações 7, 10, 40, 60 e 80 ng.L⁻¹. A Tabela 10 apresenta os valores do efeito de matriz para cada hormônio em cada ponto de coleta. Nas amostras coletadas nos 7 pontos, os 6 hormônios validados

apresentaram efeito de matriz, com valores pouco abaixo de 100%, sinalizando uma supressão do sinal analítico (Tabela 10), assim como Conley et al. (2008) que, numa investigação sobre EM, determinaram 13 fármacos em água superficial por LC-ESI-MS/MS e observaram que todos os analitos apresentaram EM.

Tabela 10 - Valores obtidos das amostras com efeito de matriz de cada hormônio em cada ponto de coleta

Hormônio	Pontos de coleta (P) e porcentagem do EM						
	P1 (%EM)	P2 (%EM)	P3 (%EM)	P4 (%EM)	P5 (%EM)	P6 (%EM)	P7 (%EM)
E1	76	84	84	79	89	92	90
E2	86	80	80	78	91	90	95
EE2	82	81	66	80	94	90	93
E3	77	81	85	79	95	91	91
PROG	75	83	82	79	90	95	90
TEST	71	80	81	78	93	92	97

2.6. Conclusões

Os resultados mostraram e confirmam o pressuposto de que os hormônios estão presentes em águas superficiais. Nos locais estudados, os hormônios encontrados em concentrações elevadas foram os estrógenos E1, E2, EE2 e E3, os quais são compostos considerados causadores de potenciais riscos ambientais. Por isso a importância de uma revisão da legislação revela que não há regulamentação para as contaminações por hormônios em água superficial e tratada.

Referências

ALDA, M.J.; BARCELÓ, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 938, p. 145–153, 2001.

AL AUKIDY, M. et al. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 438, p. 15–25, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20. ed. New York: APHA, 2005.

AMÉRICO, J. H. P. et al. Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-oeste do Brasil e os riscos aos recursos hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 61-67, 2012.

ARDITSOGLOU, A.; VOUTSA, D. Partitioning of endocrine disrupting compounds in inland waters and wastewaters discharged into the coastal area of Thessaloniki, Northern Greece. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 17, p. 529-538, 2010.

BARCELÓ, D. Pharmaceutical-residue analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 6, 454-455, 2007.

BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 43, n. 3, p. 597–603, 2009.

CARDOSO, L. V. **Otimização e validação de método empregando SPE e LC-APCI-MS/MS para determinação de fármacos em água de superfície e de abastecimento público**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CÉSPEDES, R. et al. Distribution of Endocrine Disruptors in the Llobregat River Basin (Catalonia, Ne Spain). **Chemosphere**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 1710-1719, 2005.

CHRISTIAN, T. et al. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Berlin, v.31, n.1, p.36-44, 2003.

CONLEY, J. M et al. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1185, p. 206–215, 2008.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

DINIZ, M. S. et al. Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 22, n. 10, p. 1613-1622, 2010.

DOMAŃSKA, U. et al. Solubility and pKa of select pharmaceuticals in water, ethanol, and 1-octanol. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, New York, v. 42, p. 1465–1472, 2010.

EPA. **EPA Guidelines**: Regulatory monitoring and testing. Water and wastewater sampling. Washington, DC, 2007. 35 p.

FARRÉ, M. et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 11, p. 991-1007, 2008.

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**, Heidelberg, v. 399, n. 1, p. 251–75, 2011.

GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: KEITH, C. H. (Ed.). **Identification and analysis of organic pollutants in water**. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, 1976.

GINEBREDÀ, A. et al. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in river: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environment International**, New York, v. 36, p. 153-162, 2010.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 26, n. 8, p. 1553-1562, 2007.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 81, p. 898–912, 2009.

GROS, M. et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**, New York, v. 36, p. 15-26, 2010.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, New York, v. 46, p. 5813-5833, 2012.

HAN, J. et al. Removal of ethinylestradiol (EE2) from water via adsorption on aliphatic polyamides. **Water Research**, New York, v. 46, p. 5715-5724, 2012.

HERNANDO, M. D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, London, v. 69, p. 334–342, 2006.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenxoyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 20, p. 337-342, 1977.

HOHENBLUM, P. et al. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 333, n. 1-3, p. 185–193, 2004.

JIANG, W.; YAN, Y.; MA, M.; WANG, D.; LUO, Q.; WANG, Z., SATYANARAYANAN, S. K. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. **Journal of Environmental Sciences**. Beijing, v.24, n.2, p.320-328, 2012.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 256, p. 163-173, 2000.

JONGH, C. M. et al. Screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 70, p. 427-428, 2012.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, New York, v. 41, n. 5, p. 1013–1021, 2007.

KÖCK-SCHULMEYER, M. et al. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat River (NE Spain). **Chemosphere**, Oxford, v. 82, n. 5, p. 670-678, 2011.

KUSTER, M. et al. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, n.8, p. 880-886, 2010.

KUMAR, K. A.; MOHAN, S. V.; SARMAH, P. N. Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: Kinetic and mechanistic evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, p. 820-828, 2009.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, p. 5–7, 2003.

LAMBERT, W. Pitfalls in LC-MS(-MS) analysis. **Toxichem + Krimtech – GTFCh**, Munich, v. 71, n. 2, p. 64-68, 2004.

LEE, H.-B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1139, n. 1, p. 45-52, 2007.

LEE, H.-B.; SARAFIN, K.; PEART, T. E. Determination of β -blockers and β 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1148, p. 158–167, 2007.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 83, p. 410-424, 2010.

LU, G.H. et al. Assessment of *in vivo* estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section). **Chemosphere**, Oxford, v. 80, n. 9, p. 982–990, 2010.

MANSOR, M. T. C.; FILHO, J. T.; ROSTON, D. M. Avaliação preliminar das cargas difusas de origem rural, em uma sub-bacia do Rio Jaguari, SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 715–723, 2006.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

US DEPARTMENT OF LABOR. Occupational Safety & Health Administration - OSHA. **Estriol**. Washington, DC, 2007. Disponível em: http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_238923.html. Acesso em: 10 nov. 2013.

PENG X. et al. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, p. 73–79, 2008.

PEREIRA, V. J. et al. Integration of nanofiltration, UV photolysis, and advanced oxidation processes for the removal of hormones from surface water sources. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 95, p. 89-96, 2012.

PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY, L. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3-4, p. 1590-1596, 2013.

RIBEIRO, C. et al. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 149, n. 1-4, p. 183–193, 2009.

SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTOS - SAAE. **Bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**. Indaiatuba, 2004. 24 p. Disponível em: http://www.saae.sp.gov.br/arquivos/as_bacias_hidrograficas_dos_rios_piracicaba.pdf
Acesso em: 03 fev. 2014.

SIRÉS, I.; BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. **Environment International**, New York, v. 40, p. 212-229, 2012.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 96, p. 92-98, 2010.

SPONGBERG, A. L. et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. **Water Research**, New York, v. 45, n. 20, p. 6709–6717, 2011.

TABAK, H. H.; BUNCH, R. L. Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settler sewage. **Developments in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 367–376, 1970.

TORRES, N. H. et al. Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17alpha-ethinylestradiol and 17beta-estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. **IOSRJEN Journal of Engineering**, New Delhi, v. 2, p. 984-989, 2012.

VALCÁRCEL, Y. et al. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river - and drinking - water of the Madrid Region in Spain. **Chemosphere**, Oxford, v. 2, p. 1062–1071, 2011.

VAN DE STEENE, J. C.; MORTIER, K. A.; LAMBERT, W. E. Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1123, p. 71-81, 2006.

VARGAS, R. et al. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 83, p. 1447–1454, 2011.

VERLICCHI, P. et al. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 389, p. 416-428, 2010.

ZHAO, X. M.; METCALFE, C. D. Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography - Tandem mass spectrometry: Analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 80, p. 2010-2017, 2008.

WANG, S. et al. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, p.194–201, 2008.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, New York, v. 45, p. 1818-1828, 2011.

WU, J.; QIAN, X.; YANG, Z.; ZHANG, L. Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 1471-1475, 2010.

XIAO, Y. et al. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1214, p. 100-108, 2008.

3. Análise de antimicrobianos em água superficial e de abastecimento urbano

Resumo: Antimicrobianos são produtos farmacêuticos considerados micropoluentes, justamente por serem encontrados em águas residuárias em baixas concentrações (ng.L^{-1}), o que é o caso da enrofloxacin, eritromicina, norfloxacin, e ciprofloxacin. Estes compostos são encontrados em efluentes, pois são utilizados para tratar doenças respiratórias, infecções do trato urinário, doenças sexualmente transmissíveis e infecções da pele. São considerados de alto risco tanto à flora quanto à fauna. Os objetivos deste trabalho foram determinar a possível concentração dos antimicrobianos enrofloxacin, eritromicina, norfloxacin, e ciprofloxacin, em água, após a validação de metodologia para analisar e monitorar os referidos antimicrobianos em água superficial e de abastecimento urbano. Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS/MS). Os resultados obtidos foram: os limites de detecção (LOD) variaram de 0,1 a 0,8 ng.L^{-1} ; a linearidade foi obtida no intervalo de 10-200 ng.L^{-1} para o eritromicina, e 40-200 ng.L^{-1} para o ciprofloxacin, enrofloxacin e norfloxacin; os coeficientes de regressão (r^2) foram maiores que 0,9 e as recuperações foram entre 82-118% das amostras fortificadas com 50 e 100 ng.L^{-1} . Esta metodologia validada foi utilizada com sucesso para determinar os níveis de antimicrobianos em amostras de água coletadas ao longo do Rio Piracicaba, e água tratada coletada na cidade de Piracicaba. O antimicrobiano encontrado foi o norfloxacin nas concentrações que variaram de 8 a 18 ng.L^{-1} nas amostras coletadas no período de estiagem, já os antimicrobianos ciprofloxacin, eritromicina e enrofloxacin, não foram detectados em nenhuma das amostras coletadas.

Palavras-chave: Água Superficial. Antimicrobiano. Espectrômetro de Massas. Contaminação Ambiental. Ambiente Aquático.

Abstract: Antimicrobial pharmaceuticals are considered micropollutants, precisely because they are found in wastewater at low concentrations (ng.L^{-1}), which is the case of enrofloxacin, erythromycin, norfloxacin, and ciprofloxacin. These compounds are found in effluents because they are used to treat respiratory diseases, urinary tract infections, sexually transmitted diseases and infections on skin. Are considered high risk to both flora and fauna. The objectives of this work were to determine the possible concentration of antimicrobial enrofloxacin, erythromycin, norfloxacin, and ciprofloxacin, in water, after validation methodology to analyze and monitor these antimicrobials in surface and urban water supply. For this purpose, a liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer with electrospray ionization source (LC-ESI-MS/MS) was used. The results were: Limits Observed of Detection (LOD) ranged 0.1 to 0.8 ng.L^{-1} ; linearity was obtained within the range of 10-200 ng.L^{-1} to erythromycin, and 40-200 ng.L^{-1} for ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin, regression coefficients (r^2) were greater than 0.9 and recoveries were between 82-118% of samples spiked with 50 and 100 ng.L^{-1} . This validated method was successfully used to determine the levels of antibiotics in water samples collected along Piracicaba River, and urban water supply collected in Piracicaba. Antimicrobial agent norfloxacin was found in concentrations in the range of 8 to 18 ng.L^{-1} in samples collected in the dry season, since the antimicrobial ciprofloxacin, erythromycin and enrofloxacin were not detected in any of the samples collected.

Keywords: Surface Water. Liquid Chromatography. Hormones. Mass Spectrometer. Environmental Contamination. Aquatic Environment.

3.1. Introdução

Nos últimos anos, a ocorrência e o destino de compostos farmacêuticos ativos no ambiente aquático foram reconhecidos como algumas das questões mais pertinentes em química ambiental (HALLING-SØRENSEN et al., 1998). A ocorrência de antimicrobianos em efluentes e águas residuais de hospitais ou de superfície pode apresentar dois tipos de riscos. Em primeiro lugar, depois do fornecimento, antimicrobianos selecionam as bactérias resistentes nos indivíduos tratados. Em segundo lugar, a presença de antimicrobianos em corpos hídricos que fornecem água, incentiva o crescimento de bactérias resistentes em seres humanos e em animais (HILLEMANN, 2001). A crescente resistência significa que os antimicrobianos que foram uma vez efetivos e baratos, tornaram-se inadequados para o tratamento de infecções (BRASCHI et al., 2010).

Outro fator que tem aumentado a preocupação sobre a poluição por fármacos é que algumas classes destes compostos são, também, considerados poluentes "pseudopersistentes" devido à sua contínua inserção no ambiente (HEBERER et al., 2002; HERRERA-HERRERA et al., 2013), e mesmo em concentrações baixas, têm a capacidade de afetar a biota exposta (GLASSMEYER et al., 2008), mesmo que alguns estudos tenham relatado que estes compostos podem ser susceptíveis à degradação microbiana (RAMASWAMY et al., 2010; HUSSAIN et al., 2011).

Dentre os compostos que afetam a biota, estão os antimicrobianos do grupo das quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, e enrofloxacina) são utilizados no tratamento de infecções no trato urinário, e têm, geralmente, um amplo espectro de atividade antibacteriana, abrangendo bactérias aeróbias gram-negativas e gram-positivas (enterococos, estreptococos, e estafilococos) (BERTINO; FISH, 2000; SILVA; HOLLENBACH, 2010). Já o antimicrobiano eritromicina é pertencente ao grupo dos macrolídeos e a facilidade posológica e a melhor tolerabilidade deste antimicrobiano, impulsionaram o consumo crescente destas drogas em diversos países (GILIO; LO, 2003).

Como consequência deste consumo crescente, a prevalência do *Streptococcus pneumoniae* resistente aos macrolídeos tem aumentado dramaticamente em diferentes países, nos últimos 10 anos. Esta progressiva resistência do *Streptococcus pneumoniae*, assim como do *Streptococcus pyogenes*, foi relacionada ao aumento de consumo de macrolídeos na Finlândia, Espanha e Itália (GILIO; LO, 2003).

Com o consumo de uma ampla variedade de antimicrobianos, e a presença simultânea destes compostos no ambiente, há a possibilidade de efeito sinérgico no organismo exposto (HANSEN et al., 2009). Uma pesquisa realizada nos EUA informou a detecção de antimicrobianos na água de abastecimento de 24 grandes metrópoles, e que afetam mais de 13% da população do país que utilizam desta água para abastecimento (DONN; MENDOZA; PRITCHARD et al., 2008).

Embora muitas publicações descrevam a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em águas residuais e outras explorem a ocorrência de resistência a antimicrobianos em águas residuárias, há ainda muitos locais nos quais os estudos sobre presença de antimicrobianos ainda são inexistentes (NOVO et al., 2013).

Por isto, em 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS), grupo de trabalho formado por especialistas em toxicologia, química aquática, qualidade da água e de saúde, tratamento de água, farmacologia e políticas e legislações sobre água potável, elaboraram um relatório no qual se afirma que há a necessidade de mais estudos sistemáticos para contribuir a uma melhor compreensão do transporte, ocorrência e destino dos produtos farmacêuticos no ambiente, especialmente em fontes de água potável, bem como a normalização de protocolos de amostragem e análise de produtos farmacêuticos para instalação a comparação de dados estão entre as principais conclusões (BOLEDA; GALCERAN; VENTURA, 2013).

Tendo em vista este cenário, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método analítico para detecção e quantificação de eritromicina (ERI), norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR), e ciprofloxacin (CIP), através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS/MS). O método analítico validado foi aplicado às amostras de água superficial coletadas em seis pontos ao longo do Rio Piracicaba, e água de abastecimento coletada em residência na cidade de Piracicaba, a fim de obter informações sobre os níveis de concentração dessas substâncias em amostras de água.

3.2. Revisão da Literatura

3.2.1. Antimicrobianos no ambiente

O efluente sanitário tratado funciona como um importante reservatório para as bactérias resistentes aos antimicrobianos residuais presentes no ambiente aquático (KÜMMERER, 2003). Em estações de tratamento de efluentes (ETE) bactérias resistentes a antimicrobianos, bactérias tolerantes provenientes de fontes humanas e animais, produtos químicos antropogênicos, incluindo antimicrobianos, cruzam-se em meio aquoso (ZHANG et al., 2009), interagem sob pressão seletiva enquanto resíduos químicos são descartados, e o efluente proveniente das ETE é então liberado nas águas receptoras (MIDDLETON; SALIERNO, 2013).

Com isto, alguns agentes antimicrobianos como os grupos dos macrolídeos, quinolonas, e fluoroquinolonas, podem ser encontrados em concentrações potencialmente ativas em lodos ativados advindos de esgotos sanitários, e a carga de antimicrobianos ao longo do ano correlaciona-se com a variação no consumo anual, sendo mais elevada no inverno (BAQUERO; MARTINÉZ; CANTÓN, 2008).

Os macrolídeos e quinolonas representam duas das famílias mais importantes de antimicrobianos, pois são utilizados em todo o mundo para tratar doenças humanas, e em animais, como promotores de crescimento e para melhorar a eficiência alimentar (GARCIA-GALAN; DIAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2008; DORETTO; RATH, 2013). Como consequência, estes compostos são liberados no meio aquático através, principalmente, de plantas de tratamento de águas residuárias (BOLEDA; GALCERAN; VENTURA, 2013), as quais são consideradas as principais fontes de descarga de resíduos farmacêuticos em corpos hídricos.

Além disso, estes antimicrobianos são compostos polares altamente solúveis em água e podem ser facilmente transferidos a outros corpos hídricos. Por estas razões, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos viáveis, capazes de determinar resíduos de antimicrobianos a baixas concentrações nos sistemas aquáticos (HERRERA-HERRERA et al., 2013).

Isto ocorre, porque, em todo o mundo, o tratamento das águas residuais, independentemente de a sua eficácia ou condições de funcionamento, conduz à produção dos efluentes finais contendo as bactérias resistentes aos antimicrobianos,

por vezes em percentagens mais elevadas que no efluente bruto (WATKINSON et al., 2007; GALVIN et al., 2010; LUCZKIEWICZ et al., 2010; NOVO; MANAIA, 2010; NOVO et al., 2013).

Então, as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) podem ser consideradas os pontos críticos importantes para o espalhamento de bactérias resistentes a antimicrobianos (BAQUERO; MARTINEZ; CANTON, 2008; MARTINEZ, 2009; MANAIA; VAZ-MOREIRA; NUNES, 2012). Três argumentos principais são muitas vezes utilizados para sustentar esta ideia. A primeira é que a antimicrobianos residuais e outras substâncias com potencial pressão seletiva, bactérias resistentes aos antimicrobianos e genes de resistência são fortemente descarregados no sistema de esgoto municipal (KIM; AGA, 2007; SEGURA et al., 2009; NOVO; MANAIA, 2010; LUCZKIEWICZ et al., 2010; KÜMMERER, 2009; SZCZEPANOWSKI et al., 2009). O segundo é que as condições oferecidas aos microorganismos durante o processo de tratamento de águas residuais podem ou favorecer a seleção ou a transferência genética horizontal de genes determinantes de resistência a antimicrobianos (SZCZEPANOWSKI et al., 2009; ZHANG et al., 2011).

Os fatores que explicam essas evidências estão no foco central das preocupações de microbiologistas e engenheiros de águas residuárias interessados em controlar o aumento da resistência aos antimicrobianos e disseminação no ambiente natural (NOVO et al., 2013). Por isto, métodos analíticos multiresiduais são altamente funcionais, pois há vantagens inerentes na análise de compostos da mesma família (HERRERA-HERRERA et al., 2013).

3.2.2. Quinolonas e fluoroquinolonas

Quinolonas (Q) são antimicrobianos sintéticos e não extraídos de organismos (BOLON, 2011). Um exemplo de quinolona (Figura 12) é o ciprofloxacina. Os compostos 6-fluoro-7-piperazino-4-quinolona (fluoroquinolona) são um grupo de antimicrobianos eficazes capazes de combater uma variedade de organismos gram-negativos e gram-positivos “*in vitro*” (BOWSER; BABISH, 1991).

Seu uso cresceu quando um átomo de flúor foi adicionado à estrutura química básica dos compostos, originando as fluoroquinolonas (PICÓ; ANDREU, 2007). Essa modificação estrutural permitiu que os compostos dessa classe apresentassem amplo espectro de ação quando comparado com as quinolonas existentes anteriormente (LOCATELLI, 2011).

As fluoroquinolonas (FQ) (Figura 13) são utilizadas predominantemente no tratamento de doenças respiratórias, infecções do trato urinário, Unidades de Terapias Intensivas (UTI), doenças sexualmente transmissíveis e infecções da pele. Desde a sua introdução nos anos 1980, mais de 100 milhões de pacientes em todo o mundo foram tratadas com FQ (BERTINO; FISH, 2000).

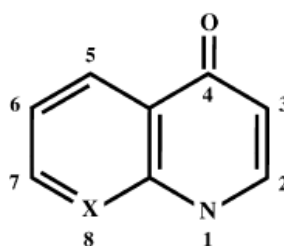


Figura11 - Fórmula estrutural do núcleo dos quinolonas

Fonte: Adaptado de Bolon (2011).

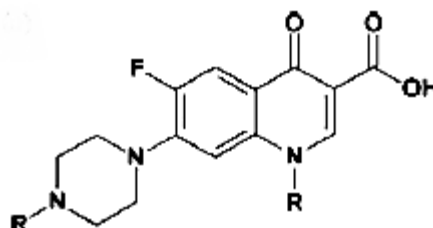


Figura12 - Fórmula estrutural do núcleo dos fluoroquinolonas

Fonte: Adaptado de Seifrtová et al. (2009).

Como classe, as FQ são, geralmente, seguras. A incidência de efeitos adversos varia significativamente a estrutura de agentes específicos. Os efeitos adversos associados às FQ, geralmente incluem distúrbios gastrointestinais, distúrbios do sistema nervoso central (SNC), reações e efeitos dermatológicos, e são reversíveis com a interrupção do tratamento (BERTINO; FISH, 2000).

3.2.3. Análises de antimicrobianos em amostras ambientais

Diversos métodos analíticos multiresíduos foram propostos para analisar produtos farmacêuticos em amostras de água (LÓPEZ-SERNA et al., 2010), incluindo o Método EPA 1694 (FERRER; ZWEIGENBAUM; THURMAN, 2010). Os protocolos são baseados principalmente em extração em fase sólida (em inglês, “Solid Phase Extraction”, *SPE*) “*on-line/off-line*” seguido por análise dos extratos por espectrometria de massas usando MRM (SEIFRTOVÁ et al., 2009) e/ou duas transições para identificar os compostos, assim como é recomendado pela União Europeia (EU), em 2002, ou somente uma transição, como descrito no Método 1694 da EPA (EPA, 2007; BOLEDA; GALCERAN; VENTURA, 2013).

O uso de LC-MS/MS na determinação de vários compostos em uma única análise cromatográfica permite a determinação de compostos que coeluem, já que o uso da espectrometria de massas *in tandem* possibilita quantificar individualmente compostos com o mesmo tempo de retenção quando empregado modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (LOCATELLI, 2011).

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Caracterização da área de estudo: a Sub-bacia do Rio Piracicaba

A Sub-bacia do Rio Piracicaba abrange 16 municípios, sendo que três deles pertencem à Sub-bacia do Corumbataí, ainda preservada e atualmente responsável por 100% dos abastecimentos para o município de Piracicaba (SP) (SAAE, 2004). Os pontos de coleta foram selecionados devido à alta densidade populacional no entorno do Rio Piracicaba (cidades como Americana, Santa Bárbara D'Oeste, Piracicaba, Águas de São Pedro e Santa Maria da Serra), em torno de 4 milhões (IBGE, 2013), que lançam grande volume de efluentes sanitários neste corpo hídrico.

Características como a topografia, podem colaborar com o aporte de contaminantes no corpo hídrico, por isso a Figura 2 ilustra o mapa topográfico da Sub-bacia do Rio Piracicaba, e as cores mais claras representam menores altitudes e as cores mais escuras representam maiores altitudes. Quanto à altitude, existem 3 regiões nesta bacia, a região 1 é caracterizada por altitudes mais elevadas, a região 2, corresponde à depressão periférica, que é uma região de altitudes mais baixas, e

na região 3 o relevo volta a ficar mais acidentado na região das cuestas basálticas. O relevo nos pontos onde as amostras foram coletadas é de baixa altitude, facilitando o aporte de poluentes no Rio Piracicaba.

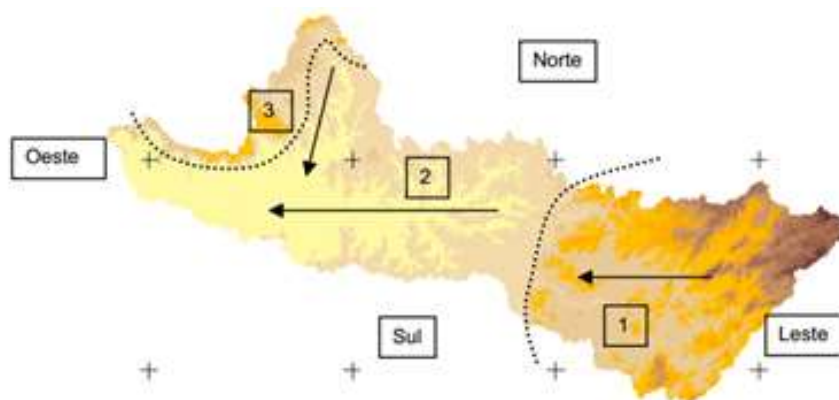


Figura 3 - Mapa topográfico da Sub-bacia do Rio Piracicaba
Fonte: Adaptado de PiraCena (1996).

A Figura 3 representa a rede de drenagem da Sub-bacia do Rio Piracicaba, na qual se pode observar que na região onde foram coletadas as amostras a rede de drenagem é na porção menos densa (região 2), facilitando também o aporte de poluentes presentes na água superficial, já que o fator de diluição do rio é diretamente proporcional à sua vazão.

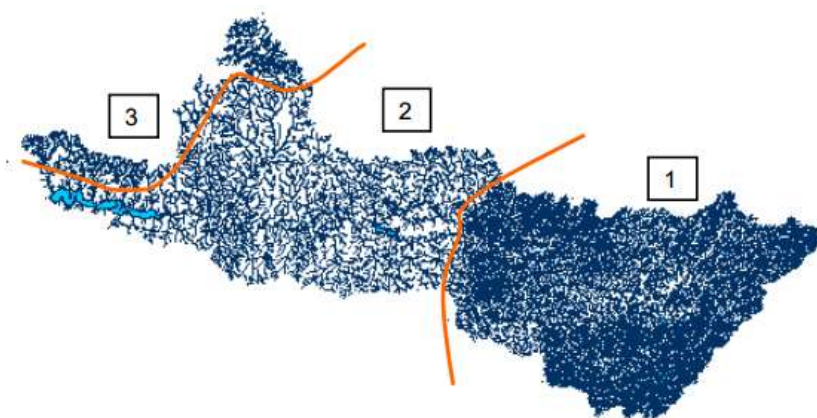


Figura 4 - Rede de drenagem da Sub-bacia do Rio Piracicaba
Fonte: Adaptado de PiraCena (1996).

De acordo com o CBH-PCJ (2013), os principais usos na formação do Rio Piracicaba, na cidade de Americana, onde os Rios Capivari e Jundiá se juntam, há predominância de uso do solo como área urbana, já à jusante do Rio Piracicaba, a predominância de uso do solo é com o plantio de cana-de-açúcar. A Sub-bacia do Rio Piracicaba tem vazão disponível de 8,16 m³/s, o total das captações é de 6,63 m³/s, e os lançamentos de efluentes é de 5,24 m³/s (CBH-PCJ, 2013), o que significa que a carga de poluentes lançados nesta bacia é alta, o que ocasiona a detecção de diversos compostos em amostras ambientais.

3.3.2. Reagentes e padrões

Todos os padrões de antimicrobianos utilizados tinham alto grau de pureza (>90%). A ENR, CIP e NOR foram adquiridas da Fluka Analytical, e a ERI foi obtida da Dr. Ehrenstorfer. As soluções estoque foram preparadas, inicialmente, na concentração de 1000 mg.L⁻¹, dissolvendo 10 mg do padrão sólido em 10 mL de acetonitrila.

3.3.3. Coletas das amostras de água e dados pluviométricos

As amostras de água superficial foram coletadas em 6 pontos ao longo do Rio Piracicaba e as amostras de água tratada foram coletadas em residência na cidade de Piracicaba. A metodologia de coleta e preservação das amostras de água foi baseada no “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (2005). Frascos de vidro âmbar descontaminados (molho com água e sabão próprio para vidraria, água corrente e destilada, e por último com solução de dimetildiclorosilano e tolueno), foram utilizados para a coleta das amostras. As amostras de água, logo após a coleta, foram filtradas com filtro de fibra de vidro de 0,47 µm (Mackerey-Nagel).

Os antimicrobianos foram extraídos das amostras de água utilizando cartucho (500 mg, 6 mL; Waters Milford, EUA) acoplado a uma câmara de vácuo (Visiprep DLTM, Supelco), assim como em outros trabalhos (TONG et al., 2009; ZHANG et al., 2013). Os cartuchos foram condicionados com 4 mL de acetonitrila e 4 mL água ultrapura, com fluxo de 2 mL.min⁻¹. Depois disto, 200 mL de amostra de água foram

inseridos no cartucho com fluxo de $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Após a pré-concentração das amostras, os cartuchos foram lavados com 4 mL de água ultrapura, e foram secos com gás nitrogênio durante 20 min. Finalmente, os analitos foram eluídos com 8 mL de acetonitrila, a $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O extrato foi evaporado até a total secura com fluxo de gás nitrogênio e reconstituído com 4 mL de solução acetonitrila:água (50:50, v/v).

O pH não foi ajustado pois o adsorvente polimérico Oasis HLB, se comparado com outros cartuchos, é muito mais eficiente, produzindo recuperações elevadas para todos os compostos-alvo. Este adsorvente pode extrair analitos ácidos, neutros e básicos a uma ampla gama de valores de pH, inclusive pH neutro. Por esta razão, este adsorvente pode ser utilizado para a extração de analitos quando não é feito ajuste de pH da amostra (SEIFRTOVÁ et al., 2009).

Os dados da precipitação média mensal dos anos de 2011 a 2012 foram obtidos no Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE, 2013). Os resultados dos parâmetros físico-químicos foram expressos em média e desvio padrão.

3.3.4. Condições das análises realizadas no cromatógrafo líquido

O cromatógrafo líquido estava equipado com um sistema de duas bombas binárias, uma coluna Zorbax Eclipse Plus (3,0 x 100 mm, tamanho de partícula de 3,5 μm ; Agilent Technologies). As condições otimizadas de separação foram: solvente (A) água ultrapura acidificada a 0,1% com ácido fórmico e com 5 mM de formiato de amônio, solvente (B) acetonitrila acidificada a 0,1% com ácido fórmico ao fluxo de 0,4 mL/min. O gradiente de eluição foi isocrático, com 72:28 (A:B). O volume injetado de amostra foi 10 μL e o tempo de corrida foi de 6 min.

3.3.5. Condições das análises no espectrômetro de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas utilizando um Espectrômetro Triplo Quadrupolo 6430 LC/MS. A fonte de ESI (*electrospray ionization*) foi operada no modo positivo de ionização e seus parâmetros foram: vazão do gás de secagem foi de $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura de secagem de gás de 300°C ; pressão do gás de nebulização a 40 psi e a voltagem do capilar a -4000V. Nitrogênio foi utilizado como gás de secagem. O triplo quadrupolo foi utilizado no

modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para identificar e quantificar os compostos-alvo. Todos os dados foram obtidos e processados utilizando o *software* “Agilent Mass Hunter”. Para alcançar estas condições de otimização, foram injetadas as soluções-padrão estoques individuais de cada composto na concentração de 20 mg.L⁻¹.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Otimização da metodologia de separação em cromatógrafo líquido e as condições do espectrômetro de massas para a quantificação e identificação dos antimicrobianos

De forma a otimizar a separação cromatográfica, diferentes fases móveis e aditivos foram testados. Para a fase aquosa, fases móveis tamponadas com formiato de ácido fórmico na concentração de 5 mM e água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (para aumentar a sensibilidade e a resolução dos picos cromatográficos) foram avaliados, enquanto metanol e acetonitrila foram testados como solventes orgânicos. Somente estas fases móveis foram testadas porque elas são utilizadas, principalmente, na análise de sulfonamidas e fluoroquinolonas (EICHHORN; AGA, 2004; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2006).

O uso de fases móveis aquosas ácidas é muito comum para a análise dos antimicrobianos, melhorando a sua eficiência de ionização. Foram testadas as combinações de fases móveis aquosa e orgânica, no modo isocrático com 28% de solvente orgânico e 72% de água ultrapura, 6 min de corrida cromatográfica, e fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. Esta combinação foi testada utilizando duas colunas diferentes de HPLC: (i) uma coluna Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm tamanho das partículas e (ii) uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 3,0 mm ID, 3,5 µm de tamanho de partícula). Estas colunas foram testadas porque colunas com fases estacionárias C18 são as mais comuns na análise cromatográfica de antimicrobianos e são boas opções para o desenvolvimento de separações de compostos altamente polares, como os fármacos (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). A combinação da ligação C18 e a retenção de compostos polares, melhora o desempenho da coluna, tempo de vida, a forma do pico e a

estabilidade. Foi utilizada uma coluna com 100 mm de comprimento (100mm x 3,0mm), pois o principal objetivo era atingir uma rápida separação, mantendo uma boa resolução.

Entre as combinações mencionadas, a utilização de uma coluna Zorbax Eclipse Plus, com acetonitrila como fase orgânica e água ultrapura, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, foram as condições que asseguraram melhor resolução, formas de pico e respostas, e a separação cromatográfica foi realizada a um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹, para aumentar a velocidade de separação, e a temperatura da coluna foi mantida em 35°C. Para a quantificação, duas transições foram monitoradas para cada antimicrobiano e um as condições otimizadas estão descritas na Tabela 14.

Tabela 13 - Antimicrobianos alvo, respectivos tempos de retenção (t_r), transições das reações (m/z), e energias de colisão e de fragmentação (ambas em eV) no modo de ionização positiva

Antimicrobiano	Classe	t_r (min)	Transições das reações (Íon precursor/íon produto) (m/z)	Energia de colisão (eV)	Energia de fragmentação (eV)
ERI	Macrolídeo	2,24	734,5/558	15	125
			734,5/158	25	125
CIP	Fluoroquinolona	3,30	332,1/314,1	20	165
			332,1/231	40	165
NOR	Fluoroquinolona	3,35	320,1/302,1	16	150
			320,1/231	44	150
ENR	Fluoroquinolona	4,79	360,3/342,2	25	125
			360,3/245,1	120	24

3.4.2. Validação do método

O desempenho do método foi avaliado através da estimativa da linearidade, recuperações da extração, sensibilidade (por meio do cálculo dos limites de detecção e de quantificação instrumentais), repetibilidade, reprodutibilidade e os efeitos da matriz. A quantificação baseou-se nas curvas de calibração de regressão linear, da qual se obteve curvas de calibração com bons ajustes ($r^2 > 0,9$) ao longo

dos pontos de concentração estabelecidos entre 10 e 200 ng.L⁻¹ (ERI), e 40 a 200 ng.L⁻¹ (CIP, ENR, e NOR) (Tabela 14). Os padrões de calibração foram medidos no início de cada sequência a cada 20 a 25 amostras, para verificar a estabilidade do sinal.

Tabela 14 – Valores de regressão linear e coeficiente de correlação (r^2) para o método cromatográfico aplicado aos antimicrobianos

Antimicrobiano	Curva de calibração (ng.L ⁻¹)	Coeficiente de correlação (r^2)
ERI	10; 40; 60; 80;100 e 200	0,95
CIP	40; 60; 80;100 e 200	0,95
ENR	40; 60; 80;100 e 200	0,94
NOR	40; 60; 80;100 e 200	0,94

Limites Observados de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analíticos padrões de calibração (RIBANI et al., 2004). Os LOD variaram de 0,10 a 0,80 ng.L⁻¹, e os LOQ variaram de 10 a 40 ng.L⁻¹ (Tabela 15). Estes valores indicam a alta sensibilidade do espectrômetro de massa utilizado e as suas capacidades para detectar antimicrobianos a baixas concentrações encontradas em amostras ambientais complexas, como água superficial (SODRÉ et al., 2010).

Tabela 15 – Limites observados de detecção e quantificação para cada antimicrobiano alvo

Antimicrobiano LOD = $3,3 * s/S^a$ LOQ = $10 * s/S^a$		
ERI	0,10	10
CIP	0,40	40
ENR	0,40	40
NOR	0,80	8

^a Onde, s= é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica; S= inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O LOD mais elevado foi alcançado para o NOR, que foi de $0,8 \text{ ng.L}^{-1}$, já para o CIP ($0,4 \text{ ng.L}^{-1}$), ENR ($0,4 \text{ ng.L}^{-1}$) e ERI ($0,10 \text{ ng.L}^{-1}$) foram menores. Para as amostras de água superficial e tratada, os LOQ variaram de 8 a 40 ng.L^{-1} (Tabela 15), assim como os valores encontrados por Gros et al. (2013), em amostras de água superficiais, que variaram entre 1 e 50 ng.L^{-1} . Com este método, valores baixos de LOD e LOQ foram obtidos para todos os antimicrobianos, mesmo utilizando um baixo volume de amostra para a pré-concentração (200 mL).

Na verdade, os LOD e LOQ calculados neste estudo são comparáveis àqueles obtidos por outros métodos analíticos que utilizaram menor volume para a SPE (CHA; YANG; CARLSON, 2005). Nos resultados obtidos por Herrera-Herrera et al. (2013), os LOD para ENR e CIP foram de 5,61 e $2,58 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, e os obtidos neste trabalho para os mesmos antimicrobianos foram muito menores, de 0,40, e também muito próximos daqueles obtidos usando um sistema instrumental SPE *on-line* reportado por Dinh et al. (2011).

Além disso, vale mencionar que, embora alguns dos antimicrobianos alvo, como o ENR, mesmo sendo mais frequentemente utilizado em medicina veterinária (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007), foi também incluído na validação do método de análise de água superficial e tratada.

As recuperações foram determinadas através de fortificações de amostras de água superficial e tratada, em triplicata, nas quais foram adicionados os padrões de ERI, CIP, ENR e NOR, em acetonitrila, nas concentrações de 50 e 100 ng.L^{-1} . Estas concentrações foram selecionadas como valores representativos, pois o ciprofloxacina, por exemplo, pode ser encontrado em altas concentrações (baixa ng.L^{-1} ; alta $\mu\text{g.L}^{-1}$) em efluentes (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013).

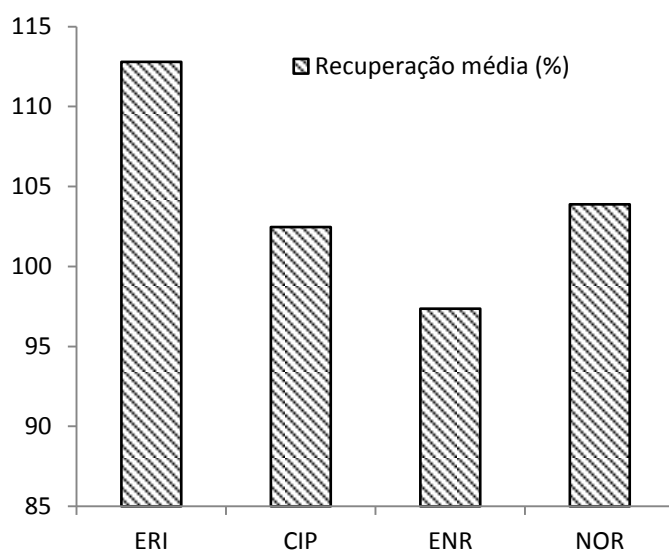


Figura 5 – Valores de recuperação média (%) para cada antimicrobiano

Para obter as recuperações dos analitos, os extratos foram eluídos, evaporados e reconstituídos com acetonitrila e água ultrapura, na proporção de acetonitrila/água (50/50, v/v). As recuperações obtidas para todos os antimicrobianos alvo variaram de 82 a mais de 100% em alguns casos, assim como também foi relatado por Gros et al. (2013). A precisão do método, calculada como o coeficiente de variação (CV) foi satisfatória, variando de 1,77 a 4,88%. Todos os resultados das recuperações, desvio padrão e coeficiente de variação para cada antimicrobiano alvo, são mostrados na Tabela 16 e Figura 5.

Tabela 16 – Valores de recuperação médios (%), desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV) para cada antimicrobiano alvo em cada nível de fortificação testado (em ng.L⁻¹)

Antimicrobiano	Fortificações (ng.L ⁻¹)	Recuperação média (%) e	
		desvio padrão (s)	CV (%)
ERI	50	117,82± 3,0	2,61
	100	107,75± 3,2	2,94
	Média	112,78± 3,1	2,77
CIP	50	89,0± 2,5	2,86
	100	115,93± 3,3	2,82
	Média	102,46± 2,9	2,84
ENR	50	82,0± 6,0	7,31
	100	112,7± 5,5	4,88
	Média	97,35± 5,7	6,09
NOR	50	89,46± 1,9	2,14
	100	118,33± 2,5	2,08
	Média	103,89± 2,2	2,11

Quando amostras ambientais são analisadas, a intensidade de sinal de antimicrobianos pode ser consideravelmente suprimida em matrizes de águas residuárias, pois efeitos de matriz ocorrem com muita frequência em análises por ESI-MS (DORIVAL-GARCÍA et al., 2013).

Contudo, esta é a principal desvantagem do método ESI-MS, pois esta fonte é altamente sensível a outros componentes presentes na matriz a ser analisada, e como resultado, a supressão do sinal leva a resultados errôneos. A diminuição da sensibilidade do método pode ser causada por vários fatores, de acordo com o descrito por Vanderford et al. (2003), Gros, Petrović e Barceló (2006), e Kasprzyk-Horden, Dinsdale e Guwy (2007). Em primeiro lugar, os antimicrobianos podem ser adsorvidos na matéria orgânica presente nas amostras, levando à conclusão de que o método de preparação das amostras não foi eficaz do ponto de vista da concentração de antimicrobianos. Em segundo lugar, os contaminantes na amostra podem interferir nos picos dos analitos, elevando a linha de base do cromatograma.

Por isso, o efeito de matriz (EM) foi avaliado para matrizes de água superficiais para avaliar até que ponto os compostos-alvo foram sensíveis ao sinal de supressão ou adição de interferência. O método mais utilizado para avaliar o EM é o da fortificação pós-extração (MATUSZEWSKI et al., 2010). Os antimicrobianos alvo deste trabalho apresentaram EM, e na Tabela 17 os valores do EM estão mostrados para cada antimicrobiano em cada ponto de coleta. Nas amostras coletadas nos 7 pontos, os 4 antimicrobianos validados apresentaram efeito de matriz, com valores pouco abaixo de 100%, sinalizando uma supressão do sinal analítico (Tabela 17).

Tabela 17 - Valores obtidos das amostras com efeito de matriz de cada hormônio em cada ponto de coleta

Antimicrobiano	Pontos de coleta (P) e porcentagem do EM						
	P1 (%EM)	P2 (%EM)	P3 (%EM)	P4 (%EM)	P5 (%EM)	P6 (%EM)	P7 (%EM)
ERI	78	88	87	83	87	90	90
CIP	88	83	85	82	90	88	94
ENR	80	85	83	81	89	90	91
NOR	90	91	89	90	92	90	95

3.4.3. Análises de antimicrobianos em amostras de água

As fluoroquinolonas apresentaram comportamento diferente dos macrolídeos, pois as primeiras são bastante suscetíveis à fotodegradação em ambientes naturais (KNAPP et al., 2005), além de apresentarem tendência de se adsorverem ao material particulado em suspensão presente nos corpos aquáticos superficiais (CARDOZA et al., 2005). Por isto, concentrações baixas em amostras de água superficiais são esperadas (LOCATELLI, 2011).

Assim como a CIP e a ERI, a ENR não foi detectada em nenhuma das amostras. Devido à ENR possuir um metabólito principal, a CIP, sua atividade antimicrobiana tem sido associada em parte à ação deste metabólito (MENGOZZI et al., 1996). E, como foi evidenciado neste trabalho, estes três compostos não foram detectados nas amostras, pois provavelmente podem não terem sido

consumidos na área de estudo, e também, de acordo com Leal (2012), estas moléculas são mais susceptíveis à adsorção em partículas sólidas, por isso não foram detectadas nas amostras de água.

Já a NOR foi encontrada nas amostras em concentrações que variaram de 8 a 26 ng.L⁻¹, (Tabela 18), e também as concentrações mais altas do composto foram detectadas em amostras coletadas no período estiagem do monitoramento, indicando um alto consumo deste composto para o tratamento de infecções urinárias.

Tabela 18 – Concentração média e desvio padrão (s) da NOR em cada ponto de coleta (em ng.L⁻¹)

Ponto de coleta	Concentração média e desvio padrão de NOR (em ng.L ⁻¹)
P1	11,85 ± 2,8
P2	11,7 ± 2,7
P3	12,11 ± 3,2
P4	11,66 ± 2,6
P5	11,46 ± 1,7
P6	13,28 ± 5,0

Já nas amostras de água tratada, nenhum dos antimicrobianos alvo foi encontrado, o que pode ter ocorrido devido a diversos fatores, como a meia vida destes compostos ser baixa; o tempo de retenção hidráulica da água superficial captada até alcançar o abastecimento; a desinfecção da água no tratamento de águas residuárias; e a fotodegradação influenciam nas concentrações de antimicrobianos, pois o tratamento de águas residuárias pode eliminar cerca de 80% dos fluoroquinolonas antes de as mesmas retornarem aos rios (SUKUL; SPITELLER, 2007; GULKOWSKA et al., 2008).

A eficiência de remoção de antimicrobianos por meio do tratamento de águas residuárias são menos eficazes para macrolídeos, os quais são relativamente persistentes no ambiente (GULKOWSKA et al., 2008), e a sua origem é atribuída à disposição de efluente sanitário tratado nos cursos d'água (LEAL, 2012). O ERI, composto do grupo dos macrolídeos, não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas durante o período de coleta.

Outro fator que propicia a ocorrência de antimicrobianos na região de estudo, é que o principal uso da água do Rio Piracicaba é para abastecimento público (CBH-PCJ, 2014), representando um grande aporte de poluentes neste corpo hídrico, pois de acordo com o SEMAE (2013), a cidade de Piracicaba trata somente 72% do seu esgoto sanitário.

Infelizmente, as ETE atualmente em uso, não são projetadas para a remoção eficaz de algumas famílias de produtos farmacêuticos, como resultado, uma parcela importante pode “sobreviver” aos atuais processos de tratamento, e ser disseminada no ambiente através de efluentes ou permanecer sorvida de lodo de esgoto (DORÍVAL-GARCÍA et al., 2013).

De acordo com o Comitê de Bacias Hidrográficas do Piracicaba, Capivari e Jundiaí (CBH-PCJ), o Rio Piracicaba, ao se formar, está classificado como fora do limite da Classe 4 (Oxigênio Dissolvido – OD – inferior a 2 mg.L^{-1}), logo depois da cidade de Piracicaba o rio é classificado como Classe 4 (OD não inferior a 2 mg.L^{-1}), e na sua porção antes de desaguar na Represa de Santa Maria da Serra, é classificado como Classe 3 (OD não inferior a 4 mg.L^{-1}). Os valores obtidos para OD e pH neste trabalho estão comparadas com os valores do CONAMA nº357 (BRASIL, 2005), e em conjunto com os valores das temperaturas das amostras ($^{\circ}\text{C}$), do ar ($^{\circ}\text{C}$), e condutividade ($\mu\text{S/cm}$), das amostras coletadas de março de 2011 a abril de 2012.

Ao longo do Rio Piracicaba, nos pontos de amostragem P1 ao P5, baixos valores de OD (de acordo com a classificação do CONAMA nº357(BRASIL, 2005) foram encontrados. Estes valores indicam que há aporte de efluentes nesta região, dado em concordância com a classificação obtida pelo CBH-PCJ (2012). Os menores valores verificados foram nos meses de chuvas, e os mais elevados foram nos meses de estiagem. O pH manteve-se dentro do esperado para águas naturais, em média 7,0. A temperatura variou de $19,0^{\circ}\text{C}$ a $25,0^{\circ}\text{C}$. O menor valor de condutividade foi observado para as águas da represa de Santa Maria da Serra, enquanto os maiores valores foram encontrados nos pontos P1 ao P5, indicando maior quantidade de íons dissolvidos nessas águas.

A Figura 6 mostra os valores das precipitações médias nos anos de 2011 e 2012 na Sub-bacia do Rio Piracicaba, os quais foram fornecidos pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica de São Paulo e foi mensurada mensalmente em três

postos de monitoramento localizados no Rio Piracicaba nas cidades de Americana, Santa Bárbara D'Oeste, e Piracicaba. E, de acordo com estes dados, observa-se que a época de estiagem (período de maio a setembro), influencia diretamente nos parâmetros físico-químicos avaliados.

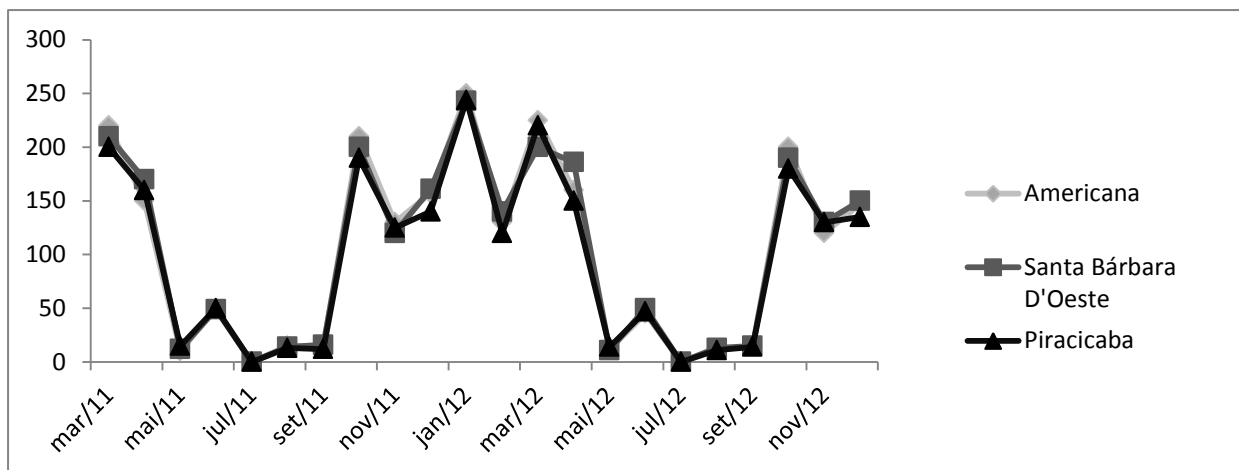


Figura 6 – Valores das precipitações médias nos anos de 2011 e 2012 nas cidades de Americana, Santa Bárbara D'Oeste e Piracicaba, que pertencem à Sub-bacia do Rio Piracicaba
Fonte: Dados fornecidos pelo DAEE (2014).

Os valores dos dados físico-químicos foram comparados à Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), na qual estabelece que os valores para águas doces classe II, o valor do pH deve estar entre 6,0 e 9,0. Portanto, as amostras coletadas nos 7 pontos apresentaram valores de pH na faixa de valores permitidos pela legislação citada.

3.5. Conclusões

Um método multiresíduos SPE-LC-MS/MS para analisar fármacos em amostras de água foi desenvolvido e validado. Valores acima de 82% de recuperação foram obtidos para todos os compostos alvo deste estudo. Um grande problema relacionado à presença de antimicrobianos em ambientes aquáticos é a de que uma parte importante da dispersão e evolução de organismos resistentes a antimicrobianos dependem deste ambiente. Na água, as bactérias de diferentes origens (humana, animal, ambiental) são capazes de se misturar, e como

consequência, há uma troca de genes e vetores genéticos. Ao mesmo tempo, os antimicrobianos são liberados na água, e podem exercer atividades seletivas, bem como danos ecológicos em comunidades aquáticas, resultando na resistência a antimicrobianos. Os métodos de análise devem ser desenvolvidos para serem baratos e confiáveis: (i) deve haver a detecção de antimicrobianos em ambientes aquáticos; (ii) deve haver a remoção de antimicrobianos das águas residuárias; (iii) as políticas de prevenção para evitar a mistura de dejetos humano e animal e bactérias da água e do solo. O método foi aplicado para analisar amostras de água superficiais e tratada coletadas ao longo do Rio Piracicaba (em 6 pontos) e na cidade de Piracicaba (em 1 ponto), em um estudo sazonal completo. Somente o antimicrobiano NOR foi detectado em amostras coletadas em 6 pontos, ao contrário da amostra de água tratada, na qual não foram encontrados nenhum dos antimicrobianos alvo. Observou-se também uma maior concentração do NOR durante o inverno e outono, época de estiagem na Sub-bacia do Rio Piracicaba.

Referências

AGÊNCIA DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PCJ. **Uso da água**. Piracicaba, 2012. Disponível em: <http://www.agenciapcj.org.br/novo/informacoes-das-bacias/disponibilidade-hidrica/30-informacoes-das-bacias/uso-da-agua>. Acesso em: 06 jan. 2014.

ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICO, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, p. 534–556, 2007.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BERTINO JUNIOR, J.; FISH, D. The safety profile of the fluoroquinolones. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 22, n. 7, p. 798-817, 2000.

BOLEDA, M. R.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1286, p. 146-158, 2013.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 95, n. 4, p. 793–817, 2011.

BOWSER, P. R.; BABISH, J. G. Clinical pharmacology and efficacy of fluoroquinolones in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 1, p. 63-66, 1991.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, nº 053, de 18 mar. 2005. p. 58-63.

BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 593, p. 129–139, 2007.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ – CBH-PCJ. **Atualização dos valores dos preços unitários básicos das cobranças PCJ**. Piracicaba, 2013. 141 p. Disponível em: <http://www.agenciapcj.org.br/docs/relatorios/relatorio-fundamentacao-pcj.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2013.

CHA, J. M.; YANG, S.; CARLSON, K. H. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1115, p. 187-198, 2005.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, n. 4, p. 973-985, 2006.

DINH, Q. T. et al. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. **Talanta**, London, v. 85, p. 1238-1245, 2011.

DONN, J.; MENDOZA, M.; PRITCHARD, J. AP: Drugs found in drinking water. McLean, VA: Associated Press National Investigative Team, 2008. Disponível em: www.usatoday.com/news/nation/2008-03-10-drugs-tap-water_N.htm. Acesso em: 20 mar. 2013.

DORIVAL-GARCÍA, N. et al. Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 106, p. 323-333, 2013.

EICHHORN, P.; AGA, D. S. Identification of a photooxygenation product of chlortetracycline in hog lagoons using LC/ESI-ion trap-MS and LC/ESI-time-of-flight-MS. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 76, p. 6002-6011, 2004.

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**, Amsterdam, v. 1217, p. 5674-5686, 2010.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DIAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 1008–1022, 2008.

GALVIN, S. et al. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n. 14, p. 4772-4779, 2010.

GLASSMEYER, S. T. et al. Environmental presence and persistence of pharmaceuticals. In: AGA, D. S. (Ed.). **Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 3–52.

GULKOWSKA, A. et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. **Water Research**, New York, v. 42, p. 395-403, 2008.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, London, v. 70, p. 678-690, 2006.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, p. 357–393, 1998.

HANSEN, M. et al. Environmental risk assessment of ionophores. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, p. 534–542, 2009.

HEBERER, T.; REDDERSEN, K.; MECHLINSKI, A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 46, p. 81–88, 2002.

HILEMAN, B. Troubled waters: EPA, USGS try to quantify prevalence, risks of compounds from drugs, personal care products. **Chemical & Engineering News**, Washington, DC, v. 79, p. 31–33, 2001.

HUSSAIN, S. A. et al. Removal of nitrate-N by antibiotic exposed bacterial isolates from constructed wetlands. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 2061–2069, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Informações sobre os municípios brasileiros**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>. Acesso em: 6 nov. 2013.

KASPRZYK-HORDEN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1161, n. 1-2, p. 132-145, 2007.

KIM, S.; AGA, D. S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from waste water treatment plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, London, v. 10, n. 8, p. 559-573, 2007.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment. A review e Part II. **Chemosphere**, Oxford, v.75, p. 435-441, 2009.

LAMBERT, W. Pitfalls in LC-MS(-MS) analysis. **Toxichem + Krimtech – GTFCh**, Munich, v. 71, n. 2, p. 64-68, 2004.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste by online solid phase extradiation-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 83, p. 410-424, 2010.

LUCZKIEWICZ, A. et al. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, New York, v. 44, n. 17, p. 5089-5097, 2010.

MANAIA, C. M.; VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C. Antibiotic resistance in waste- and surface waters and human health implications. In: BARCELÓ, D. (Ed.). **Emerging organic contaminants and human health**. Heidelberg: Springer, 2012. p. 173-212. (The Handbook of Environmental Chemistry Series, 20).

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, London, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

MARTÍNEZ-CABALLO, E. et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, London, v. 148, n. 2, p. 570-579, 2007.

MENGOZZI, G. et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 57, p. 1040-1043, 1996.

MIDDLETON, J.; SALIERNO, J. D. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 88, p. 79-88, 2013.

NOVO, A., MANAIA, C.M. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 1157-1166, 2010.

NOVO, A. et al. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Research**, New York, v. 47, p. 1875-1887, 2013.

RAMASWAMY, J. et al. The effect of composting on the degradation of a veterinary pharmaceutical. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 2294–2299, 2010.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTOS - SAAE. **Bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**. Indaiatuba, 2004. 24 p. Disponível em: http://www.saae.sp.gov.br/arquivos/as_bacias_hidrograficas_dos_rios_piracicaba.pdf
Acesso em: 06 jan. 2014.

SEGURA, P. A. et al. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 117, n. 5, p. 675-684, 2009.

SEIFRTOVÁ, M. et al. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, p. 158-179, 2009.

SERVIÇO MUNICIPAL DE ÁGUA E ESGOTO - SEMAE. **Piracicaba é a 22ª melhor do Brasil em saneamento**. Piracicaba, 2013. Disponível em: <http://www.semaepiracicaba.sp.gov.br/?p=bm90aWNpYV9jb21wbGV0YQ==&id=ODk3MQ==>. Acesso em: 20 dez. 2013.

SKURNIK, D. et al. Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 59, n. 7, p. 804-807, 2010.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, New York, v. 96, p. 92-98, 2010.

SUKUL, P.; SPITELLER, M. Fluoroquinolone antibiotics in the environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 191, p. 131-162, 2007.

SZCZEPANOWSKI, R. et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 7, p. 2306-2319, 2009.

TONG, L. et al. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, p. 1090-1097, 2009.

TORRES, N. H. et al. Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17alpha-ethinylestradiol and 17beta-estradiol in urban water supply by HPLC-DAD. **IOSRJEN J Engineering**, New Delhi, v. 2, n. 5, p. 984-989, 2012.

VANDERFORD, B. J. et al. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 75, p. 6265-6274, 2003.

ZHANG, Y.; MARRS, C. F.; SIMON, C.; XI, C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, p. 3702–3706, 2009.

ZHANG, R. et al. Antibiotics in the offshore waters of the Bohai Sea and the Yellow Seain China: Occurrence, distribution and ecological risks. **Environmental Pollution**, London, v. 174, p. 71-77, 2013.

ZHANG, T.; ZHANG, X. X.; YE, L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e26041, 2011.

WATKINSON, A. J. et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 17, p. 5667-5670, 2007.

4. Avaliação da toxicidade de antimicrobianos e hormônios para *Daphnia magna*

Resumo: A detecção de resíduos farmacêuticos no ambiente desencadeou investigações ecotoxicológicas sobre estes compostos durante a última década. Mas ainda existem lacunas em nosso conhecimento sobre o destino e os efeitos de medicamentos no ambiente. Por isso as consequências da contaminação por fármacos em organismos aquáticos não-alvo, têm sido motivo de preocupação entre cientistas e o público em geral. E, por estes compostos serem apontados como ameaças potenciais nos ecossistemas aquáticos, organismos aquáticos, como a *Daphnia magna*, são utilizados em testes ecotoxicológicos agudo e crônico. Os testes utilizando *D. magna*, são baseados em um protocolo descrito na Norma ABNT 12713, o qual consiste em ensaio agudo de 48 h de exposição para estabelecer parâmetros de sobrevivência. Sendo assim, os objetivos do trabalho foram: (i) calcular os valores de CE(I)50 48h com o microcrustáceo *Daphnia magna* para os antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacin, eritromicina, roxitromicina e sulfadiazina; e para os hormônios estriol, estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, progesterona e testosterona. Para tanto, os microcrustáceos *Daphnia magna* foram mantidos em câmaras BODs a 20°C e os neonatos, com 6 a 24 h de vida foram expostos a concentrações que variaram de 20 a 160 mg.L⁻¹ e um controle, todos em triplicata. A CE(I)50 48h calculada do estriol, norfloxacin, eritromicina e sulfadiazina para o microcrustáceo *Daphnia magna* foram de 94,58, 39,41, 94,58 e 33,19 mg.L⁻¹, respectivamente, e estes compostos foram classificados como pouco tóxicos para o microcrustáceo.

Palavras-chave: Antimicrobianos. *Daphnia magna*. Toxicidade aguda. Hormônios. Testes ecotoxicológicos.

Abstract: Detection of pharmaceutical residues in the environment ecotoxicological triggered research into these compounds during the last decade. But there are still gaps in our knowledge about the fate and effects of drugs in the environment. So the consequences of contamination by pharmaceuticals in aquatic non-target organisms, have been cause for concern among scientists and the general public. And, these compounds are mentioned as potential threats to aquatic ecosystems, aquatic organisms, such as *Daphnia magna*, are used in acute and chronic ecotoxicological tests. Tests using *D. magna*, are based on a protocol described in ABNT 12713, which consists of acute test 48 h of exposure to establish survival parameters. Thus, the objectives were: (i) calculate the EC₅₀ 48h values microcrustacean with *Daphnia magna* for antimicrobial ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin, roxithromycin and sulfadiazine, and for hormone estriol, estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, progesterone and testosterone. To this end, *Daphnia magna* were kept in BODs chambers at 20°C and microcrustaceans newborns, with 6 to 24 h of life were exposed to concentrations ranging 20-160 mg.L⁻¹ and a control, in triplicate. The calculated EC₅₀ 48h of estriol, norfloxacin, erythromycin and sulfadiazine microcrustacean to *Daphnia magna* were 94.58, 39.41, 94.58 and 33.19 mg.L⁻¹, respectively, and these compounds were rated as slightly toxic for microcrustacean.

Keywords: Antimicrobials. *Daphnia magna*. Acute toxicity. Hormones. Ecotoxicological tests.

4.1. Introdução

A presença de fármacos no ambiente tornou-se uma preocupação nas últimas décadas devido ao seu grande potencial de atividade em doses baixas (ANSKJÆR; RENDAL; KUSK, 2013). Estes compostos são introduzidos no ambiente por meio de aplicações de uso humano e veterinário em volumes comparáveis com o volume total de pesticidas, e a resistência aos antimicrobianos não é o único possível efeito adverso da liberação de antimicrobianos em ambientes aquáticos. Por isto, testes ecotoxicológicos estão começando a ser realizados a fim de documentar os efeitos em organismos aquáticos expostos (BAQUERO; MARTINÉZ; CANTÓN, 2008).

Franco et al. (2009) e Tulp et al. (2009) observaram que compostos ionizáveis mostraram uma tendência de maior toxicidade quando a forma neutra do composto domina no ambiente. Isto tem sido demonstrado por ensaios realizados com os crustáceos (KIM et al., 2010; RENDAL et al., 2011).

Antimicrobianos de uso humano são rotineiramente detectados em águas residuárias e superficiais e biota aquática (DAUGHTON; TERNES, 1999; KOLPIN et al., 2002; BROOKS et al., 2005; KWON et al., 2009). Com base no padrão de utilização da maior parte dos medicamentos de uso humano e seu destino final, propõe-se que a exposição da biota aquática a estes compostos deva ser testada, pois ainda há uma lacuna de dados de ensaios ecotoxicológicos na literatura científica.

A avaliação ecotoxicológica é de grande importância para o controle, regulamentação e classificação das substâncias tóxicas quanto ao seu potencial do risco ambiental. A identificação do perigo e a avaliação da relação da dose resposta são etapas iniciais no processo de avaliação do risco ambiental (USEPA, 2002; MACHADO, 2009).

Por isso, como o microcrustáceo *Daphnia magna*, invertebrado de água doce, é de grande importância para o ecossistema, por servir de fonte de alimento para anfíbios, peixes e outros organismos aquáticos, é facilmente cultivada em laboratório e utilizada para avaliar a toxicidade potencial de xenobióticos, incluindo fármacos (CONSTANTINE; HUGGETT, 2010).

Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas do microcrustáceo *Daphnia magna* agudamente exposto a onze fármacos, dentre eles, os antimicrobianos ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), sulfadiazina (SDZ), roxitromicina (ROX) e eritromicina (ERI), e os hormônios estriol (E3), estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), progesterona (PROG) e testosterona (TEST).

4.2. Revisão da literatura

4.2.1. *Daphnia magna*

Daphnia magna STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm. Atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares (MARANHO, 2006).

A *D. magna*, também conhecida como pulga d'água, é uma importante fonte de alimento para peixes. E, para o cultivo em laboratório, são muito utilizadas as espécies *D. similis* e *D. magna*, as quais não ocorrem naturalmente no Brasil (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Os dafinídeos são animais ideais para o uso em testes de toxicidade, pois são facilmente cultivados em laboratório e por serem bastante sensíveis a poluentes, podem ser utilizados para avaliar a toxicidade potencial de fármacos, por exemplo (CONSTATINE; HUGGETT, 2010).

As espécies de *Daphnia* têm de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e uma carapaça bivalve transparente que encerra todo o corpo, com exceção da cabeça e antenas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) (Figura 7).

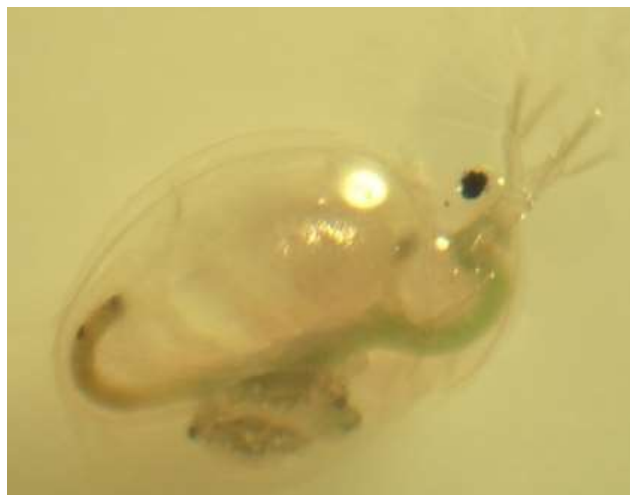


Figura 7 - *Daphnia magna*

4.2.2. Cultivo de *Daphnia magna*

Para obter boa reprodução de *D. magna*, é necessário o fornecimento de alimentação adequada para os organismos. O excesso de alimento pode acarretar a obstrução do aparelho filtrador dos mesmos e a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água. Como alimento para *D. magna*, pode ser utilizada uma cultura de algas, como *Pseudokirchneriella subcapitata*, e alimento composto de ração para peixe digerida e levedura dissolvida, os quais devem ser fornecidos à cultura todos os dias (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

4.2.3. Teste de toxicidade com *D. magna*

Nas últimas décadas o impacto de fármacos de uso veterinário lançados no ambiente em organismos aquáticos tem sido o foco de muitos artigos científicos (CONSTANTINE; HUGGETT, 2010; MICHAEL et al., 2012; ANSKJÆR et al., 2013). Por isso, a escolha da *D. magna* como organismo-teste fundamenta-se principalmente, nos seguintes critérios: os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de respostas nos ensaios; a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem altos custos; o manuseio é simples, devido ao tamanho relativamente grande dos indivíduos desta espécie, em comparação com outros microcrustáceos; a espécie reage

sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos; a espécie é adequada para testes estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo; o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar a *D. magna* também em testes crônicos e; *D. magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em laboratórios ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004).

Os testes ecotoxicológicos podem ser de dois tipos, agudo (compreendem os efeitos das substâncias tóxicas) e crônico (fornece informações complementares sobre a toxicidade não detectada nos testes agudos). Os testes de toxicidade fornecem informações sobre a letalidade relativa de um material, sendo delineado para determinar a concentração suficiente para causar efeito adverso a 50% dos organismos teste. Essa concentração é estimada pela exposição a uma série de concentrações de uma solução e as respostas dos organismos são observadas (MELLETTI, 1997).

Os testes de toxicidade aguda medem os efeitos dos agentes tóxicos sobre as espécies durante uma curta fase da vida, em um período de 24 a 96 h de exposição, onde são utilizados cinco concentrações e um controle (com sobrevivência de no mínimo 90% para ser aceitável). As respostas obtidas são os “end points”, valores resultantes de medidas específicas feitas durante ou após a conclusão do teste de toxicidade. O critério utilizado para *Daphnia magna* é a concentração efetiva média (CE(I)50), calculada a partir dos dados de imobilidade e/ou mortalidade do organismo-teste (MESSIAS, 2008). Todos os testes realizados devem ser acompanhados de uma amostra controle, constituída de meio de cultivo para *Daphnias* sem aplicação dos analitos de interesse.

As sulfonamidas constituem um grupo de agentes antimicrobianos muito utilizados na produção de gado, como exemplo, o sulfadiazina (SDZ), e é também utilizado para tratar doenças infecciosas na produção de suínos (THIELE-BRUHN, 2003). As sulfonamidas foram encontradas em água superficial em concentrações que variaram de 0,16 a 1900 ng.L⁻¹ (KOLPIN et al., 2002; GARCÍA-GALÁN et al., 2010; WEI et al., 2011).

Embora vários estudos tenham relatado dados de ecotoxicidade para este grupo de compostos (ANSKJÆR et al., 2013).

4.3. Materiais e Métodos

4.3.1. Local de realização dos testes

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

4.3.2. Manutenção do cultivo de *D. magna*

O cultivo da *D. magna*, foi realizado em meio de cultivo básico (M4) composto por água destilada reconstituída, com pH = 7,0. Os organismos foram cultivados em recipientes de vidro (cristalizadores) de 2 e 3L de capacidade. O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana. No início de cada semana realizou-se a troca do meio de cultivo, os lotes de organismos com cinco semanas de idade foram descartados e novos lotes de primeira semana iniciados com os neonatos coletados no dia. Nos outros dias da semana, no período da manhã, os aquários foram limpos e foi fornecida a alimentação (MACHADO, 2009).

A alimentação da cultura foi realizada com uma suspensão de algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* na quantidade aproximada de 5x10⁶ células/daphnia/dia. Além disso, também foram oferecidos, diariamente, 0,5 mL de alimento composto, constituído por proporções iguais de solução de ração para peixe ornamental fermentada e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), de acordo com a norma da CETESB (1999).

A solução algácea utilizada na alimentação das *D. magna* foi cultivada em meio CHOU, assim como descrito por Knie e Lopes (2004). O meio é composto por água destilada autoclavada e reconstituída com nutrientes. O cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata* foi conduzido em erlenmeyers de 2L, mantido sob aeração e luminosidade (3000 lux) constantes por uma semana. Após a cultura de alga atingir o crescimento adequado, a solução foi transferida para frascos de vidro e mantida em refrigerador, a 4 °C até o uso.

Para o preparo do alimento composto foram adicionados 5g de ração comercial para peixe ornamental (42 % proteína bruta) em 1 L de água destilada e mantida por uma semana sob aeração constante. Após esse período, a solução foi filtrada, fracionada em frascos de 100 mL e mantida congelada até o uso. Para o uso diário, foram utilizados 50 mL da solução de ração descongelada e misturada a 0,25 g de fermento biológico seco instantâneo diluído com mais 50 mL de água destilada.

4.3.3. Testes de toxicidade aguda com os fármacos

Os testes de sensibilidade com os organismos-teste foram realizados em triplicata e em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições cada concentração, em sistema estático. Os testes foram mantidos no escuro, em sala climatizada a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema estático, sem alimentação ou aeração por 48 horas. Nos testes com *D. magna* foram utilizados 5 neonatos/concentração. A carta-controle de sensibilidade foi realizada mensalmente com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) para o microcrustáceo, de acordo com a Norma ABNT 12713:2009, nas concentrações de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 mg.L^{-1} e um controle, em triplicata, com 5 neonatos/concentração.

Para os testes de toxicidade aguda, neonatos foram expostos a concentrações de ciprofloxacina, norfloxacina, sulfadiazina, roxitromicina e eritromicina, e os hormônios estriol, estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, progesterona e testosterona e um tratamento controle. Os testes foram realizados em tubos de ensaio de vidro com 10 mL de capacidade. As diluições foram realizadas a partir da adição de volumes conhecidos de uma solução-estoque completando um volume de 9 mL com meio de cultivo. As concentrações utilizadas variaram de 0 a 160 mg.L^{-1} . Em seguida, cinco organismos neonatos (6 a 24 h de vida) foram adicionados, juntamente com 1 mL de meio de cultivo, completando um volume total de 10 mL de solução-teste. Após as 48 h, o número de organismos imóveis (ou mortos) foi registrado. Os testes nos quais a mortalidade do grupo controle excedeu 10%, foram descartados.

4.3.4. Análise estatística

As estimativas da toxicidade aguda 48 horas (CE(I)50 48h) para *Daphnia magna* foram determinadas pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1978), e foram calculadas com limite de confiança de 95%. Para *D. magna* foi calculado o CE(I)50 48h.

4.3.5. Classificação dos fármacos pela sua toxicidade aguda

Os valores de CE(I)50 obtidos para a *D. magna* foram utilizados para classificar o CIP, NOR, SDZ, ERI, ROX, E1, E2, EE2, E3, PROG e TEST quanto à toxicidade aguda para a referida espécie, de acordo com as classes toxicológicas citadas por Zucker (1985) (Tabela 18).

Tabela 19 – Descrição qualitativa para as categorias de toxicidade de invertebrados aquáticos

Faixa de concentração (mg.L ⁻¹)	Descrição da categoria
< 0,1	Altamente tóxico
0,1 <CL ₅₀ <1	Muito tóxico
1<CL ₅₀ < 10	Moderadamente tóxico
10 <CL ₅₀ <100	Pouco tóxico
CL ₅₀ >100	Praticamente não-tóxico

Fonte: Adaptado de Zucker (1985).

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Testes com os fármacos para *D. magna*

Neste trabalho, o teste agudo 48 h com *D. magna* apresentou valores de toxicidade como resultado da CE(I)50 48h, de 33,19, 39,41, 94,58, e 94,58 mg.L⁻¹, para o SDZ, NOR, ERI, e E3, respectivamente, os quais foram calculados com limite de confiança de 95%, utilizando o método *trimmed* Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1978).

Nos testes com *D. magna*, as (CE(I)50 48h) estimadas foram de:

- 94,58 mg.L⁻¹ para o E3, com limite superior (LS) de 109,61 mg.L⁻¹ e limite inferior (LI) de 81,61 mg/L;
- 39,41 mg.L⁻¹ para o NOR, com LS de 59,02 mg.L⁻¹ e LI de 26,46 mg.L⁻¹;
- 94,58 mg.L⁻¹ para o ERI, com LS de 109,61 mg.L⁻¹ e LI de 81,61 mg.L⁻¹;
- 33,19 mg.L⁻¹ para o SDZ, com LS de 56,55 mg.L⁻¹ e LI de 19,48 mg.L⁻¹.

De acordo com os dados obtidos, do E3, NOR, SDZ e ERI, com valores da CE(I)50 48h de 94,58, 39,41 e 33,19 e 94,58, respectivamente, para a toxicidade aguda podem ser classificados como “pouco tóxicos” para *Daphnia magna*, de acordo com a metodologia descrita por Zucker (1985).

De acordo com Anskjær, Rendal e Kusk (2013), o antimicrobiano SDZ foi encontrado em amostras ambientais em concentrações que variam de 0,00016 a 1,9 mg.L⁻¹, e a concentração encontrada para a CE(I)50 48h (SDZ) foi de 33,19 mg.L⁻¹ neste trabalho. Por isso observa-se que a concentração encontrada no ambiente está muito abaixo do valor classificado por Zucker (1985) como “pouco tóxico”. O valor da CE(I)50 para SDZ, encontrada por Wollenberger et al. (2000), o qual foi de 13,7 mg.L⁻¹, está abaixo do encontrado neste trabalho, que foi de 33,19 mg.L⁻¹.

Os testes ecotoxicológicos utilizando *D. magna*, para os antimicrobianos CIP, ENR, ROX, e para os hormônios E2, EE2, E1, PROG e TEST, os testes não apresentaram resultados confiáveis que pudessem ser utilizados e descritos para calcular a CE(I)50 48h. também houve grande dificuldade em encontrar metodologias disponíveis para estabelecer novos parâmetros de análise, pois há uma grande lacuna quanto a trabalhos que descrevam testes ecotoxicológicos utilizando fármacos com *D. magna*.

4.5. Conclusões

De acordo com os valores calculados das CE(I)50 48h do E3, NOR, ERI e SDZ, para o microcrustáceo *Daphnia magna*, pôde-se estimar que estes compostos são pouco tóxicos para o referido organismo teste. Com os antimicrobianos CIP, ENR, ROX, e com os hormônios E2, EE2, E1, PROG e TEST, os valores dos testes

variaram e não puderam ser expressos, e não foi possível calcular as CE(I)50 48h. Os fármacos, por apresentarem moléculas com características particulares, são compostos pouco explorados. Por isso, há uma grande lacuna em trabalhos publicados nesta área, de onde advém a necessidade do desenvolvimento de mais trabalhos científicos de testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*.

Referências

ANSKJÆR, G. G.; RENDAL, C.; KUSK, K. O. Effect of pH on the toxicity and bioconcentration of sulfadiazine on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, Oxford, v. 91, p. 1183-1188, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Norma NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2003. 17 p.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BATT, A.; SNOW, D.; AGA, D. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 1963–1971, 2006.

BROOKS, B. W. et al. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. **Environmental Toxicology & Chemistry**, New York, v. 24, n. 2, p. 464–469, 2005.

CONSTANTINE, L. A.; HUGGETT, D. B. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemosphere**, Oxford, v. 80, p. 1069-1074, 2010.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, n. 6, p. 907–938, 1999.

FRANCO, A.; FU, W.; TRAPP, S. Influence of soil pH of the sorption of ionizable chemicals: modelling advances. **Environmental Toxicology & Chemistry**, New York, v. 28, p. 458–464, 2009.

HAMILTON, M. A. et al. Method for Estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 12, n. 4, p. 417, 1978.

KIM, J. et al. Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several

pharmaceuticals in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, London, v. 19, p. 662–669, 2010.

KNIE, L. W. J.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos – Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004. 289 p.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 36, p. 1202–1211, 2002.

KWON, J. W. et al. Determination of 17alpha-ethynylestradiol, carbamazepine, diazepam, simvastatin, and oxybenzone in fish livers. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 92, p. 359–369, 2009.

MACHADO, A. A. **Aspectos ecotoxicológicos da oxitetraciclina para *Oreochromus niloticus*, *Daphnia magna* e *Lemna minor***. 2009. 48 p. (Monografia) - Faculdade de Educação São Luís, Jaboicabal, 2009.

MARANHO, L. A. **Biomagnificação do heptacloro num modelo de simulação em condições *ex-situ***. 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MELETTI, P. C. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba, SP, através de parâmetros ecotoxicológicos**. 1997. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MICHAEL, I. et al. Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. **Water Research**, New York, v. 46, p. 5621-5634, 2012.

OECD. **Guideline for Testing of Chemicals. *D. magna* reproduction test**. Paris, 1998. 21 p. (Guideline #211).

RENDAL, C.; KUSK, K. O.; TRAPP, S. The effect of pH on the uptake and toxicity of the bivalent weak base chloroquine tested on *Salix viminalis* and *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology & Chemistry**, New York, v. 30, p. 354–359, 2011.

TULP, H.C. et al. PH-dependent sorption of acidic organic chemicals to soil organic matter. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 43, p. 9189–9195, 2009.

USEPA. Toxicity assessment. In: _____. **Risk assessment guidance for superfund (RAGS)**. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 10 jul. 2013.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, p. 723–730, 2000.

ZUCKER, E. **Hazard Evaluation Division**. Standard evaluation procedure: Acute toxicity test for freshwater fish. Washington, DC: USEPA, 1985. (EPA 540/9-85-006).