



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



TESE DE DOUTORADO

Avaliação da presença de antibióticos e drogas ilícitas
na bacia do Rio Atibaia

AUTOR: MARCO ANTONIO FERNANDES LOCATELLI

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON DE FIGUEIREDO JARDIM

CAMPINAS

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

L787a Locatelli, Marco Antonio Fernandes.
Avaliação da presença de antibióticos e drogas
ilícitas na bacia do Rio Atibaia / Marco Antonio
Fernandes Locatelli. – Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Antibióticos. 2. Drogas ilícitas. 3. Rio Atibaia.
4. Cocaína. I. Jardim, Wilson de Figueiredo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Assessment of antibiotics and illicit drugs in the Atibaia River watershed

Palavras-chaves em inglês: Antibiotics, Illicit drugs, Atibaia River, Cocaine

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim (orientador), Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré (IQ-UnB), Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (IQ-UNESP), Prof. Dr. José Roberto Guimarães (FEC-UNICAMP), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 06/05/2011

*À memória do meu pai,
que me ajudou muito a
chegar até aqui.*

“A natureza achará uma solução para a poluição causada pela civilização. A questão que permanece é se os seres humanos estão incluídos ou não”

Mikhail Gorbachev

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao Wilson, por ter me “suportado” ao longo de 10 anos. Sou muito grato pela amizade, seus inúmeros ensinamentos e pela confiança depositada em mim.

À Cris, por todo amor, companheirismo e cumplicidade. Por me mostrar um mundo diferente do que queria ver.

Aos meus pais que me sempre me apoiaram e ensinaram que uma boa Educação é essencial.

Ao meu irmão, Paulo, pela amizade, carinho e respeito.

Ao Gustavo, pelo carinho, respeito e por me aceitar em sua vida.

À Bra, pelo carinho e amor e pela criação quando meus pais não estavam por perto.

À todos os meus amigos, por dividir comigo todos os momentos felizes e tristes por que passei, em especial, Fernando, Alói, Presunto, Léo, Torto, Zizo, Júlio e Cé.

À todos do LQA e do GIA com quem tive a felicidade de conviver e aprender.

À Polícia Federal, em especial ao Adriano Maldaner, e à CAESB por terem me dado a oportunidade de trabalhar e gerar dados sobre o consumo de drogas no país.

Aos funcionários do Instituto de Química com quem convivi diariamente desde 1999 e que me ajudaram no desenvolvimento do projeto, em especial, Pimpim, Fontana e Mário.

Ao CNPq pela bolsa concedida, à FAPESP e ao INCTAA pelo apoio financeiro ao projeto.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Marco Antonio Fernandes Locatelli

Data de Nascimento: 11/11/1980

Formação Acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

Pós Graduação

Doutorado em Química Analítica (Ambiental)

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Início: Março/2006 *Término:* Maio/2010

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Mestrado em Química Analítica (Ambiental)

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Início: Março/2004 *Término:* Março/2006

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Graduação

Química com Atribuições Tecnológicas

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Início: Março/1999 *Término:* Dezembro/2003

Produção científica

Artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais

LOCATELLI M.A.F.; Sodré F.F.; Jardim W.F. (2011) Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; **60**; 385-393.

SODRÉ F.F.; Locatelli M.A.F.; Jardim W.F. (2010) Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue; *Water Air Soil Pollut.*; **206**; 57-67.

SODRÉ F.F.; Locatelli M.A.F.; Jardim W.F. (2010) Sistema limpo em linha para extra o em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais; *Quim. Nova*; **33**; 216-219.

SILVA P.T.S.; Locatelli M.A.F.; Jardim W.F.; Neto B.B.; Motta M.; Castro G.R.; Silva V.L. (2008) Endogenous iron as a photo-Fenton reaction catalyst for the degradation of PAHs in soils; *J. Braz. Chem. Soc.*; **19**; 329-336.

SODRÉ F.F.; Montagner C.C.; Locatelli M.A.F.; Jardim W.F. (2007) Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais na região de Campinas (São Paulo); *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*; **2**; 187-196.

2 resumos expandidos em anais de congresso.

12 resumos em anais de congresso.

Outros

Premia es acad micas

Pr mio Lavoisier concedido pelo CRQ-IV Região em 2003.

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS E DROGAS ILÍCITAS NA BACIA DO RIO ATIBAIA

Nesse trabalho foram desenvolvidos métodos e gerados os primeiros resultados sobre a presença de antibióticos e drogas ilícitas na bacia do Rio Atibaia. Foram desenvolvidos dois métodos analíticos, um para a quantificação dos oito antibióticos mais consumidos no Brasil e outro para a quantificação de sete drogas ilícitas e três metabólitos. Os métodos analíticos empregaram extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem*. Para os antibióticos, o método apresentou recuperações superiores a 65%, com exceção dos compostos β -lactâmicos, linearidade, repetibilidade e limites de quantificação (LQ) na ordem de pg L^{-1} . Para as drogas ilícitas, o método analítico apresentou recuperações acima de 80% para seis dos 10 analitos em pH 2,5, linearidade e repetibilidade e LQ na ordem de pg L^{-1} . Os antibióticos com maiores concentrações nas águas do Rio Atibaia foram cefalexina e amoxicilina. O ponto com maior concentração de antibióticos no Rio Atibaia está localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas no período de seca e na cidade de Atibaia, no período de chuvas. A aplicação de polímeros de impressão molecular como sorvente de SPE mostrou resultados que evidenciam o impacto do aporte de esgoto nos ribeirões Anhumas e Pinheiros devido às elevadas concentrações observadas das fluoroquinolonas. Com relação às drogas ilícitas, cocaína (COC) e seu metabólito benzoilecgonina (BEN) foram quantificados na bacia do Rio Atibaia. Os ribeirões Anhumas e Pinheiros apresentaram as maiores concentrações de COC e BEN e observou-se uma elevação da concentração desses compostos no Rio Atibaia conforme ele flui por áreas mais povoadas. Perfis de concentração mostraram maior concentração à tarde e durante o final de semana. O método proposto foi aplicado no esgoto bruto do Distrito Federal (DF) permitindo estimar um consumo anual de 1.133 kg de cloridrato de cocaína pela população do DF. A análise do efluente das estações de tratamento de esgoto permitiu observar remoções superiores a 77% e 89% para BEN e COC, respectivamente.

Palavras chave: antibióticos, drogas ilícitas, cocaína, Rio Atibaia, LC-MS/MS.

ASSESSMENT OF ANTIBIOTICS AND ILLICIT DRUGS IN THE ATIBAIA RIVER WATERSHED

The major output of this work was the development of analytical methods to generate the first data on the presence of antibiotics and illicit drugs in the Atibaia river watershed. Two analytical methods were developed, one for the quantification of the eight most consumed antibiotics in Brazil, and the other for the quantification of seven illicit drugs and three metabolites. The analytical methods were based on solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The method for antibiotics showed recoveries above 65%, with exception of β -lactams, linearity, repetibility and limits of quantification (LOQs) in the pg L^{-1} range. For illicit drugs, the method showed recoveries above 80% to six compounds in acid condition (water pH 2.5), linearity, repetibility and LOQs in the pg L^{-1} range. Cefalexin and amoxicillin showed the highest antibiotic concentrations in both sampling campaigns in the Atibaia river. During dry season, the sampling point located nearby the Water Intake Station from Campinas City showed the highest antibiotics concentrations and, during rainy season, the Atibaia City Water Intake showed the highest concentrations. The use of molecularly imprinted polymer as SPE sorbent allowed to observe high concentrations of fluoroquinolones compounds in the Anhumas and the Pinheiros creek clearly showing the impact of sewage input. Cocaine (COC) and its metabolite benzoylecgonine (BEN) were the illicit drugs quantified in this basin. Both the Anhumas and the Pinheiros creek showed the highest concentrations and it was observed an increase in the concentration of these compounds in the Atibaia river as it flows through higher populated areas. Concentrations profiles of these two compounds showed higher concentration at afternoon and during weekend. The illicit drugs method was applied to the Federal District (FD) raw sewage allowing to estimate an annual cocaine hydrochloride consumption of 1,133 kg by the FD population. Sewage treatment plants (STPs) effluents analysis showed removals above 77% and 89% to BEN and COC, respectively.

Keywords: antibiotics, illicit drugs, cocaine, Atibaia river, LC-MS/MS.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
CAPÍTULO 1 – PREÂMBULO	1
CAPÍTULO 2 – INTRODUÇÃO AOS CONCEITOS GERAIS	5
INTRODUÇÃO	7
O saneamento básico no Brasil	8
Contaminantes emergentes	9
<i>Presença de fármacos em matrizes ambientais</i>	12
Métodos analíticos para determinação de fármacos em amostras aquosas	13
<i>Extração em fase sólida</i>	14
<i>Polímeros de impressão molecular (MIP)</i>	16
<i>Espectrometria de massas in tandem (MS/MS)</i>	17
O Rio Atibaia	18
CAPÍTULO 3 – A PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS NA BACIA DO RIO ATIBAIA	21
INTRODUÇÃO	23
Histórico	23
Classes	25
<i>β-lactâmicos</i>	26
<i>Quinolonas</i>	27
<i>Sulfonamidas</i>	27
<i>Tetraciclinas</i>	28
<i>Outras classes</i>	29
O consumo de antibióticos	29
A presença de antibióticos em águas superficiais	32
Os efeitos da presença de antibióticos em águas naturais	33

OBJETIVOS	35
PARTE EXPERIMENTAL	36
Escolha dos antibióticos	36
Reagentes e preparo dos padrões	37
Desenvolvimento do método analítico empregando SPE- HPLC-DAD-FL	39
<i>Separação cromatográfica</i>	39
<i>Extração em fase sólida</i>	39
Desenvolvimento do método analítico empregando SPE- LC-MS/MS	41
<i>Método cromatográfico</i>	41
<i>Extração SPE in tandem</i>	43
Aplicação do método proposto em amostras do rio Atibaia	44
<i>Descontaminação da vidraria de coleta</i>	44
<i>Pontos amostrais</i>	44
<i>Procedimentos de coleta</i>	46
<i>Campanhas de amostragem</i>	47
<i>Obtenção de um perfil 24 h dos antibióticos</i>	47
<i>Obtenção de um perfil semanal dos antibióticos</i>	47
Aplicação de MIP na extração SPE de fluoroquinolonas em amostras da bacia do Rio Atibaia	48
<i>Pontos amostrais</i>	48
<i>Procedimento de extração</i>	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Escolha dos Antibióticos	51
Desenvolvimento do Método Analítico por SPE-HPLC- UV/DAD-FL	54
Desenvolvimento do Método Analítico por SPE-LC-MS/MS	58
<i>Figuras de mérito</i>	64
<i>Teste de recuperação</i>	66
Determinação dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia	67

Obtenção de um perfil 24 h de concentração	74
Obtenção de um perfil semanal de concentração	75
Comparação entre as concentrações no Rio Atibaia e em outros rios	76
Aplicação do MIP em amostras da bacia do Rio Atibaia	79
CONCLUSÕES	82
CAPÍTULO 4 – A PRESENÇA DE DROGAS ILÍCITAS NA BACIA DO RIO ATIBAIA	85
INTRODUÇÃO	87
Classes	87
<i>Opiáceos</i>	87
<i>Anfetaminas e estimulantes tipo anfetaminas (ATS)</i>	88
<i>Cocaína</i>	89
Metabolização da cocaína	90
Drogas ilícitas em matrizes ambientais	91
OBJETIVOS	93
PARTE EXPERIMENTAL	94
Preparo dos padrões das drogas ilícitas	94
Desenvolvimento do método analítico por SPE-LC-MS/MS	95
<i>Desenvolvimento do método de extração (SPE)</i>	96
Determinação das drogas ilícitas em amostras da bacia do rio Atibaia	96
<i>Pontos amostrais</i>	98
<i>Campanha de amostragem</i>	98
<i>Obtenção de um perfil 24 h das drogas ilícitas</i>	99
<i>Obtenção de um perfil semanal das drogas ilícitas</i>	100
RESULTADOS E DISCUSSÕES	101
Desenvolvimento do método analítico por SPE-LC-MS/MS	101
<i>Testes de recuperação</i>	101
<i>Figuras de mérito analítico</i>	104

Determinação das drogas ilícitas nas águas da bacia do Rio Atibaia	104
Obtenção de um perfil 24h de concentração	109
Obtenção de um perfil semanal de concentração	111
CONCLUSÕES	113
CAPÍTULO 5 – ESTUDO DE CASO: PRESENÇA DE DROGAS ILÍCITAS EM ETE DE BRASÍLIA (DF) E ESTIMATIVA DE USO DE COCAÍNA PELA POPULAÇÃO	115
INTRODUÇÃO	117
OBJETIVOS	118
PARTE EXPERIMENTAL	119
Amostragem	119
Extração e determinação das drogas ilícitas	119
RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
Efeito da matriz	121
Esgoto bruto	123
Esgoto tratado	128
CONCLUSÕES	131
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ANEXO 1 – CURVAS ANALÍTICAS PARA OS ANTIBIÓTICOS	155

LISTA DE ABREVIATURAS

- 6AM** - 6-acetilmorfina
- AMP** - Ampicilina
- AMX** - Amoxicilina
- ANF** - Anfetamina
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATS** - *Amphetamine type substances*
- BEN** - Benzoilecgonina
- CAESB** - Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
- CEF** - Cefalexina
- CETESB** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- CIP** - Ciprofloxacino
- CMED** - Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos
- COC** - Cocaína
- CPTEC** - Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos
- CRF** - Conselho Regional de Farmácia
- DAD** - Detector UV por arranjo de diodos
- DDD** - Dose Diária Definida
- DF** - Distrito Federal
- DPF** - Departamento de Polícia Federal do Brasil
- DSAE** - Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos
- ETE** - Estação de Tratamento de Esgoto
- FEBRAFARMA** - Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica
- FL** - Detector por fluorescência molecular
- GGREM** - Gerência Geral de Regulação Econômica e Monitoramento de Mercado
- GSOLFA** - Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IET** - Índice de Estado Trófico
- INPE** - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
- IQA** - Índice de Qualidade da Água
- LC-MS/MS** - *Liquid chromatography-in tandem mass spectrometry*

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

LQA - Laboratório de Química Ambiental

MAN - Metanfetamina

MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA - 3,4-metilenodioxietilanfetamina

MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina

MIP - *Molecular imprinted polymer*

MOG - Morfina glucoronídeo

MOR - Morfina

MRM - *Multiple Reaction Monitoring*

NOR - Norfloxacino

NORMAN - *Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants*

NUREM - Núcleo de Assessoramento Econômico em Regulação

OMS - Organização Mundial de Saúde

PIB - Produto Interno Bruto

PNSB - Pesquisa Nacional do Saneamento Básico

RMC - Região Metropolitana de Campinas

SANASA - Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A

SIM - *Selected Ion Monitoring*

SMX - Sulfametoxazol

SNGPC - Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

SNIS - Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento

SPE - *Solid phase extraction*

TET - Tetraciclina

TMP - Trimetoprim

UGRHI - Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crime*

UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

USGS - *United States Geological Survey*

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Exemplos de fármacos quantificados em diversas matrizes ambientais.	12
Tabela 2 – Estruturas e classes dos antibióticos contemplados no trabalho.	38
Tabela 3 – Características do método cromatográfico empregado na separação e determinação dos antibióticos por HPLC-DAD-FL.	40
Tabela 4 – Tempo de retenção dos compostos, transições monitoradas, voltagem do fragmentador e energia de colisão.	43
Tabela 5 – Coordenadas globais dos três pontos amostrais ao longo do Rio Atibaia.	46
Tabela 6 – Coordenadas globais dos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.	50
Tabela 7 – Quantidade de cada antibiótico consumida (kg) no Brasil nos anos de 2004 e 2005.	52
Tabela 8 – Parâmetros utilizados na quantificação dos antibióticos.	55
Tabela 9 – Porcentagem de recuperação em amostras de água Milli-Q contaminadas com 5 µg L ⁻¹ dos antibióticos.	57
Tabela 10 - Íons precursores para os oito compostos investigados neste projeto.	59
Tabela 11 – Voltagem do fragmentador (V) para os oito compostos investigados.	60
Tabela 12 – Fragmentos de quantificação e de confirmação selecionados e energias de colisão para cada composto.	61
Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do equipamento e do método, faixa linear e coeficientes de correlação.	65
Tabela 14 – Concentração (ng L ⁻¹) dos antibióticos nos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia nos períodos de chuva e seca.	70
Tabela 15 – Concentração (ng L ⁻¹) de amoxicilina (AMX), ampicilina (AMP), cefalexina (CEF), norfloxacino (NOR), ciprofloxacino (CIP), sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP) em diversos corpos de água superficial.	77
Tabela 16 – Estruturas químicas das drogas ilícitas e metabólitos.	95
Tabela 17 – Tempo de retenção, transições monitoradas, voltagem do fragmentador e energia de colisão.	97
Tabela 18 – Coordenadas globais dos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.	98
Tabela 19 – Figuras de mérito do método proposto para a determinação de drogas ilícitas em águas superficiais.	105
Tabela 20 – Concentração (ng L ⁻¹) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) em corpos de água superficial de diversos países.	107
Tabela 21 – Razões entre as concentrações de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) para cada um dos pontos amostrais.	108

Tabela 22 – Carga (g d^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nos horários coletados.	110
Tabela 23 – Características das estações de tratamento de esgoto amostradas.	120
Tabela 24 – Concentração (ng L^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Março e Junho de 2010.	124
Tabela 25 – Carga (g d^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Junho de 2010.	125
Tabela 26 – Estimativa do consumo de cocaína (kg ano^{-1}) a partir das concentrações de benzoilecgonina nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Junho de 2010.	126
Tabela 27 – Estimativa de consumo de cocaína pela população servida pelas ETE a partir do aporte de cloridrato de cocaína e extrapolação para todo o Distrito Federal (DF).	127
Tabela 28 – Concentração (ng L^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de efluente das ETE e porcentagem de remoção.	129

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Principais rotas de aporte dos fármacos ao ambiente (adaptado de Hirsch <i>et al.</i> , 1999).	11
Figura 2 – Procedimento analítico típico empregado na determinação de fármacos em matrizes aquosas (baseado em Fatta <i>et al.</i> , 2007).	14
Figura 3 – Ilustração das etapas de um processo de extração em fase sólida (SPE).	15
Figura 4 – Etapas da síntese de um polímero de impressão molecular. (adaptado de MIP Technologies, 2011)	16
Figura 5 – Princípio de detecção no modo MRM em MS/MS. Q1, Q2 e Q3 são, respectivamente, os quadropolos 1, 2 e 3 (adaptado de MRM Proteomics, 2011).	18
Figura 6 – Visão geral da UGHRI 5 evidenciando o rio Atibaia (azul escuro), a RMC e a cidade de Campinas.	19
Figura 7 – Estrutura química básica das penicilinas (A) e das cefalosporinas (B).	26
Figura 8 – Estrutura química básica das fluoroquinolonas.	27
Figura 9 – Estrutura básica das sulfonamidas.	28
Figura 10 – Estrutura básica das tetraciclinas.	28
Figura 11 – Mercado mundial das diversas classes de antibióticos no ano de 2009 (adaptado de Hamad, 2010).	30
Figura 12 – Uso de antibióticos expresso pela Dose Diária Definida (DDD) para 33 países. A maioria dos dados foi retirado de Davey <i>et al.</i> (2008) com exceção dos valores atribuídos ao Brasil (ANVISA, 2006) e à Grécia, Itália, EUA e Bulgária (Goossens <i>et al.</i> 2007).	31
Figura 13 – Esquema da montagem dos cartuchos de SPE e fotografia do sistema montado. A – cartucho de troca aniônica. B – Cartucho polimérico.	41
Figura 14 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia. A seta indica a direção do curso d'água.	45
Figura 15 – Imagens dos pontos amostrais. (A) Estação de captação de água de Atibaia (Junho, 2009); (B) Ao lado da estação de captação de água de Campinas (Agosto, 2006); (C) Ponte da rodovia SP-332 (Fevereiro, 2006).	46
Figura 16 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia e dos seus afluentes, os ribeirões Pinheiros e Anhumas. As setas indicam as direções dos cursos d'água.	49
Figura 17 – Região do cromatograma obtido por HPLC-DAD para um padrão 5 mg L ⁻¹ contendo os oito antibióticos. 1-Amoxicilina, 2-Trimetoprima, 3-Ampicilina, 4-Cefalexina, 5-Tetraciclina, 6-Norfloxacino, 7-Ciprofloxacino e 8-Sulfametoxazol. A região destacada é mostrada com aumento evidenciando a coeluição da ampicilina e da cefalexina.	55
Figura 18 - Região do cromatograma obtido para a amostra do ribeirão Anhumas contaminada com 5 µg L ⁻¹ dos antibióticos por HPLC-DAD.	57

Figura 19 – Espectro de massas obtido para o ciprofloxacino no modo <i>scan</i> .	59
Figura 20 – Variação da intensidade do sinal do CIP para as voltagens do fragmentador.	60
Figura 21 - Espectros de massas obtidos para CIP a partir da aplicação de diferentes energias de colisão (EC) sobre o íon precursor $[M-H]^+$ (marcado com \blacklozenge). a) EC 35 V; b) EC 25 V; c) EC 15 V; d) EC 5 V.	62
Figura 22 – Cromatogramas obtidos para um padrão dos antibióticos no modo MRM por LC-MS/MS. Cromatograma (a) total; (b) AMX; (c) TMP; (d) TET; (e) SMX; (f) CEF; (g) AMP; (h) NOR; (i) CIP.	63
Figura 23 – Epimerização presente na molécula de tetraciclina.	64
Figura 24 – Porcentagem de recuperação dos antibióticos e desvios médios para os testes realizados com soluções contendo 50 e 500 ng L ⁻¹ .	67
Figura 25 – Pluviosidade acumulada na região de Campinas no período de seca anterior à coleta realizada em 2009. A seta indica a data da amostragem.	68
Figura 26 – Pluviosidade acumulada na região de Campinas no período de chuvas anterior à coleta realizada em março de 2010. A seta indica a data da amostragem.	69
Figura 27 – Concentração dos antibióticos (ng L ⁻¹) ao longo do rio Atibaia nas amostras coletadas no período de seca.	72
Figura 28 – Concentração dos antibióticos (ng L ⁻¹) ao longo do rio Atibaia nas amostras coletadas no período de chuvas.	73
Figura 29 – Variação da concentração (ng L ⁻¹) de cefalexina (CEF) e trimetoprim (TMP) no rio Atibaia ao longo de 24 h no ponto localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas.	75
Figura 30 – Variação da concentração (ng L ⁻¹) de cefalexina (CEF), trimetoprim (TMP), ciprofloxacino (CIP) e amoxicilina (AMX) no rio Atibaia, no ponto de coleta localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de uma semana.	76
Figura 31 – Porcentagem de recuperação dos antibióticos e erros relativos para uma amostra de água Milli-Q contaminada com 500 ng L ⁻¹ de cada analito.	79
Figura 32 – Concentração (ng L ⁻¹) de ciprofloxacino (CIP), norfloxacino (NOR) e trimetoprim (TMP) nos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.	80
Figura 33 – Rotas de biotransformação da cocaína no corpo humano (baseado em Paul <i>et al.</i> , 2005 e Goldstein <i>et al.</i> , 2009).	91
Figura 34 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia e dos seus afluentes, os ribeirões Pinheiros e Anhumas. As setas indicam as direções dos cursos d'água.	99
Figura 35 - Cromatogramas obtidos para um padrão das drogas ilícitas no modo MRM por LC-MS/MS. Cromatograma (a) total; (b) MOG; (c) MOR; (d) ANF; (e) MAN; (f) MDA; (g) MDMA; (h) 6AM; (i) MDEA; (j) BEN; (k) COC.	102
Figura 36 – Porcentagem de recuperação das drogas ilícitas em amostras de água Milli-Q enriquecidas com 50 ng L ⁻¹ nos três valores de pH avaliados. As	

barras de erro representam os erros relativos.	103
Figura 37 – Concentração (ng L^{-1}) de benzoilecgonina (BEN - azul) e de cocaína (COC – vermelho) nos pontos amostrais distribuídos ao longo da bacia do Rio Atibaia.	106
Figura 38 - Concentração de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) no Rio Atibaia, ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de 24 h.	109
Figura 39 - Concentração de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) no Rio Atibaia, ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de sete dias.	111
Figura 40 – Região do Distrito Federal contemplada na amostragem. As regiões azul, verde e laranja representam o Lago Paranoá, regiões com coleta e tratamento de esgoto e regiões sem tratamento.	120
Figura 41 - Concentração (ng L^{-1}) calculada de benzoilecgonina no esgoto bruto através da análise do extrato bruto e do extrato diluído 10 vezes.	122
Figura 42 - Concentração (ng L^{-1}) calculada de cocaína no esgoto bruto através da análise do extrato bruto e do extrato diluído 10 vezes.	122

CAPÍTULO 1

PREÂMBULO

O modelo de crescimento da sociedade moderna apresenta o consumismo como um de seus pilares de sustentação. Esse hábito consumista movimenta a economia, cria trabalho, gera renda, fomenta o desenvolvimento tecnológico. No entanto, esse modelo econômico tem se preocupado muito pouco com a geração de resíduos e o impacto causado por eles no ambiente. De maneira geral, tudo o que se consome tem como destino final de sua fabricação ou de seu uso as matrizes aquáticas, sejam elas águas superficiais ou subterrâneas.

Um dos setores industriais que mais cresce anualmente é o farmacêutico. Dezenas de novos medicamentos são desenvolvidos e comercializados a cada ano, mas o impacto que esses medicamentos podem causar no ambiente não são considerados nas etapas de pesquisa industrial. Outro mercado que cresce anualmente, mas que é um mercado ilegal, é o de drogas ilícitas. O consumo dessas substâncias causa diversos males às pessoas que as consomem, além do ônus social e econômico. Assim como todos os fármacos, o destino final das drogas também são compartimentos ambientais. Mas o que a presença de fármacos ou de drogas ilícitas em ambientes aquáticos pode causar nos organismos que ali vivem? Essa é uma pergunta que ainda precisa de resposta, e o primeiro passo para obtê-la é determinar qual a concentração dessas substâncias em águas, principalmente nas águas superficiais. Foi visando obter esses dados sobre a presença de fármacos, especificamente antibióticos, e de drogas ilícitas em águas superficiais na bacia do Rio Atibaia, SP, que esse trabalho foi desenvolvido.

Esse primeiro capítulo traz uma breve introdução ao trabalho e explicita o conteúdo de cada um dos capítulos que se seguem. O segundo capítulo apresenta uma conceituação geral sobre os tópicos que foram abordados e que são considerados importantes para situar a inserção do trabalho, tais como o saneamento básico no Brasil, a presença dos chamados contaminantes emergentes em matrizes ambientais, e aspectos relacionados à determinação analítica desses compostos em matrizes aquáticas.

O terceiro capítulo é voltado para a presença de antibióticos nas águas da bacia do Rio Atibaia. Nesse capítulo foi realizado um levantamento bibliográfico

sobre a presença e os efeitos dos antibióticos em águas naturais. Além dessa introdução, esse capítulo contempla todo o desenvolvimento dos métodos analíticos empregados, resultados obtidos, discussão, implicações e consequências dos dados gerados. O quarto capítulo traz o desenvolvimento do método analítico empregado na quantificação das drogas ilícitas bem como os resultados obtidos para o Rio Atibaia e dois de seus tributários.

O método analítico desenvolvido para a quantificação de drogas ilícitas em matrizes aquosas discutido no capítulo quatro foi aplicado em esgoto bruto e tratado do Distrito Federal. Os resultados obtidos nessa aplicação estão mostrados no capítulo cinco. Esse capítulo mostra ainda o cálculo da primeira estimativa de consumo de cocaína em uma região brasileira a partir da concentração de seu principal metabólito no esgoto bruto. Nesse capítulo ainda é proposta uma nova equação para esse cálculo da estimativa de consumo de cocaína. Por fim, o capítulo seis traz as considerações finais desse trabalho, proposições de ações que podem ser tomadas a partir dos resultados obtidos e traça as perspectivas futuras associadas aos resultados gerados.

CAPÍTULO 2

CONCEITOS GERAIS

INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos encontrados no planeta Terra necessitam, direta ou indiretamente, de água. Como consequência disso, os recursos hídricos representam a parte mais importante para o equilíbrio e o bem estar de um ecossistema. As variações ocorridas nos recursos hídricos, sejam elas físicas ou químicas, atingem não só a biota pertencente a esse ecossistema como também os seres humanos dependentes do fornecimento de água potável proveniente desses corpos aquáticos. As principais fontes de água potável para consumo humano são os rios e os lagos, os quais representam apenas 0,01% de todo o estoque de água presente no planeta (Baird, 2002). Dessa forma, o conhecimento sobre os recursos hídricos, suas composições químicas, regimes de vazão, constituição da biota e demais características devem ser estudados com a finalidade de se preservar a qualidade dos corpos aquáticos e, conseqüentemente, dos seres humanos.

Os recursos hídricos devem ser utilizados pelo homem de maneira sustentável, ou seja, deve-se obter o maior benefício possível sem que o corpo aquático perca suas características originais e sua capacidade de suporte. Para tanto, fatores como uso do solo, conservação de mata ciliar, captação de água e aporte de efluentes devem ser estudados. O aporte de efluentes, seja ele de origem industrial ou residencial, pode alterar substancialmente a composição química das águas de um corpo aquático. A presença de contaminantes clássicos, como amônia e fosfatos, em corpos aquáticos vem sendo exaustivamente estudada ao longo dos anos. Além desses contaminantes clássicos, diversos compostos de origem antrópica já foram encontrados em águas superficiais. Nesse sentido, a realidade brasileira é preocupante já que o sistema de saneamento básico existente atualmente é extremamente deficitário e o conhecimento sobre nossos corpos aquáticos é bastante limitado.

O saneamento básico no Brasil

Uma definição clássica do termo saneamento básico é fornecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) como “o conjunto de ações que visam a modificação das condições ambientais com a finalidade de prevenir a difusão de vetores patogênicos e de promover a saúde pública e o bem estar da população” (IBGE, 2004). Tais ações englobam os serviços de abastecimento de água potável, o esgotamento sanitário, a limpeza urbana, a coleta de lixo e a drenagem urbana. Historicamente, as políticas de saneamento básico no Brasil mostram-se muito ineficientes desde o início de suas implantações. Até meados da década de 1960, as medidas referentes ao saneamento básico foram escassas e localizadas em regiões em crescimento devido à migração da população rural aos grandes centros urbanos em formação. Durante o Regime Militar, houve uma centralização dos recursos pelo Estado que incentivou a criação de companhias estaduais de saneamento e lançou o Plano Nacional de Saneamento, que objetivava suprir 90% da população brasileira com água de “boa qualidade” e 65% com esgotamento sanitário até o fim da década de 1980, metas que não foram atingidas. Com a promulgação da Constituição de 1988, o poder de decisão sobre as políticas públicas passou a ser dos municípios. Com isso, as políticas de saneamento tornaram-se desiguais devido às dificuldades específicas de cada município em atender às necessidades de sua população (Pesquisa Nacional do Saneamento Básico, PNSB, IBGE, 2002).

O cenário atual do saneamento básico no Brasil mostra que 81,2% da população é abastecida com água potável e 43,2% tem seu esgoto ligado à rede coletora, segundo o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos (DSAE) referente ao ano de 2008 (SNSA, 2010) fornecido pelo Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS). Considerando somente a população urbana os índices sobem para 94,7% abastecida com água potável e 50,6% ligada à rede de esgotos. O DSAE mostra ainda que somente 34,6% do esgoto gerado recebe algum tipo de tratamento, e que 66% do esgoto coletado é tratado. Ou seja, 65,4% do esgoto gerado no país são despejados *in natura* nos corpos de

água (rios, lagos e oceano) ou no solo, comprometendo a qualidade da água utilizada para o abastecimento, irrigação e recreação. Dentre todos os compartimentos ambientais que recebem o aporte de esgoto bruto ou tratado no Brasil, os rios são os mais comprometidos uma vez que recebem o aporte de esgoto de 93,2% dos municípios brasileiros que apresentam rede coletora para essa matriz (PNSB, IBGE, 2010).

Classicamente, o aporte de esgoto bruto em águas naturais é caracterizado pela introdução de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, matéria orgânica e coliformes totais e fecais (Von Sperling, 2005). A presença de matéria orgânica e, principalmente, de nutrientes em corpos aquáticos leva ao crescimento exagerado da população de fitoplâncton e algas superiores que, ao se decomporem, diminuem consideravelmente a concentração de oxigênio dissolvido do corpo aquático dando origem ao processo chamado de eutrofização (Smith, 2003). No entanto, além dos contaminantes clássicos, o aporte de esgoto em corpos aquáticos também introduz ao meio diversas substâncias comumente encontradas nos mais variados produtos consumidos pela sociedade moderna, chamados atualmente de *contaminantes emergentes*.

Contaminantes emergentes

Em um primeiro momento, há uma tendência em se definir o termo *contaminantes emergentes* como novos contaminantes ou novas substâncias encontradas no ambiente. No entanto, os contaminantes emergentes contemplam uma classe de substâncias mais abrangente do que somente novos compostos sintetizados pelo homem e agora encontrados na natureza. A NORMAN (*Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants*), uma entidade sem fins lucrativos fundada com o apoio da União Europeia, define os contaminantes emergentes como compostos que não estão atualmente inclusos em programas de monitoramento rotineiro e que podem se tornar candidatos a futura regulação dependendo de pesquisas relacionadas às suas ecotoxicidades,

potenciais efeitos à saúde, percepção pública, e do monitoramento revelar suas presenças nos diversos compartimentos ambientais (NORMAN, 2008). Já a USGS (*United States Geological Survey*) define que os contaminantes emergentes não são só substâncias químicas, mas também micro-organismos que não são monitorados rotineiramente e que podem apresentar efeitos adversos à comunidade de um compartimento ambiental ou aos seres humanos (USGS, 2010).

Diversas classes de substâncias são classificadas atualmente como contaminantes emergentes: retardantes de chama bromados, plastificantes, hormônios, produtos de higiene pessoal, fármacos, nanomateriais, compostos organometálicos, aditivos de combustíveis, e toxinas excretadas por algas e cianobactérias (Petrovic e Barceló, 2006). De todas as classes de substâncias citadas, algumas vem recebendo grande atenção da comunidade científica principalmente os compostos farmacologicamente ativos e os chamados interferentes endócrinos.

Os fármacos podem ser definidos como substâncias químicas empregadas para o diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças em seres humanos ou em animais (Corcoran *et al.*, 2010). Eles são geralmente classificados segundo sua aplicação terapêutica: anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos, betabloqueadores, etc. Segundo o DrugBank, um banco de dados de fármacos disponível na internet, existem mais de 4.800 princípios ativos diferentes (Drugbank, 2010; Wishart *et al.*, 2008). O mercado farmacêutico mundial movimentou em 2009 a quantia de US\$ 837 bilhões e deve chegar a US\$ 1,1 trilhão em 2014 (IMS Health, 2010). Inevitavelmente, esse aumento no consumo de substâncias farmacologicamente ativas acarretará no aumento do aporte desses compostos em matrizes ambientais.

Existem diversas rotas de aporte de fármacos para o ambiente. A principal delas é o esgoto doméstico (tratado ou bruto) uma vez que após serem consumidos, esses compostos são total ou parcialmente metabolizados e, por fim, são excretados via urina ou fezes atingindo o sistema de esgotamento sanitário (Verbeeck *et al.*, 1983; Alcock *et al.*, 1999). O esgoto contendo o fármaco

excretado chega a uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) onde passa pelas etapas existentes em cada estação. Após tratado, há a geração de um efluente líquido, geralmente descartado em algum corpo receptor (rio, oceano, lagoa, etc.), e de um lodo que é incinerado ou aproveitado como fonte de nutrientes na agricultura. No entanto, os fármacos não são degradados totalmente no tratamento convencional dado ao esgoto (Paxéus, 2004; Maurer *et al.*, 2007; Castiglioni *et al.*, 2006a) e acabam, dessa forma, atingindo diversas matrizes ambientais. No Brasil, o cenário é pior do que o apresentado nos países desenvolvidos já que aqui a porcentagem de esgoto tratado até o momento é muito pequena como citado anteriormente. Outras vias de entrada de fármacos ao ambiente estão relacionadas com o uso veterinário desses compostos, a disposição final de medicamentos não consumidos e com o efluente de indústrias farmacêuticas (Martinez-Carballo *et al.*, 2007; Fick *et al.*, 2009). A Figura 1 mostra um resumo das principais rotas de aporte de fármacos ao ambiente.

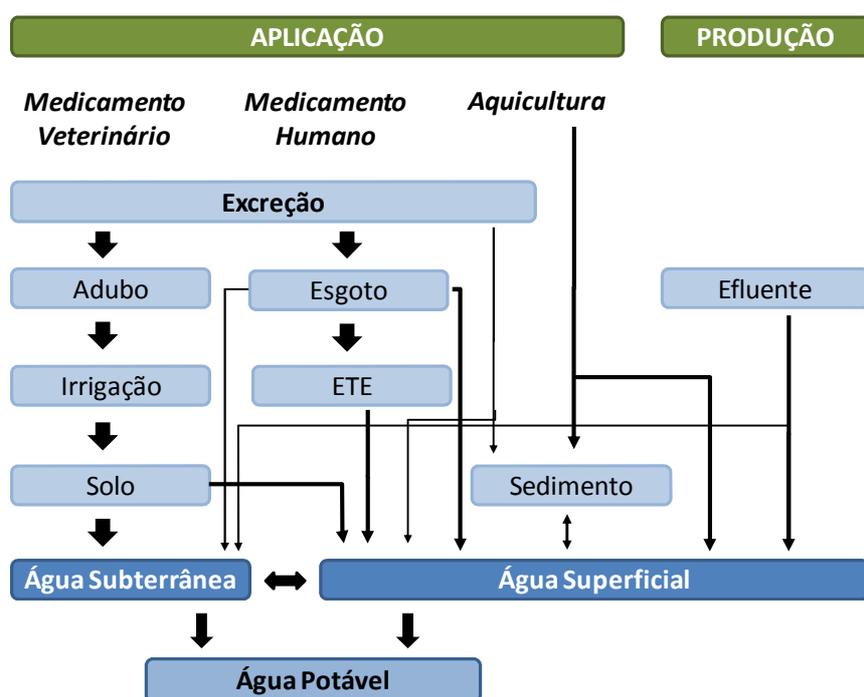


Figura 1 – Principais rotas de aporte dos fármacos ao ambiente (adaptado de Hirsch *et al.*, 1999).

Presença de fármacos em matrizes ambientais

A presença de fármacos em matrizes ambientais é conhecida desde a década de 1970, quando Garrison *et al.* (1976) encontraram ácido clofíbrico, um metabólito ativo do clofibrato (utilizado como regulador lipídico) em amostras de efluente de uma ETE. Nessa mesma época, Hignite e Azarnoff (1977) determinaram ácido salicílico e clorofenoxiisobutirato, metabólitos do ácido acetilsalicílico (AAS, ingrediente ativo da aspirina) e do clofibrato, respectivamente, em amostras de efluente de ETE de Kansas City, EUA. Em 1985, a ocorrência de fármacos em águas superficiais foi reportada em amostras de água do rio Lee, no Reino Unido (Richardson e Bowron, 1985). Até mesmo amostras de água subterrânea, uma matriz naturalmente mais protegida de contaminação, apresentaram a presença de antibióticos em trabalho publicado no meio dos anos 1990 (Holm *et al.*, 1995).

No entanto, somente após a publicação de um trabalho mostrando a presença de fármacos em amostras de esgoto e de águas superficiais na Alemanha é que a comunidade científica se mostrou preocupada com o aporte desses compostos em águas naturais e seus potenciais efeitos à biota e aos seres humanos (Ternes, 1998). Atualmente, mais de 100 compostos diferentes já foram quantificados nas mais variadas matrizes ambientais (Zwiener, 2007). A Tabela 1 mostra alguns compostos já quantificados em diferentes matrizes ambientais.

Tabela 1 – Exemplos de fármacos quantificados em diversas matrizes ambientais.

Classe	Fármaco	Matriz	Referência
<i>Analgésico</i>	Codeína	Esgoto hospitalar	Gomez <i>et al.</i> (2006)
<i>Antibióticos</i>	Sulfametazina	Solo	Shelver <i>et al.</i> (2010)
	Norfloxacino	Água de mar	Xu <i>et al.</i> (2007)
<i>Citostático</i>	Ciclofosfamida	Água de rio	Buerge <i>et al.</i> (2006)
<i>Antiepiléptico</i>	Carbamazepina	Água subterrânea	Rabiet <i>et al.</i> (2006)
<i>Anti-inflamatório</i>	Diclofenaco	Efluente de ETE	Stülten <i>et al.</i> (2008)
<i>β-bloqueador</i>	Metoprolol	Sedimento	Vazquez-Roig <i>et al.</i> (2010)
<i>Antilipêmico</i>	Atorvastatin	Esgoto bruto	Lee <i>et al.</i> (2009)
<i>Anti-histamínico</i>	Acrivastina	Efluente de ETE	Kosonen e Kronberg (2009)
<i>Hormônio</i>	17α-etinilestradiol	Água potável	Kuch e Ballschmiter (2001)

Métodos analíticos para determinação de fármacos em amostras aquosas

A qualidade da água, seja ela um efluente, natural ou potável, vem se tornando uma questão relevante dentro da química ambiental e da química analítica. A concentração da maioria dos fármacos em matrizes ambientais aquosas está na faixa de ng L^{-1} , baixa em termos absolutos. Por esse motivo, a quantificação de fármacos em matrizes aquosas requer técnicas analíticas mais refinadas, tanto do ponto de vista do preparo de amostras como da instrumentação analítica envolvida na determinação.

Os procedimentos de pré-tratamento da amostra são importantes. Dependendo da técnica de extração a ser empregada, o ajuste do pH da amostra passa a ser essencial. A filtração da amostra também é necessária já que a presença de matéria orgânica pode reduzir a eficiência do processo de extração (Fatta *et al.*, 2007). No entanto, apesar dessa etapa de filtração ser usual, muitos autores não consideram o fato de que alguns compostos adsorvem à matéria orgânica ou ao material particulado. A retirada desse material implica, então, na remoção desses analitos da amostra e, conseqüentemente, um resultado que não reflete a realidade pode ser obtido.

Diversos métodos de extração foram desenvolvidos visando a determinação de várias classes de fármacos em amostras aquosas utilizando principalmente métodos de extração em fase sólida (do inglês, Solid Phase Extraction, SPE; Bound e Voulvoulis, 2006; Moldovan, 2006). Diversos sorventes comercialmente disponíveis foram empregados e alguns outros foram desenvolvidos visando o processo de extração, com destaque para os polímeros de impressão molecular (do inglês, Molecularly Imprinted Polymer, MIP). Já a separação e quantificação dos compostos são, majoritariamente, realizadas por métodos cromatográficos. Cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a espectrometria de massas (do inglês, GC-MS e LC-MS) e a espectrometria de massas *in tandem* (do inglês, GC-MS/MS, LC-MS/MS) tornaram-se as técnicas mais utilizadas na

quantificação de fármacos. A Figura 2 mostra um esquema da determinação de fármacos em matrizes aquosas.

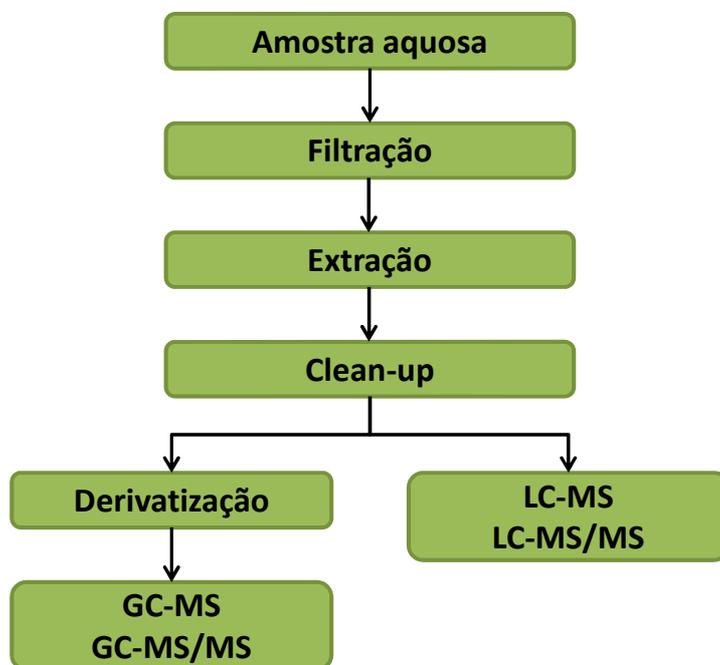


Figura 2 – Procedimento analítico típico empregado na determinação de fármacos em matrizes aquosas (baseado em *Fatta et al.*, 2007).

Extração em fase sólida

Uma etapa de extração tem como finalidade eliminar possíveis interferentes presentes na matriz e concentrar o analito visando sua quantificação. De maneira geral, um processo de extração empregando SPE consiste na passagem da amostra por um cartucho contendo um material com capacidade de reter os analitos, seguido de uma etapa de *clean-up* ou remoção de compostos interferentes, finalizando com a eluição seletiva dos analitos retidos nesse material por uma solução ou solvente extrator. A Figura 3 ilustra as etapas de um processo de extração por SPE.

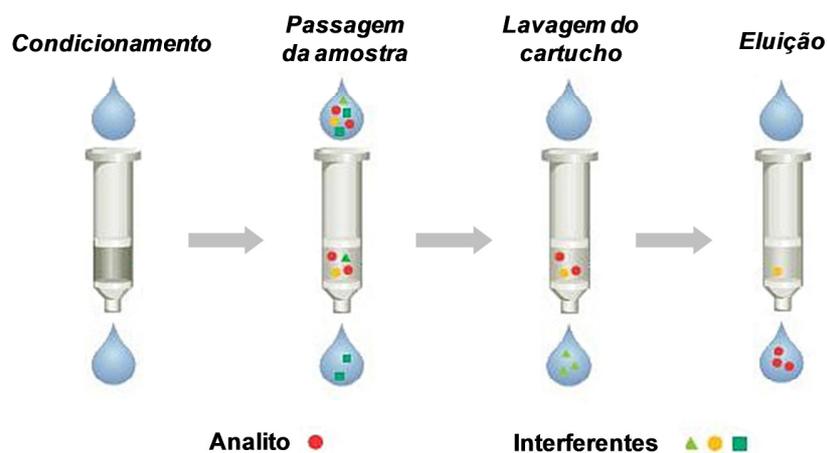


Figura 3 – Ilustração das etapas de um processo de extração em fase sólida (SPE).

Um dos fatores que afetam a eficiência de um processo de extração por SPE é a composição química do material sorvente. Tal material pode ser carvão ativo, sílica modificada contendo grupos C8 ou C18, copolímeros, e outros. Inicialmente, a extração de fármacos e de contaminantes emergentes em geral de matrizes aquosas era realizada empregando cartuchos cuja fase retentora continha grupos C18 (Ternes, 2001). No entanto, com o desenvolvimento de materiais poliméricos, os processos de extração baseados em C18 perderam espaço devido às diversas vantagens oferecidas pelos materiais poliméricos, tais como estabilidade em maior faixa de pH e alta retenção de analitos polares (Masqué *et al.*, 1998).

Dentre os cartuchos poliméricos disponíveis comercialmente, os cartuchos OASIS HLB (Waters) são os mais empregados na extração de compostos emergentes de matrizes aquosas (Huerta-Fontela *et al.*, 2010; Loos *et al.*, 2010; Gracia-Lor *et al.*, 2010). Tais cartuchos apresentam caráter lipofílico e hidrofílico sendo formados por um copolímero de N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno. Com relação à eluição dos analitos do cartucho, geralmente são empregados solventes polares tais como acetona, metanol e acetonitrila. No final do processo de extração, fatores de concentração tipicamente da ordem de 100 a 1000 vezes são obtidos, dependendo do volume de amostra extraído.

Polímeros de impressão molecular (MIP)

A impressão molecular é uma técnica que produz polímeros capazes de reconhecer uma molécula ou classe de moléculas. Tal polímero é obtido através do arranjo entre monômeros funcionais e uma molécula modelo (template) formando um complexo. As interações entre os monômeros e o template podem ser não covalentes (ligações de hidrogênio ou interações íon-par) ou covalentes (ligações covalentes reversíveis). Os complexos formados são unidos originando um polímero macroporoso altamente reticulado. A extração do template deixa no polímero cavidades com tamanho específico e grupos funcionais complementares ao template (Mayes e Mobach, 1997). A Figura 4 ilustra o processo de síntese de um MIP.

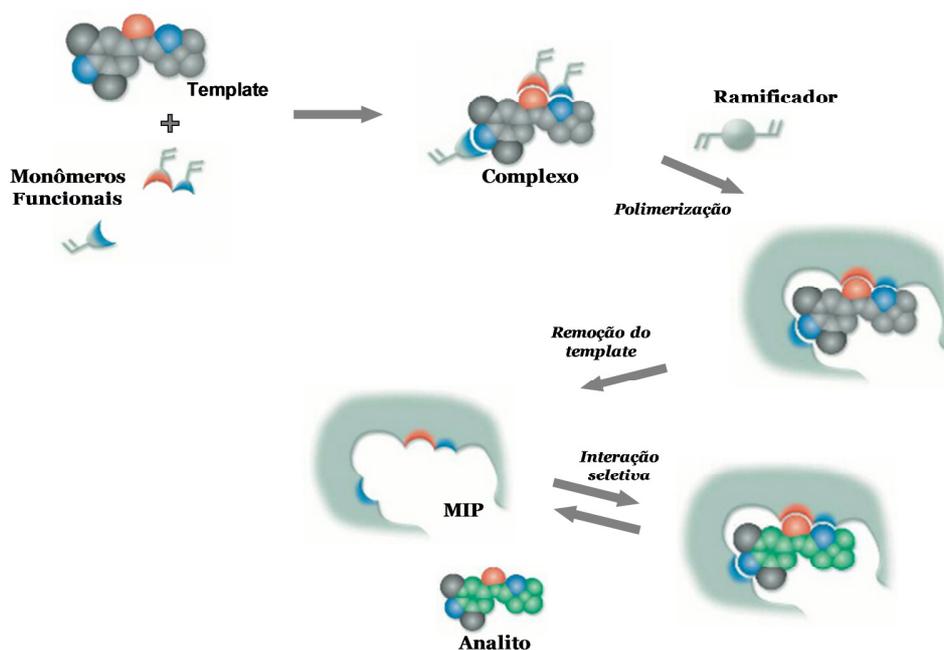


Figura 4 – Etapas da síntese de um polímero de impressão molecular. (adaptado de MIP Technologies, 2011)

Os MIP podem ser aplicados de diversas maneiras na química analítica: fase estacionária em colunas cromatográficas (Xie *et al.*, 2001), anticorpos artificiais (Rachkov e Minoura, 2000), componentes de sensores (Kriz *et al.*, 1997),

adsorventes para SPE (Martin *et al.*, 2003) e para remoção de substâncias recalcitrantes em efluentes (Le Noir *et al.*, 2009). A aplicação mais promissora dos MIP na determinação de fármacos e contaminantes emergentes em geral em amostras aquosas é como material adsorvente para SPE devido à elevada seletividade na extração. São obtidos extratos extremamente limpos, com baixa concentração de interferentes presentes na matriz extraída, o que implica em minimizar a possibilidade de interferência na análise instrumental.

Diversos MIP de contaminantes emergentes foram desenvolvidos e aplicados como adsorventes em extrações SPE. Sun *et al.* (2008) desenvolveram um MIP para diclofenaco, substância anti-inflamatória, e obtiveram recuperações de 99% no processo de extração. Kawaguchi *et al.* (2005) desenvolveram um MIP para bisfenol A, substância empregada na síntese de policarbonato e classificado como interferente endócrino, e aplicaram no processo de SPE obtendo recuperações acima de 99%. Outros exemplos de contaminantes que já tiveram MIP desenvolvidos são alguns antidepressivos (Demeestere *et al.*, 2010), antiepiléticos (Hoshina *et al.*, 2009), antibióticos (Yin *et al.*, 2010) e outros.

A aplicação de MIP como adsorventes em SPE é uma área em grande expansão e que possui um grande mercado na química analítica. Além dos exemplos acadêmicos citados anteriormente existem diversos MIP disponíveis comercialmente para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fluoroquinolonas, anti-inflamatórios, β -bloqueadores, nitrosaminas e outros.

Espectrometria de massas in tandem (MS/MS)

A técnica analítica mais empregada para a quantificação de contaminantes emergentes em matrizes ambientais é a espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) acoplada à cromatografia líquida. Nos últimos anos, os diversos avanços obtidos em MS/MS propiciaram um elevado grau de confiança, detectabilidade e especificidade às determinações. Geralmente, os limites de detecção (LD) atingem concentrações na ordem de ng L^{-1} , não sendo raros casos em que LD na ordem

de pg L^{-1} são obtidos (Hao *et al.*, 2007; De Alda *et al.*, 2003), o que na prática significa uma detecção de fentogramas do contaminante de interesse.

A grande maioria dos métodos empregados para análises quantitativas encontrados na literatura empregam espectrômetros de massas triploquadrupolares. Esses equipamentos apresentam três quadrupolos dispostos em sequência conferindo versatilidade a eles já que podem operar em diversos modos de aquisição de dados. A quantificação empregando MS/MS é realizada no modo MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*). Nesse modo o primeiro e o terceiro quadrupolo funcionam como um filtro de massas enquanto o segundo trabalha como uma cela de colisão. Após as diversas moléculas serem ionizadas na fonte de ionização do MS/MS, os íons formados são guiados até o primeiro quadrupolo. Nesse momento, o quadrupolo somente permite a passagem dos íons pré-determinados pelo método. Após a passagem por esse primeiro filtro, os íons chegam ao segundo quadrupolo onde são fragmentados através da colisão com um gás inerte e da aplicação de uma voltagem. Os fragmentos gerados chegam ao terceiro quadrupolo onde, novamente, somente os íons pré-determinados no método avançam e atingem o detector. A Figura 5 ilustra o funcionamento de um MS/MS operando no modo MRM.

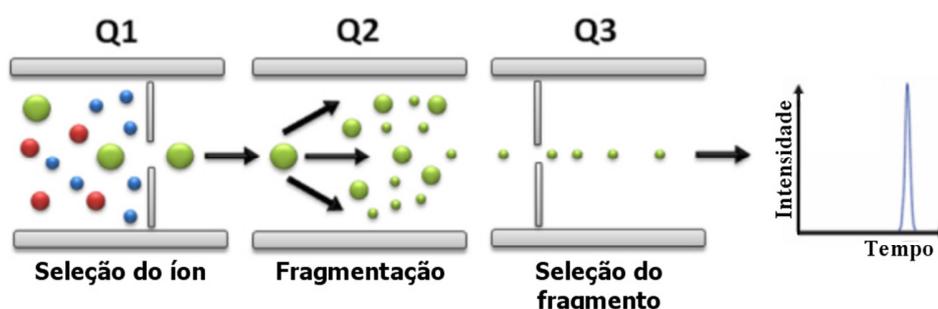


Figura 5 – Princípio de detecção no modo MRM em MS/MS. Q1, Q2 e Q3 são, respectivamente, os quadrupolos 1, 2 e 3 (adaptado de MRM Proteomics, 2011).

O Rio Atibaia

O Rio Atibaia nasce da confluência dos rios Cachoeira e Atibainha, no município de Bom Jesus dos Perdões, Estado de São Paulo. Ele apresenta

comprimento aproximado de 182 km desde sua origem até seu encontro com o rio Jaguari, onde se inicia o rio Piracicaba. Sua bacia hidrográfica abrange uma área de 2.800 km², o que representa 1,1% da área do Estado de São Paulo, e seus principais afluentes são os ribeirões Pinheiros e Anhumas. A bacia do rio Atibaia está inserida dentro da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) 5, sendo classificada como uma sub-bacia do rio Piracicaba (CETESB, 1999), como mostra a Figura 6. Diversas cidades são drenadas, total ou parcialmente, pela bacia hidrográfica do rio Atibaia: Americana, Campinas, Jaguariúna, Nova Odessa, Paulínia, Valinhos, Vinhedo, Itatiba, Jarinu, Morungaba, Atibaia, Bom Jesus dos Perdões, Bragança Paulista, Joanópolis, Nazaré Paulista e Piracaia, no Estado de São Paulo além de Camanducaia, no Estado de Minas Gerais.

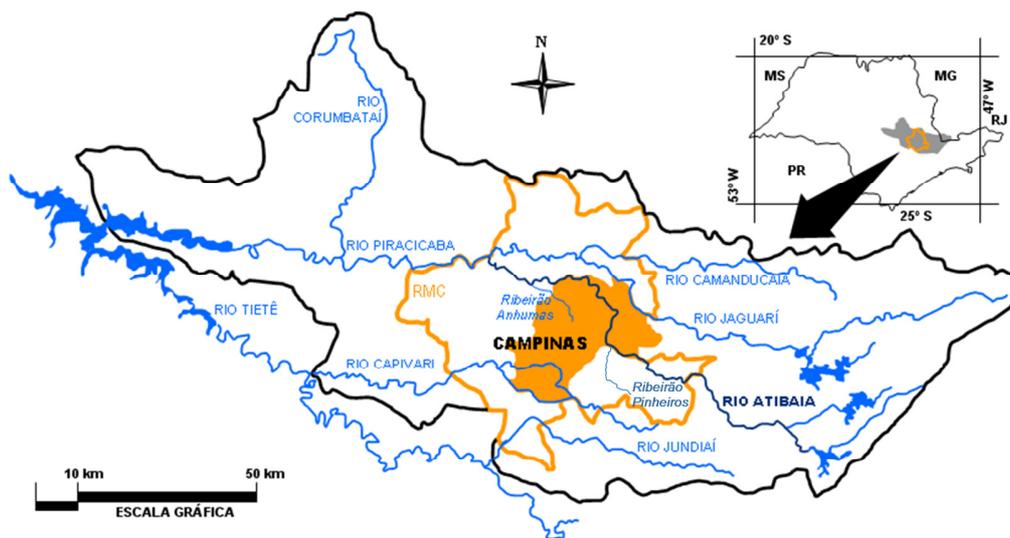


Figura 6 – Visão geral da UGRHI 5 evidenciando o rio Atibaia (azul escuro), a RMC e a cidade de Campinas.

A Região Metropolitana de Campinas (RMC) é uma das três regiões metropolitanas do Estado de São Paulo. A RMC apresenta grande importância no cenário estadual e nacional por apresentar mais de 2.700.000 habitantes, parque industrial de alta tecnologia, inúmeros centros de pesquisa e um Produto Interno Bruto (PIB) de 62,6 bilhões de reais no ano de 2006 (SEADE, 2009). Dos 19 municípios que fazem parte da RMC, 18 estão inseridos na UGRHI 5 (a cidade de

Engenheiro Coelho faz parte da UGRHI 9) sendo que oito estão inseridos na área da bacia do rio Atibaia, o que evidencia a importância dos recursos hídricos dessa bacia para a população da RMC.

Segundo o Relatório de Águas Superficiais no Estado de São Paulo do ano de 2008, o rio Atibaia apresenta Índices de Qualidade da Água (IQA) bons até a cidade de Campinas onde há uma piora na sua classificação (CETESB, 2009). Esse mesmo documento mostra que a cidade de Campinas possui 50,6% da carga orgânica doméstica remanescente quando comparada com a carga orgânica potencial, sendo o rio Atibaia o destino final desse aporte provocando, assim, a piora na sua classificação após passar por Campinas.

CAPÍTULO 3

A PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS NA BACIA DO RIO ATIBAIA

INTRODUÇÃO

O termo antibiótico surgiu em 1941 quando Selman Waksman o empregou para descrever qualquer molécula pequena sintetizada por um micro-organismo que antagonizasse o crescimento de outros micro-organismos. Pela definição de Waksman, somente moléculas produzidas por algum micro-organismo são classificadas como antibióticos. Outra denominação empregada é a de antimicrobiano, que é qualquer substância, seja ela produzida naturalmente por micro-organismos ou sintetizada em laboratório pelo homem, que apresenta a propriedade de inibir a reprodução ou matar um micro-organismo patogênico. Essas definições são aparentemente claras e diretas, mas são constantemente empregadas de maneira equivocada. Muitos antimicrobianos sintetizados pelo homem são rotineiramente chamados de antibióticos. Devido ao uso indevido da terminologia, a palavra antibiótico passou a ser empregada para descrever um antimicrobiano. Considerando esse fato, o termo antibiótico será empregado nesse capítulo bem como nos demais com o sentido mais amplo, que por definição é indevido, mas que é forma mais usual de se referir a esta classe de compostos.

Histórico

Desde o seu surgimento, a espécie humana vem empregando diversas plantas para combater os mais variados tipos de enfermidades. A evidência mais antiga do uso de plantas com atividades antimicrobianas data do Paleolítico Médio (130.000 a 33.000 a.C.) e foi encontrada na tumba de um Neandertal localizada no Iraque (Lietava,1992). Ao longo do desenvolvimento das diversas civilizações humanas o uso de plantas com atividade bactericida aumentou consideravelmente assim como o conhecimento sobre os processos infecciosos. Egípcios e mesopotâmicos, apesar de acreditarem na existência de um caráter divino nas enfermidades, desenvolveram diversos tratamentos baseados em misturas

contendo partes de plantas, de animais e alguns minérios. Os chineses empregavam mercúrio, arsênio e óleo de chaulmogra no tratamento de várias doenças, entre elas a lepra. No entanto, foram os Gregos que desmistificaram as enfermidades e o uso de “medicamentos” desenvolvendo uma teoria farmacológica baseada na teoria fisiológica da época (García-Rodríguez *et al.*, 1997).

Durante a Idade Média, a civilização humana foi assolada por diversas epidemias. Nesse período a medicina árabe foi a que trouxe maiores avanços, voltados principalmente para as medidas profiláticas. Os medicamentos aplicados no tratamento das “pestes” eram, sobremaneira, os mesmos existentes até então. Com o Renascimento, novas ideias acerca das doenças e dos tratamentos surgiram. Nessa época passaram a ser empregadas plantas existentes na América para o tratamento da “peste” e se disseminou o uso de mercúrio no tratamento da sífilis. No entanto, pouco se sabia sobre como essas plantas e os metais controlavam os processos infecciosos. Foi no século XIX que o entendimento sobre o tratamento com antimicrobianos começou a mudar, principalmente devido ao desenvolvimento da Microbiologia e da ideia de que as doenças eram causadas por germes (García-Rodríguez *et al.*, 1997).

O marco inicial do desenvolvimento dos antibióticos foi o descobrimento por Louis Pasteur de que fungos do gênero *Penicillium* inibiam o desenvolvimento de alguns micro-organismos. Pasteur também observou que animais portadores da bactéria *Bacillus anthracis* tratados com micro-organismos presentes no solo não apresentavam sintomas da doença provocada pelo bacilo. Até o final do século XIX diversos estudos envolvendo inibição de crescimento microbiano devido à presença de fungos foram realizados surgindo o conceito de antagonismo microbiológico. Somente no fim do século XIX, mais precisamente em 1888, é que houve o isolamento de uma substância com atividade microbiológica. Freudreich isolou um pigmento presente em culturas de *Bacillus pyocyaneu* e notou que esse composto, chamado piocianase, apresentava a propriedade de inibir o crescimento de diversos micro-organismos patogênicos. No entanto, a piocianase mostrou-se clinicamente tóxica e instável tornando inviável seu uso

terapêutico. O alemão Paul Erlich continuou o desenvolvimento de antibióticos empregando diversos corantes, tais como azul de tripan e verde malaquita, no tratamento de doenças. Ele também desenvolveu compostos organoarsenicais, sendo o salvarsan o mais conhecido. No entanto, a eficácia e a toxicidade devido às doses ministradas apresentadas por esses compostos impediram a popularização de seu uso.

Em 1929, Alexander Fleming observou que culturas de *Staphylococcus* deixavam de crescer ao redor de um fungo presente no meio de cultura. O composto liberado pelo fungo foi isolado e apresentou atividade antibiótica quando testado nos mais variados patógenos (Fleming, 1929). Dessa forma, Fleming descobriu a penicilina e deu início a chamada “era dos antibióticos”.

O emprego dos antibióticos no combate às enfermidades foi um verdadeiro marco revolucionário na Medicina. Até a década de 1940, quando os antibióticos passaram a ser largamente empregados, a expectativa de vida da população era baixa. Nessa época, doenças como sífilis ou tuberculose eram praticamente fatais. Dessa forma, o uso dos antibióticos contribuiu para o grande aumento da expectativa e da qualidade de vida da população mundial.

Classes

Existem pelo menos duas maneiras de se classificar os diversos antibióticos existentes. Uma delas leva em consideração o modo de ação do antibiótico. Segundo essa classificação os antibióticos podem ser divididos em bactericidas, que são aqueles que provocam a morte do micro-organismo, ou bacteriostáticos, que são aqueles que impedem a replicação celular do micro-organismo. No entanto, do ponto de vista químico a classificação dos compostos leva em consideração as funções orgânicas presentes nas suas estruturas químicas. A seguir são descritas algumas classes de antibióticos amplamente empregados.

β -lactâmicos

Os compostos dessa classe apresentam em sua estrutura química um anel β -lactâmico com quatro membros que pode estar, ou não, condensado a outra estrutura cíclica, formando um biciclo (Essack, 2001). Existem diversas subclasses dentro dos antibióticos β -lactâmicos, sendo mais empregados os compostos pertencentes às subclasses das penicilinas, que possuem o anel β -lactâmico condensado a um anel tiazidolina de cinco membros, e das cefalosporinas, que possuem o anel β -lactâmico condensado a um anel dihidrotiazina de seis membros (Perez-Inestrosa *et al.*, 2005). Amoxicilina, ampicilina, penicilina, penicilina G e benzilpenicilina são alguns exemplos de penicilinas amplamente empregadas enquanto cefalosporina C, cefalexina e cefuroxima são representantes das cefalosporinas. A Figura 7 mostra a estrutura básica dos compostos pertencentes a essas duas subclasses.

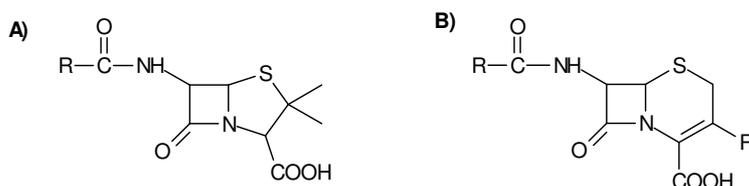


Figura 7 – Estrutura química básica das penicilinas (A) e das cefalosporinas (B).

Os antibióticos β -lactâmicos são os mais comercializados mundialmente devido, principalmente, às suas altas eficiências, amplo espectro e baixas toxicidades aos seres humanos (Galleni *et al.*, 1995; Demain, 2009). Eles são compostos bactericidas que interferem na síntese do peptidoglicano, polissacarídeo presente na parede celular dos patógenos, resultando em uma célula incapaz de suportar as suas próprias forças osmóticas (McDowell e Reid, 1989).

Quinolonas

As quinolonas são uma classe de compostos derivados do quinino e que foram sintetizadas primeiramente na década de 1960. No entanto, seu uso cresceu quando um átomo de flúor foi adicionado à estrutura química básica dos compostos, originando as fluoroquinolonas (Picó e Andreu, 2007). Essa modificação estrutural permitiu que os compostos dessa classe apresentassem amplo espectro de ação quando comparado com as quinolonas existentes anteriormente. A Figura 8 mostra a estrutura química das fluoroquinolonas.

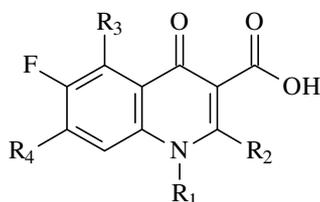


Figura 8 – Estrutura química básica das fluoroquinolonas.

As fluoroquinolonas são consideradas uma das drogas mais bem sucedidas desenvolvidas pela indústria farmacêutica. Isso porque apresentam grande tolerância e poucos efeitos adversos aos seres humanos (Albini e Monti, 2003). Elas impedem a ação da enzima DNA-girase provocando a morte do microorganismo (Oliphant e Green, 2002). Entre os compostos dessa classe estão o norfloxacin, ciprofloxacino, levofloxacino, entre outros.

Sulfonamidas

As sulfonamidas foram os primeiros antibióticos totalmente sintéticos produzidos. Os compostos dessa classe caracterizam-se pela presença do grupo orgânico sulfonamida na estrutura química, como mostrado na Figura 9.

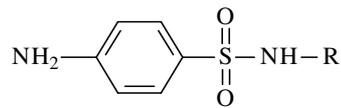


Figura 9 – Estrutura básica das sulfonamidas.

O efeito bactericida das sulfonamidas foi primeiramente descrito em 1935 através da observação de animais ministrados com p-sulfamidocrisoidina, também conhecido como prontossil (Domagk, 1935). As sulfonamidas são compostos bacteriostáticos que impedem a síntese do folato, composto essencial para a replicação do DNA. Alguns compostos dessa classe são sulfametoxazol, sulfametazina, sulfadiazina e sulfanilamida.

Tetraciclinas

As tetraciclinas constituem uma classe de antibióticos de origem natural ou semisintética. Os compostos dessa classe apresentam a estrutura química básica do naftaceno ou tetraceno. A essa estrutura são adicionados diversos ligantes diferenciando os compostos dessa classe (Mitscher, 1978), como mostrado na Figura 10.

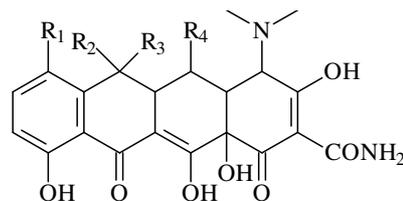


Figura 10 – Estrutura básica das tetraciclinas.

As tetraciclinas são compostos bacteriostáticos cujo mecanismo de ação é bem estabelecido na literatura. Os compostos dessa classe agem no ribossomo bacteriano impedindo a síntese proteica e, conseqüentemente, a replicação do micro-organismo (Pereira-Maia *et al.*, 2010). Algumas substâncias dessa classe são a tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina.

Outras classes

Além das classes introduzidas brevemente nos tópicos anteriores existem diversas outras. Os macrolídeos são compostos empregados no combate a diversas enfermidades devido ao seu amplo espectro de ação. São uma alternativa à penicilina e a substituem quando pacientes são alérgicos a ela. Alguns exemplos dessa classe de compostos são a eritromicina e a azitromicina.

Os aminoglicosídeos constituem uma classe de compostos cujos efeitos são conhecidos desde a década de 1940. Em algumas situações, os compostos dessa classe são empregados em conjunto com os β -lactâmicos aumentando a eficiência do tratamento (González e Spencer, 1998). Alguns compostos dessa classe são a estreptomicina e a gentamicina. Outras classes de antibióticos existentes são os nitroimidazólicos, afenicois, diaminopirimidinos, entre outros.

O consumo de antibióticos

A comercialização de antibióticos movimentou um montante de US\$ 42 bilhões no ano de 2009 no mundo todo. Esse valor representa 5% do mercado farmacêutico mundial (Hamad, 2010). As cefalosporinas foram os antibióticos que mais movimentaram o mercado no ano de 2009, atingindo a marca de US\$ 11,9 bilhões, o que representa 28% do mercado mundial de antibióticos. Em segundo lugar estão as penicilinas de amplo espectro (US\$ 7,9 bilhões e 19% do mercado) e em terceiro as fluoroquinolonas (US\$ 7,1 bilhões e 17% do mercado). A Figura 11 mostra os valores comercializados das diferentes classes de antibióticos no ano de 2009. Em termos de quantidade comercializada há uma inversão entre o primeiro e o segundo lugares. As penicilinas de amplo espectro foram as mais utilizadas no ano de 2009 seguido pelas cefalosporinas e pelas fluoroquinolonas (Hamad, 2010).

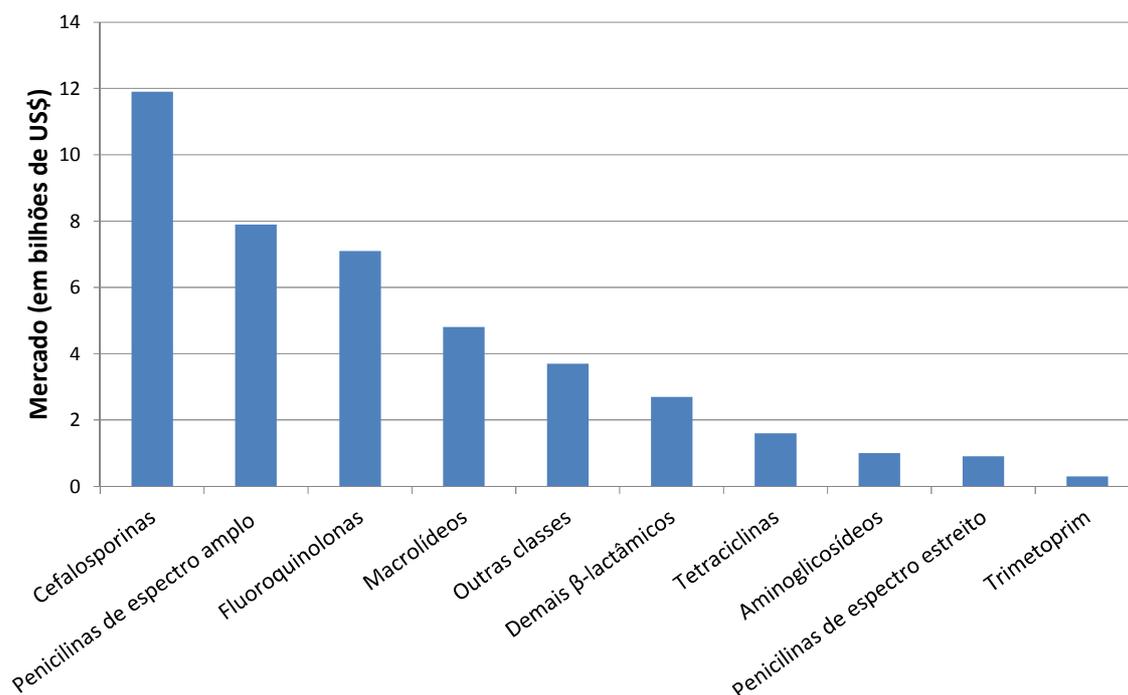


Figura 11 – Mercado mundial das diversas classes de antibióticos no ano de 2009 (adaptado de Hamad, 2010).

O consumo de antibióticos nas diversas regiões do mundo apresenta grandes variações, isso porque cada região apresenta prevalências diferentes para as diversas enfermidades provocadas por micro-organismos. Isso resulta em um consumo diferenciado das mais variadas classes de antibióticos pelas populações. Além disso, a quantidade de antibiótico consumida apresenta relação com o tamanho da população e com o grau de saneamento básico de uma população. Para normalizar a comparação entre o consumo de diversas populações definiu-se o termo Dose Diária Definida (DDD). Essa quantidade é estimada, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007), como a dose média de aplicação assumida por dia para determinado fármaco em sua principal indicação de uso em adultos. O valor de DDD é obtido a partir do número de prescrições médicas de determinado fármaco em um período de tempo em questão. Para efeito de comparação de valores em diversos países, os valores de DDD são normalizados pela população. A Figura 12 mostra o valor de DDD normalizado para diversos países.

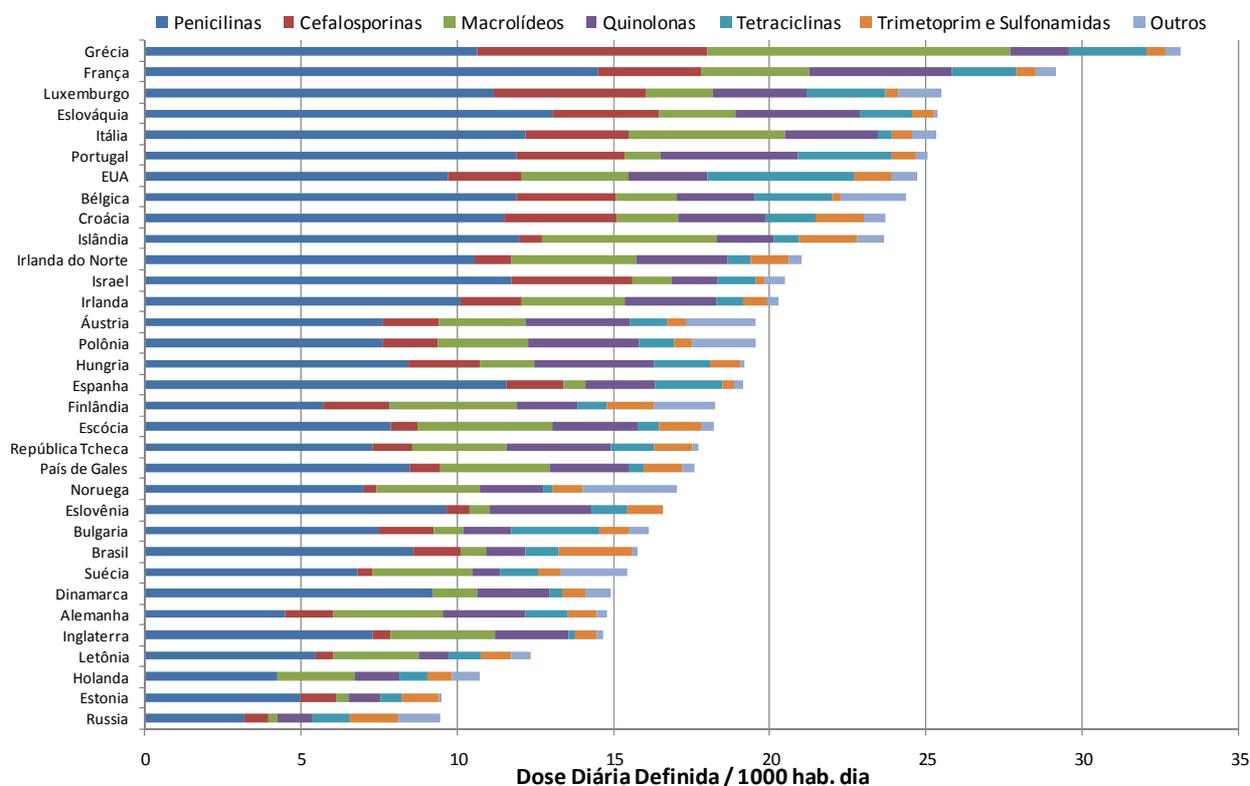


Figura 12 – Uso de antibióticos expresso pela Dose Diária Definida (DDD) para 33 países. A maioria dos dados foi retirado de Davey *et al.* (2008) com exceção dos valores atribuídos ao Brasil (ANVISA, 2006) e à Grécia, Itália, EUA e Bulgária (Goossens *et al.* 2007).

Os dados da Figura 12 mostram que o Brasil apresenta um consumo médio de antibióticos, com aproximadamente 16 DDD por mil habitantes, quando comparado com outros países. As classes mais consumidas são as penicilinas seguidas pelas sulfonamidas e trimetoprim. No entanto, deve-se considerar o fato de que a venda de antibióticos sem prescrição médica era um hábito comum na sociedade brasileira quando os dados mostrados na Figura 12 foram obtidos. Considerando esse fato, os valores de DDD brasileiros são maiores dos que os relatados. Essa inconsistência será minimizada já que desde outubro de 2010 está em vigor uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinando que a venda de antibióticos em território nacional só seja realizada

mediante a apresentação da prescrição médica que comprove a necessidade do uso dessa classe de medicamentos (ANVISA, 2010).

A presença de antibióticos em águas superficiais

A primeira observação da presença de antibióticos em águas naturais foi realizada em 1999 por Hirsch e colaboradores que determinaram 18 antibióticos de diferentes classes em amostras de efluente de ETE, água superficial e água subterrânea na Alemanha (Hirsch *et al.*, 1999). A partir de então a quantificação de antibióticos não só em águas superficiais, mas também em todas as outras matrizes ambientais tornou-se alvo de inúmeros trabalhos em diversos países.

O continente europeu é o que apresenta maior quantidade de corpos aquáticos cuja presença de antibióticos já foi confirmada. A presença de fluoroquinolonas nas águas do Rio Glatt, na Suíça, foi alvo do trabalho de Golet *et al.* (2002). Na Itália, 11 antibióticos pertencentes a cinco classes foram encontrados nas águas dos rios Pó e Arno (Zuccato *et al.*, 2010). Além desses países, Espanha (García-Galán *et al.*, 2010), França (Tamtam *et al.*, 2009), Inglaterra (Ashton *et al.*, 2004), Suécia (Bendz *et al.*, 2005) e outros já publicaram resultados comprovando a presença de antibióticos em corpos aquáticos superficiais.

A presença de antibióticos em amostras de água superficial nos EUA foi verificada por diversos trabalhos. Lindsey *et al.* (2001) mostraram a presença de antibióticos das classes das sulfonamidas e das tetraciclinas em amostras de água superficial coletadas em diversos Estados americanos. Kolpin *et al.* (2002) determinaram 22 antibióticos de diferentes classes em amostras de 139 rios distribuídos em 30 Estados. Além desses, outros trabalhos quantificaram antibióticos em amostras coletadas em rios norte-americanos (Yang e Carlson, 2003; Massey *et al.*, 2010). Ainda no continente americano, o Canadá é outro país em que antibióticos já foram determinados em amostras de água superficial (Hao *et al.*, 2006).

Dentre os países desenvolvidos e que não fazem parte do continente europeu nem americano, Japão e Austrália são os que já quantificaram antibióticos em, pelo menos, um de seus corpos aquáticos superficiais. No Japão foram quantificados oito compostos de três diferentes classes no rio Tamagawa (Managaki *et al.*, 2007). Esse mesmo estudo também quantificou os mesmos compostos no rio Mekong, Vietnã. Na Austrália foram quantificados 28 antibióticos pertencentes a nove diferentes classes em um estudo que contemplou 81 pontos de amostragem distribuídos ao longo de seis rios (Watkinson *et al.*, 2009).

Até mesmo países em desenvolvimento, como China e Índia já tiveram alguns de seus rios estudados visando avaliar a presença de antibióticos em suas águas (Fick *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). No entanto, este tipo de avaliação é inexistente no Brasil, apesar deste possuir a maior rede hidrográfica do mundo. Considerando ainda que o aporte de esgoto, bruto ou tratado, é a principal fonte de antibióticos para águas superficiais e que grande parte do esgoto gerado no Brasil atinge os corpos receptores sem nenhum tratamento é extremamente pertinente que tal avaliação seja realizada.

Os efeitos da presença de antibióticos em águas naturais

A exposição de micro-organismos a concentrações de antibióticos abaixo das concentrações inibitórias ao crescimento pode impactar as funções celulares desses micro-organismos, bem como alterar a expressão genética dos fatores de virulência ou promover a transferência da resistência a estas drogas (Ohlsen *et al.*, 1998; Salyers, 2002). Apesar de existirem poucos dados sobre a exposição de micro-organismos a baixas concentrações de antibióticos, o aporte direto e contínuo desses compostos em águas naturais (rios, lagos e mares) proporciona um ambiente que pode provocar mutações em micro-organismos patogênicos tornando-os resistentes ao tratamento convencional (Kümmerer, 2003). A presença de resistência microbiológica leva ao aumento de complicações de ordem clínica, prolonga a permanência de pacientes nos hospitais e pode causar o

surgimento de doenças resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente no mercado, levando a uma busca incessante de antibióticos cada vez mais potentes. Em um cenário mais catastrófico, bactérias patogênicas podem se tornar resistentes a todos os antibióticos conhecidos resultando em epidemias incontroláveis de doenças infecciosas impossíveis de serem tratadas (OMS, 2000).

A curto prazo, a resistência aos antibióticos parece ser a principal ameaça para os seres humanos da presença de antibióticos nas águas superficiais em baixas concentrações. No entanto, a exposição de algas, fitoplânctons e diversos outros micro-organismos aos antibióticos em ambientes aquáticos pode trazer sérias ameaças a longo prazo. As cianobactérias, micro-organismos responsáveis por mais de um terço da produção de O₂ e da fixação de CO₂, são bastante suscetíveis aos antibióticos (Baquero *et al.*, 2008). Além disso, em concentrações muito baixas os antibióticos podem ter a função de agentes sinalizadores alterando a regulação natural dos organismos. Por exemplo, as fluoroquinolonas afetam a replicação do cloroplasto e as sulfonamidas alteram a biossíntese do folato (Brain *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

O aporte de esgoto doméstico em corpos aquáticos, além de provocar os efeitos clássicos conhecidos como a eutrofização de corpos aquáticos, introduz nesse meio substâncias químicas empregadas nos diversos produtos desenvolvidos pelo homem para seu bem-estar, saúde ou entretenimento. O Rio Atibaia é a principal fonte de água potável para o município de Campinas e recebe diariamente uma carga muito elevada de esgoto bruto e de efluentes de ETE. De todos os compostos introduzidos no Rio Atibaia devido ao aporte de esgoto doméstico, os antibióticos apresentam grande interesse em termos de saúde pública devido à possibilidade de proliferação de bactérias resistentes. Considerando esses fatos, os objetivos desse trabalho foram:

1. Desenvolver um método analítico para a determinação de antibióticos em matrizes aquosas;
2. Estudar a presença e a variação na concentração desses compostos em diversos pontos de amostragem localizados ao longo do Rio Atibaia;
3. Situar os resultados obtidos gerando informações que possam servir de base para políticas públicas nas áreas de saúde, saneamento e de meio ambiente, tendo em vista que esta classe de compostos não é monitorada nos mananciais.

PARTE EXPERIMENTAL

A presença de antibióticos em águas naturais é uma preocupação relativamente recente na Química Ambiental. Métodos de quantificação em matrizes ambientais dessa classe de compostos amplamente empregados tanto na medicina humana como na veterinária são fundamentais para a avaliação do impacto humano sobre o ambiente, principalmente sobre os corpos aquáticos. O desenvolvimento desse trabalho iniciou-se pela escolha dos antibióticos que seriam estudados. Essa escolha foi baseada no consumo desses compostos pela população brasileira. Após essa etapa, desenvolveram-se os métodos de separação e quantificação bem como os métodos de extração dos analitos das matrizes a serem analisadas. A extração dos antibióticos foi realizada por SPE utilizando cartuchos comercialmente disponíveis e empregando MIP sintetizados em laboratório. Inicialmente, desenvolveu-se um método para separação e quantificação dos analitos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta com arranjo de diodos e fluorescência (do inglês, HPLC-DAD e HPLC-FL, respectivamente). Desenvolveu-se também um método de separação e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* (do inglês, LC-MS/MS).

Após o desenvolvimento do método analítico foram realizadas duas campanhas de amostragem na bacia do Rio Atibaia contemplando pontos estratégicos para o suprimento de água dos municípios de Atibaia e de Campinas. Realizaram-se também campanhas de amostragem para a obtenção de um perfil horário de concentração dos antibióticos ao longo de 24 horas e de um perfil semanal, com a realização de coletas ao longo de sete dias consecutivos.

Escolha dos antibióticos

Os antibióticos contemplados nesse trabalho foram escolhidos levando-se em consideração o seu consumo pela sociedade brasileira. Para tanto foi

necessário a obtenção de dados relativos à produção ou à venda desses fármacos no Brasil. Entrou-se em contato com diversos setores da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram contatados o Núcleo de Assessoramento Econômico em Regulação (NUREM), a Gerência Geral de Regulação Econômica e Monitoramento de Mercado (GGREM) e o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). Além desses setores da ANVISA, tentou-se a obtenção da quantidade consumida de antibióticos no Brasil através do Conselho Regional de Farmácia, por meio da sua seccional de São Paulo (CRF-SP) e através da Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica (FEBRAFARMA).

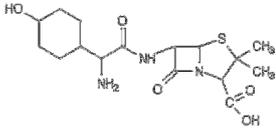
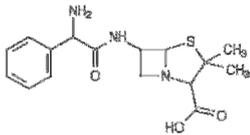
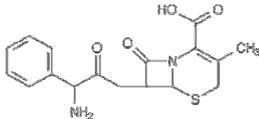
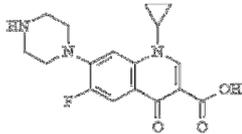
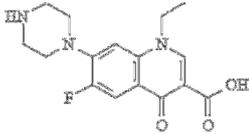
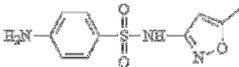
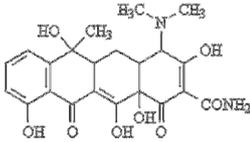
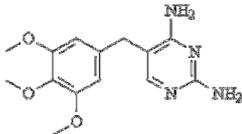
Através dos dados fornecidos pelo NUREM-ANVISA foram escolhidos os sete antibióticos mais consumidos no país para serem objeto de estudo desse trabalho, a saber: amoxicilina (AMX), ampicilina (AMP), cefalexina (CEF), ciprofloxacino (CIP), norfloxacino (NOR), sulfametoxazol (SMX), tetraciclina (TET). Além desses sete compostos, o trimetoprim (TMP) também foi escolhido por ser ministrado em conjunto com SMX. A Tabela 2 mostra as estruturas químicas e as classes a que esses compostos pertencem.

Reagentes e preparo dos padrões

Todos os padrões analíticos adquiridos apresentaram pureza superior a 97%. Amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacino, tetraciclina e trimetoprim foram obtidos da Fluka BioChemika. Norfloxacino e sulfametoxazol foram obtidos da Sigma e cefalexina, da Riedel-de Haën.

Os solventes utilizados como fase móvel ou no preparo dos padrões foram metanol (Mallinckrodt, grau pesticida), acetonitrila (JT Baker, grau HPLC) e água Milli-Q, obtida com resistividade de 18 MΩcm através do equipamento Milli-Q Plus (Millipore). Os aditivos de fase móvel empregados foram ácido fórmico (Fluka BioChemika, grau LC-MS/MS) e ácido fosfórico (Mallinckrodt, 85%). Os aditivos no preparo de amostra foram ácido clorídrico (JT Baker) e Na₂EDTA (Sigma-Aldrich).

Tabela 2 – Estruturas e classes dos antibióticos contemplados no trabalho.

Composto	Classe	Estrutura
Amoxicilina	<i>B-lactâmico (penicilinas)</i>	
Ampicilina	<i>B-lactâmico (penicilinas)</i>	
Cefalexina	<i>B-lactâmico (cefalosporinas)</i>	
Ciprofloxicino	<i>Fluoroquinolonas</i>	
Norfloxacino	<i>Fluoroquinolonas</i>	
Sulfametoxazol	<i>Sulfonamidas</i>	
Tetraciclina	<i>Tetraciclinas</i>	
Trimetoprim	<i>Diaminopirimidínicos</i>	

As soluções estoque de cada um dos compostos foram preparadas mensalmente dissolvendo-se os compostos em metanol de tal maneira que fosse obtida uma solução com concentração de 1.000 mg L^{-1} , com exceção de NOR (400 mg L^{-1}) e CIP (100 mg L^{-1}). As soluções de trabalho foram preparadas quinzenalmente diluindo-se apropriadamente as soluções estoque. Todos os

frascos contendo as soluções preparadas foram protegidos da luz com papel alumínio para evitar a fotodegradação dos compostos e mantidos em congelador (temperatura aproximada de -18°C) até o momento de utilização.

Desenvolvimento do método analítico empregando SPE e HPLC-DAD-FL

Separação cromatográfica

Foram testadas diversas condições cromatográficas para se obter uma separação eficiente dos oito compostos alvo contemplados nesse trabalho. Foi utilizado um cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu equipado com desgaseificador de fase móvel, bomba quaternária, injetor Rheodyne manual, detector UV por arranjo de diodos (DAD) e detector por fluorescência molecular (FL). O método foi otimizado para a separação cromatográfica dos oito compostos empregando o detector DAD. Ao método otimizado, adicionaram-se os parâmetros referentes ao detector de fluorescência molecular (comprimentos de onda de excitação e de emissão) a fim de se obter limites de detecção mais baixos para os dois compostos da classe das fluoroquinolonas (CIP e NOR). Todos os parâmetros do método cromatográfico otimizado estão mostrados na Tabela 3.

Extração em fase sólida

Baseando-se em trabalho de Blackwell *et al.* (2004), desenvolveu-se um método de SPE empregando dois cartuchos em série. O primeiro cartucho continha material sorvente de troca aniônica para retenção de matéria orgânica e o segundo continha material polimérico para retenção dos analitos. No método desenvolvido a amostra passou primeiro em um cartucho de troca aniônica, Strata SAX (Phenomenex, 500 mg), e depois em um cartucho com característica lipofílica-hidrofílica, OASIS HLB (Waters, 500 mg). Para a realização do

procedimento de extração SPE empregou-se um sistema para acondicionamento dos cartuchos desenvolvido por Sodr e *et al.* (2010). A Figura 13 mostra a montagem dos cartuchos no sistema de extra o.

Tabela 3 – Características do método cromatográfico empregado na separa o e determina o dos antibióticos por HPLC-DAD-FL.

Coluna cromatográfica	Synergi, Fusion-RP C-18, 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 4 �m de diâmetro de partícula (Phenomenex)
Pré-coluna	Synergi, Fusion-RP, 3 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 4 �m de diâmetro de partícula (Phenomenex)
Fase móvel A	�gua Milli-Q acidificada com ácido fosfórico (pH 2,4)
Fase móvel B	Acetonitrila
Gradiente	0-8 min: 0% B 8-16 min: 0 a 10% B 16-35 min: 10% B 35-55 min: 10 a 100% B 55-60 min: 100% B 60-70 min: 100 a 0% B
Vazão da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de inje�o	20 �L
Faixa de comprimento de onda de detec�o (nm)	225-400
Comprimento de onda de excita�o (nm)	278
Comprimento de onda de emissão (nm)	445

O processo de análise iniciou-se com a filtra o de 1 L da amostra em membrana de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45  m. Depois a amostra teve seu pH ajustado através da adi o de ácido clorídrico até o valor de pH de 2,4, seguido da adi o de 0,2 g de Na₂EDTA. Realizada essa etapa do preparo da amostra, ela foi eluída nos cartuchos de SPE, como mostrado na Figura 13. Os cartuchos foram condicionados com 6 mL de metanol, 6 mL de  gua Milli-Q e 6 mL de  gua Milli-Q acidificada com ácido clorídrico (pH 2,4). A amostra foi passada pelos cartuchos a uma vazão aproximada de 10 mL min⁻¹. Após a passagem da amostra, retirou-se o cartucho de troca aniônica do sistema e secou-

se o cartucho polimérico com fluxo de nitrogênio por 20 min. A eluição dos compostos foi realizada com uma única alíquota de 6 mL de metanol. Esse extrato foi deixado sob fluxo de nitrogênio até secar, redissolvido com 500 μ L de metanol e analisado por HPLC seguindo o método descrito na Tabela 3.



Figura 13 – Esquema da montagem dos cartuchos de SPE e fotografia do sistema montado. A – cartucho de troca aniônica. B – Cartucho polimérico.

Desenvolvimento do método analítico empregando SPE e LC-MS/MS

Método cromatográfico

Em face das dificuldades encontradas empregando-se HPLC-UV/DAD-FL, foi desenvolvido um método de determinação dos antibióticos empregando-se LC-MS/MS. Foi utilizado um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com uma bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado

acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolar, modelo 6410B da Agilent. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 μm , Agilent) a 35 $^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi constituída de água Milli-Q (A) e metanol (B), previamente filtrados em membranas com 0,2 μm de porosidade, contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Foram testados poucos gradientes da fase móvel uma vez que não há a necessidade de uma separação eficiente dos compostos na coluna já que o espectrômetro de massas *in tandem* quantifica separadamente compostos que coeluem. Portanto, a composição final do gradiente, em função da concentração do solvente B, foi a seguinte: 10% por 4 min e aumento para 100% em 6 min. Esta composição foi mantida por 3 min. Entre cada corrida cromatográfica o sistema foi mantido à 10% de B por 7 min para recondicionamento da coluna. O tempo total de cada corrida cromatográfica, a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} , foi de 20 min incluindo-se o tempo destinado ao condicionamento da coluna.

A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo equipado com bomba de vácuo auxiliar operando na cela de colisão (configuração chamada pelo fabricante de *Hot Box*). Os analitos foram ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo positivo. Nitrogênio ultrapuro foi utilizado na cela de colisão e como gás de arraste/secagem a uma vazão de 10 L min^{-1} (350 $^{\circ}\text{C}$) e a pressão do nebulizador foi fixada em 55 psi.

Alguns parâmetros relativos ao espectrômetro de massas tiveram de ser otimizados. O primeiro parâmetro foi a voltagem do fragmentador, que é uma região compreendida entre o capilar de entrada dos íons após a fonte de ionização e o cone de entrada localizado antes do primeiro quadrupolo. Essa voltagem do fragmentador é na realidade a diferença de potencial elétrico entre o capilar e o cone. O segundo parâmetro foi a energia de colisão aplicada no segundo quadrupolo associada a cada transição monitorada. Tanto a voltagem do fragmentador como a energia de colisão são parâmetros específicos de cada transição. Com esses dois parâmetros otimizados para todas as transições, otimizou-se a voltagem aplicada ao capilar de entrada dos íons após a fonte de

ionização. Esse parâmetro não é específico de cada transição e seu valor foi otimizado em 2200 V. A Tabela 4 mostra as transições empregadas para quantificação e confirmação dos analitos bem como os parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para a quantificação. A quantificação dos analitos foi realizada por calibração externa. O desenvolvimento do método para a determinação dos compostos de interesse é discutido, com detalhes, na seção de Resultados e Discussão.

Tabela 4 – Tempo de retenção dos compostos, transições monitoradas, voltagem do fragmentador e energia de colisão.

Composto	t _R (min)	Fragmentador (V)	Transição	Energia de colisão (V)
AMX	0,9	90	366,1→114,1	25
			366,1→208,1	5
TMP	3,9	130	291,2→230,2	20
			291,2→261,1	20
TET	5,3	110	445,2→410,2	12
			445,2→427,3	5
SMX	5,8	100	254,1→156,0	10
			254,1→92,1	20
CEF	6,5	90	348,2→158,1	5
			348,2→174,0	5
AMP	7,5	100	350,1→106,2	15
			350,1→174,1	10
NOR	7,7	110	320,2→302,2	15
			320,2→231,1	40
CIP	8,2	110	332,2→314,2	15
			332,2→231,1	35

Extração SPE in tandem

A extração dos analitos das amostras visando a quantificação dos antibióticos por LC-MS/MS foi realizada seguindo o método de SPE *in tandem* desenvolvido anteriormente, baseado no trabalho de Blackwell *et al.* (2004). Foi realizada somente uma mudança no método proposto anteriormente: a

redissolução do extrato final foi realizada com 1 mL da fase móvel inicial (10% de B) ao invés de 500 µL de metanol. Foram extraídas duas amostras de água Milli-Q contendo 50 ng L⁻¹ e 500 ng L⁻¹ de cada um dos oito antibióticos para verificar a recuperação dos compostos no método proposto.

Aplicação do método proposto em amostras do rio Atibaia

Após o desenvolvimento do método analítico, a próxima etapa do trabalho foi sua aplicação na determinação dos antibióticos em amostras reais coletadas ao longo do rio Atibaia a fim de se avaliar a qualidade das águas desse corpo aquático. Foram realizadas duas campanhas de amostragem em períodos distintos do ciclo hidrológico do rio. Além disso, foram avaliadas as concentrações dos antibióticos nas águas do rio Atibaia em um ponto específico ao longo de 24 h através de coletas de amostras a cada 4 h. Avaliou-se também a concentração desses compostos ao longo de uma semana através de amostras coletadas diariamente.

Descontaminação da vidraria de coleta

Os frascos de vidro âmbar utilizados nos procedimentos de coleta de água superficial foram previamente lavados com água e detergente, enxaguados três vezes com água destilada, três vezes com água desionizada, duas vezes com álcool comercial e uma vez com acetona, grau pesticida. Após secos, os frascos foram mantidos a 400°C por 4 h para eliminar eventuais resíduos de compostos orgânicos. Descontaminados, os frascos foram vedados com papel alumínio e armazenados até o momento da coleta.

Pontos amostrais

Amostras de água superficial foram coletadas em três pontos do rio Atibaia com a finalidade de se determinar a possível presença e a concentração dos

antibióticos nesse curso d'água. A Figura 14 mostra a localização desses pontos ao longo do rio, enquanto a Figura 15 mostra imagens dos locais de amostragem. As coordenadas geográficas são apresentadas na Tabela 5.

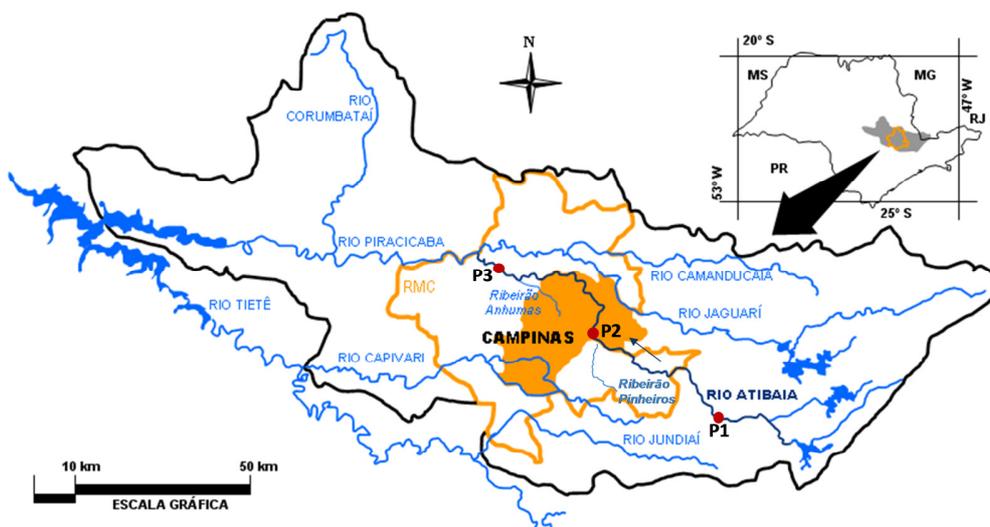


Figura 14 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia. A seta indica a direção do curso d'água.

O primeiro ponto amostral (P1) está localizado na estação de captação de água da cidade de Atibaia. Esse ponto faz parte da rede de monitoramento da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). O segundo ponto (P2) localiza-se ao lado da estação de captação de água do município de Campinas. A ideia inicial era realizar a amostragem dentro da estação, mas devido à negativa de acesso da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA), empresa responsável pelo serviço de fornecimento de água e esgotamento sanitário de Campinas, a coleta teve de ser realizada cerca de 100 m à montante do ponto de captação de água desse município. O terceiro ponto (P3) está localizado sob a ponte da rodovia SP-332 e localiza-se à jusante do aporte do ribeirão Anhumas, um corpo d'água notoriamente impactado por esgoto doméstico. Esse ponto também faz parte da rede de monitoramento da CETESB.



Figura 15 – Imagens dos pontos amostrais. (A) Estação de captação de água de Atibaia (Junho, 2009); (B) Ao lado da estação de captação de água de Campinas (Agosto, 2006); (C) Ponte da rodovia SP-332 (Fevereiro, 2006).

Tabela 5 – Coordenadas globais dos três pontos amostrais ao longo do Rio Atibaia.

Ponto Amostrai	Localização	Coordenada Sul	Coordenada Oeste
P1	Captação Atibaia	23°06'14"	46°32'44"
P2	Captação Campinas	22°54'14"	46°58'27"
P3	SP-332	22°44'44"	47°09'34"

Procedimentos de coleta

Em cada ponto, cerca de 1 L de amostra de água foi coletada em frasco de vidro âmbar. Antes da coleta, todos os frascos foram ambientados com a própria água a ser coletada. A amostragem foi realizada por, pelo menos, duas pessoas sendo que uma foi responsável pelo manuseio dos materiais que não entram em contato direto com a amostra e a outra que manipulou somente os materiais destinados a receber a mesma.

Após a coleta, os frascos contendo as amostras foram selados com papel alumínio, tampados, embalados em dois sacos plásticos, rotulados e acondicionados em caixa de isopor para transporte. Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas nitrílicas limpas para evitar a contaminação das amostras. No laboratório, as amostras foram preservadas em refrigerador a 4°C, por no máximo 3 dias, até a realização dos procedimentos de extração dos compostos-alvos.

Campanhas de amostragem

Foram realizadas duas campanhas de amostragem compreendendo os três pontos amostrais mostrados no mapa da Figura 14. Essas campanhas foram realizadas em 08 de junho de 2009, visando obter dados sobre a concentração dos antibióticos nas águas do rio Atibaia em um período de seca, e em 30 de março de 2010, representando um período de cheia do rio Atibaia.

Obtenção de um perfil 24 h dos antibióticos

Amostras de água do Rio Atibaia foram coletadas no ponto amostral número 2 (P2), localizado ao lado da Estação de Captação de água da cidade de Campinas. Foram realizadas amostragens a cada 4 h durante um período de 24 h, totalizando seis amostragens. A amostragem iniciou-se às 16 h do dia 22 de novembro de 2010 e terminou às 12 h do dia seguinte seguindo os procedimentos descritos anteriormente. Após coletadas, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, filtradas em filtros de fibra de vidro e em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm . Ajustou-se o pH de 1 L de amostra filtrada para 2,4 através da adição de ácido clorídrico e realizou-se o procedimento de análise desenvolvido.

Obtenção de um perfil semanal dos antibióticos

Amostras de água do rio Atibaia foram coletadas diariamente no P2 ao longo de uma semana com o intuito de se avaliar a variação da concentração dos antibióticos durante os dias da semana. A coleta iniciou-se no dia 25 de janeiro de 2010 e terminou no dia 31 do mesmo mês. As amostras foram coletadas diariamente entre 15:30 e 16:00 seguindo o procedimento descrito anteriormente e analisadas de acordo com o método desenvolvido.

Aplicação de MIP na extração SPE de fluoroquinolonas em amostras da bacia do Rio Atibaia

Os polímeros de impressão molecular aparecem como uma alternativa promissora como material sorvente em processos de extração em fase sólida. Devido à seletividade na extração são obtidos extratos mais limpos, sem a presença de substâncias interferentes que prejudicam a quantificação dos analitos.

Com a ideia de se avaliar a eficiência dos MIP em amostras naturais de águas superficiais, estabeleceu-se uma parceria entre o Laboratório de Química Ambiental (LQA) do Instituto de Química da UNICAMP e o Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Complutense de Madri. Nessa cooperação, foram fornecidos ao LQA os MIP sintetizados pelo GSOLFA específicos para a extração de compostos da classe das fluoroquinolonas de matrizes aquosas (Benito-Peña *et al.*, 2008) para a quantificação de CIP e NOR em amostras de água superficiais da bacia do Rio Atibaia.

Pontos amostrais

Amostras de água do rio Atibaia e de dois de seus afluentes (ribeirões Pinheiros e Anhumas) foram coletadas no dia 27 de julho de 2009 para se determinar a concentração das fluoroquinolonas ciprofloxacino e norfloxacino nessas amostras. Os pontos amostrais para essa campanha foram diferentes dos mostrados na Figura 13. Para essa campanha, os pontos amostrais foram concentrados na região do município de Campinas e visaram observar o impacto de dois afluentes impactados por efluentes de ETE e esgoto bruto (CETESB, 2010) na qualidade das águas do rio Atibaia com relação à concentração das fluoroquinolonas.

Foram coletadas amostras de água do rio Atibaia em três pontos ao longo do seu curso e em dois de seus afluentes. O primeiro ponto (MIP 1) localiza-se no

Rio Atibaia à montante do aporte do ribeirão Pinheiros e é um ponto de monitoramento rotineiro da CETESB. O segundo ponto (MIP 2) localiza-se no Ribeirão Pinheiros, cerca de 50 m à montante do seu aporte no Rio Atibaia. O terceiro ponto (MIP 3) localiza-se no Rio Atibaia ao lado da estação de captação de água de Campinas, cerca de 1.000 m à jusante do aporte do Ribeirão Pinheiros ao rio Atibaia. O quarto ponto de coleta (MIP 4) encontra-se no Ribeirão Anhumas. Por fim, coletou-se uma amostra de água do Rio Atibaia sob a ponte da rodovia SP-332 (MIP 5) para avaliar o impacto do ribeirão Anhumas na qualidade da água do rio Atibaia. A Figura 16 mostra a localização dos pontos onde foram coletadas amostras enquanto a Tabela 6 fornece as coordenadas globais dos pontos amostrais.



Figura 16 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia e dos seus afluentes, os ribeirões Pinheiros e Anhumas. As setas indicam as direções dos cursos d'água.

Os procedimentos de coleta foram os mesmos já descritos anteriormente para as amostras coletadas ao longo do rio Atibaia. Após coletadas, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, filtradas em filtros de fibra de vidro e

em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm e extraídas seguindo o procedimento de extração descrito anteriormente.

Tabela 6– Coordenadas globais dos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.

Ponto Amostral	Localização	Coordenada Sul	Coordenada Oeste
MIP1	Rio Atibaia	22°54'40"	46°57'22"
MIP2	Ribeirão Pinheiros	22°54'53"	46°57'39"
MIP3	Rio Atibaia	22°54'14"	46°58'27"
MIP4	Ribeirão Anhumas	22°46'10"	47°05'42"
MIP5	Rio Atibaia	22°44'44"	47°09'34"

Procedimento de extração

As amostras foram previamente filtradas em filtros de fibra de vidro e em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm . Após filtradas, adicionaram-se 2,6 g de Na(HEPES) a 100 mL de amostra e o pH foi ajustado para 7,5 através da adição de HCl. O cartucho de SPE foi preparado no laboratório preenchendo-o com 150 mg do MIP fornecido. O condicionamento do cartucho foi realizado através da passagem de 10 mL de solução tampão com pH 7,5 preparada com 0,1 mol L⁻¹ de HEPES. Após o condicionamento, a amostra tamponada foi passada pelo cartucho a uma vazão aproximada de 2,5 mL min⁻¹. Compostos retidos em sítios não específicos do MIP foram extraídos com a passagem de 5 mL de uma solução 10:90 (v:v) de acetonitrila:tampão HEPES. A eluição das fluoroquinolonas foi realizada através da percolação de 1 mL de metanol contendo 2% (v:v) de ácido trifluoroacético (TFA). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e redissolvido com 1 mL da fase móvel inicial da análise cromatográfica. Antes de uma nova extração o cartucho foi percolado a uma vazão aproximada de 5 mL min⁻¹ com 10 mL de metanol contendo 2% de TFA, 20 mL de metanol e 20 mL do tampão HEPES.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos voltados para a determinação de compostos orgânicos em matrizes complexas apresenta, geralmente, grandes dificuldades relacionadas à minimização dos efeitos dos constituintes da matriz. Inicialmente, a quantificação dos antibióticos nas amostras de água superficiais seria realizada por HPLC-DAD-FL. No entanto, a interferência da matéria orgânica presente nas amostras inviabilizou o emprego do método desenvolvido na determinação dos antibióticos. Os resultados aqui mostrados são somente uma pequena amostra do trabalho realizado e das dificuldades encontradas empregando essa técnica cromatográfica com os tipos de detecção mencionados.

Com a aquisição de um LC-MS/MS pelo LQA, desenvolveu-se um método analítico voltado para quantificação dos mesmos compostos por essa técnica, que apresenta, notadamente, maior capacidade de quantificar concentrações menores sem grande interferência da matriz e com grande confiabilidade.

Escolha dos Antibióticos

Definiu-se que os compostos que seriam alvos desse trabalho seriam os antibióticos que apresentassem maior consumo pela população brasileira. Iniciou-se a procura por tal informação através de contatos realizados com diversos setores da ANVISA e alguns órgãos não-governamentais, tais como o Conselho Regional de Farmácia (CRF) e a Federação Brasileira das Indústrias Farmacêuticas (FEBRAFARMA).

O Núcleo de Assessoramento Econômico em Regulação da ANVISA (NUREM-ANVISA) forneceu uma lista que continha o consumo de antibióticos no Brasil nos anos de 2004 e 2005, como mencionado anteriormente na página 30, mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantidade de cada antibiótico consumida (kg) no Brasil nos anos de 2004 e 2005.

continua

FORMULAÇÃO	PRINCÍPIO ATIVO	MERCADO TOTAL	
		2004	2005
MONODROGA ¹	Amicacina	1.281	677
MONODROGA	Amoxicilina	412.143	368.647
MONODROGA	Ampicilina	218.094	181.491
MONODROGA	Axetilcefuroxima	1.165	1.080
MONODROGA	Azitromicina	11.862	16.646
MONODROGA	Aztreonam	204	187
MONODROGA	Benzilpenicilina	22.160	26.061
MONODROGA	Cefaclor	3.691	4.713
MONODROGA	Cefadroxila	6.884	7.021
MONODROGA	Cefalexina	151.919	162.653
MONODROGA	Cefalotina	25.931	24.523
MONODROGA	Cefazolina	8.130	10.170
MONODROGA	Cefepima	3.644	4.635
MONODROGA	Cefixima	0,4	-
MONODROGA	Cefotaxima	461	450
MONODROGA	Cefoxitina	532	330
MONODROGA	Cefpodoxima	1	0
MONODROGA	Cefprozila	87	70
MONODROGA	Ceftazidima	1.620	1.825
MONODROGA	Ceftriaxona	9.453	13.160
MONODROGA	Cefuroxima	585	563
MONODROGA	Ciprofloxacino	27.125	30.282
MONODROGA	Claritromicina	3.213	3.358
MONODROGA	Clindamicina	3.584	3.661
MONODROGA	Cloranfenicol	9.958	10.082
MONODROGA	Dapsona	68	2
MONODROGA	Doxiciclina	1.793	2.151
MONODROGA	Eritromicina	19.927	20.563
MONODROGA	Ertapeném	52	79
MONODROGA	Espectinomomicina	-	-
MONODROGA	Espiramicina	1.330	1.461
MONODROGA	Estreptomicina	375	331
MONODROGA	Etambutol	82	78
MONODROGA	Etionamida	-	168
MONODROGA	Fenoximetilpenicilina	10.302	11.622
MONODROGA	Gatifloxacino	894	660
MONODROGA	Gentamicina	899	938
MONODROGA	Isoniazida	4	-
MONODROGA	Levofloxacino	5.215	6.451
MONODROGA	Limeciclina	341	649
MONODROGA	Lincomicina	2.592	2.155
MONODROGA	Linezolida	76	85
MONODROGA	Lomefloxacino	65	54
MONODROGA	Meropeném	1.051	1.510
MONODROGA	Minociclina	141	123
MONODROGA	Moxifloxacino	292	377
MONODROGA	Norfloxacino	33.596	38.431
MONODROGA	Ofloxacino	49	86

Tabela 7 – Quantidade de cada antibiótico consumida (kg) no Brasil nos anos de 2004 e 2005.

conclusão

FORMULAÇÃO	PRINCÍPIO ATIVO	MERCADO TOTAL	
		2004	2005
MONODROGA	Oxacilina	7.879	7.316
MONODROGA	Oxitetraciclina	3.611	1.664
MONODROGA	Pefloxacino	14	1
MONODROGA	Pirazinamida	4.180	6.690
MONODROGA	Polimixina b	-	42
MONODROGA	Rifamicina	18	-
MONODROGA	Rifamida	-	-
MONODROGA	Rifampicina	345	448
MONODROGA	Rosoxacino	8	14
MONODROGA	Roxitromicina	457	307
MONODROGA	Sulfadiazina	15.878	13.945
MONODROGA	Sultamicilina	1.099	968
MONODROGA	Teicoplanina	69	94
MONODROGA	Telitromicina	86	25
MONODROGA	Tetraciclina	49.385	45.416
MONODROGA	Tianfenicol	1.882	2.192
MONODROGA	Tobramicina	-	2
MONODROGA	Vancomicina	6.842	2.345
ASSOCIAÇÃO ²	Amoxicilina	24.236	21.654
ASSOCIAÇÃO	Ampicilina	2.840	2.975
ASSOCIAÇÃO	Benzilpenicilina	1.913	2.124
ASSOCIAÇÃO	Cilastatina sódica	971	1.209
ASSOCIAÇÃO	Clavulanato de potássio	5.214	4.623
ASSOCIAÇÃO	Eritromicina	440	361
ASSOCIAÇÃO	Espiramicina	276	270
ASSOCIAÇÃO	Imipeném	971	1.209
ASSOCIAÇÃO	Isoniazida	1.765	783
ASSOCIAÇÃO	Lisozima	35	29
ASSOCIAÇÃO	Metronidazol	138	135
ASSOCIAÇÃO	Piperacilina	13.556	5.040
ASSOCIAÇÃO	Probenecida	101	108
ASSOCIAÇÃO	Rifampicina	2.647	1.175
ASSOCIAÇÃO	Sulbactam	1.153	1.406
ASSOCIAÇÃO	Sulfadiazina	677	507
ASSOCIAÇÃO	Sulfametoxazol	125.454	133.174
ASSOCIAÇÃO	Tazobactama	1.695	630
ASSOCIAÇÃO	Ticarcilina sódica	115	128
ASSOCIAÇÃO	Trimetoprim	25.239	26.746

Fonte: Elaborada pela ANVISA a partir da base de dados da Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos - CMED.

Nota: 1 – O termo “monodroga” refere-se a medicamento que contém somente o princípio ativo.

2 – O termo “associação” refere-se a medicamento que contém mais de um princípio ativo.

A partir dos valores da Tabela 7 foram estabelecidos os antibióticos contemplados nesse estudo. Foram escolhidos sete compostos levando em consideração o maior consumo nos anos de 2004 e 2005: amoxicilina, ampicilina, cefalexina, ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, sulfametoxazol. O trimetoprim foi incluído na lista de analitos já que parte de sua quantidade consumida é empregada em conjunto com o sulfametoxazol.

A abordagem de escolha dos analitos seguindo as quantidades consumidas apresenta um ponto a ser considerado. O consumo dos antibióticos pode sofrer variações regionais já que um país com as dimensões e desigualdades sociais brasileiras apresenta enfermidades regionalizadas. Dessa forma, determinado antibiótico pode ser mais consumido em uma região do país e apresentar baixo consumo na região de Campinas considerada nesse trabalho.

Outro ponto que merece atenção é com relação aos dados em si fornecidos pela NUREM-ANVISA. Os dados foram repassados informando que eram valores relativos à quantidade consumida dos antibióticos nos anos de 2004 e 2005. No entanto, não há como saber se esses dados foram obtidos através da quantidade comercializada nas farmácias, da quantidade prescrita dos medicamentos ou produzida pelas empresas. Caso os dados sejam relativos à quantidade prescrita, os valores reais consumidos podem ser bastante diferentes dos apresentados na Tabela 7 já que a prática da comercialização de medicamentos sem prescrição médica era comum na época coberta pelos dados.

Desenvolvimento do Método Analítico por SPE e HPLC-DAD-FL

Inicialmente, esse trabalho propunha a determinação de várias classes de antibióticos empregando HPLC com detecção por DAD e fluorescência molecular. Para que fosse possível tal determinação empregando esses detectores era essencial uma separação cromatográfica eficiente. Foram testadas três colunas cromatográficas contendo diferentes fases estacionárias e diversas composições de fase móvel para cada coluna avaliada. No final, chegou-se a um método em

que foi possível separar cromatograficamente seis dos oito analitos. Ampicilina e cefalexina coeluíram com tempos de retenção de 24,8 e 25,0 min, respectivamente. A Figura 17 mostra um cromatograma obtido por DAD para um padrão contendo 5 mg L⁻¹ de cada um dos oito antibióticos após a otimização da separação cromatográfica empregando HPLC. Curvas analíticas foram construídas para cada um dos seis compostos possíveis de quantificação a fim de verificar a linearidade do método cromatográfico. A Tabela 8 mostra alguns parâmetros obtidos para a quantificação de cada um dos antibióticos estudados.

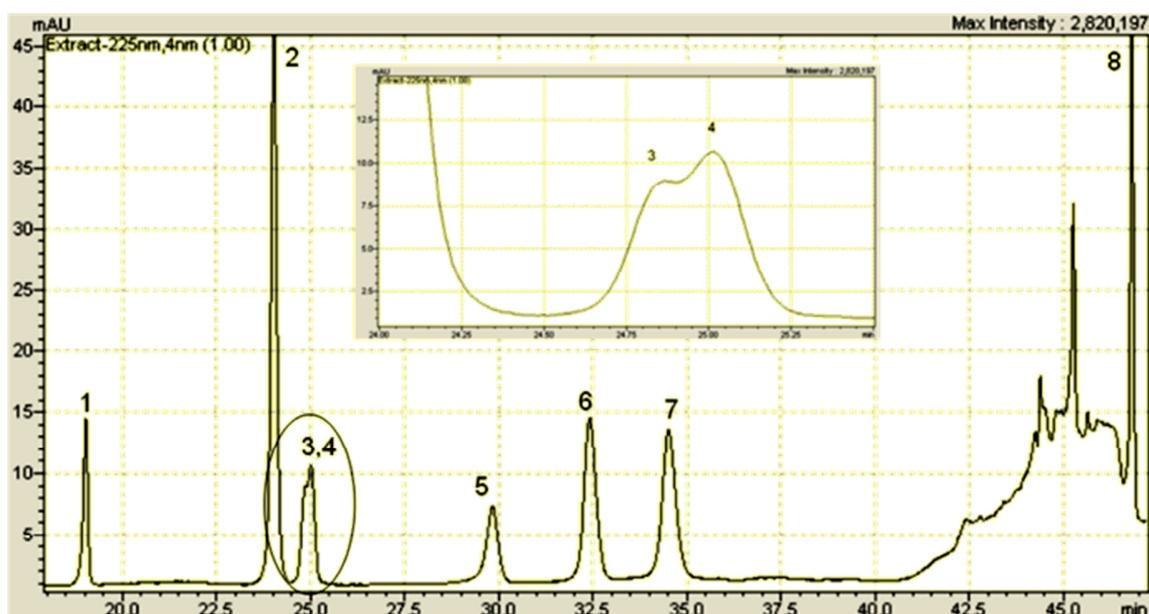


Figura 17 – Região do cromatograma obtido por HPLC-DAD para um padrão 5 mg L⁻¹ contendo os oito antibióticos. 1-Amoxicilina, 2-Trimetoprima, 3-Ampicilina, 4-Cefalexina, 5-Tetraciclina, 6-Norfloxacino, 7-Ciprofloxacino e 8-Sulfametoxazol. A região destacada é mostrada com aumento evidenciando a coeluição da ampicilina e da cefalexina.

Tabela 8 – Parâmetros utilizados na quantificação dos antibióticos.

Composto	t _r (min)	λ _{MÁX} (nm)	Faixa linear (mg L ⁻¹)	r ²
Amoxicilina	19,0	230	0,1-5	0,9991
Trimetoprima	24,0	271	0,05-5	0,9982
Tetraciclina	29,8	269	0,05-5	0,9975
Norfloxacino	32,4	278	0,05-2,5	0,9961
Ciprofloxacino	34,5	278	0,05-2,5	0,9954
Sulfametoxazol	46,8	269	0,05-5	0,9997

A matéria orgânica presente em águas superficiais interfere significativamente em análises cromatográficas que envolvem detecção por UV ou por fluorescência molecular (Speltini *et al.*, 2010). Para eliminar essa interferência de tal maneira que fosse possível empregar o método cromatográfico desenvolvido era necessário diminuir a concentração dessa matéria orgânica antes da passagem da amostra por um cartucho de SPE. Blackwell *et al.* (2004) desenvolveram um método de extração de antibióticos baseado na retenção da matéria orgânica presente na matriz em um cartucho de SPE cuja fase estacionária era de troca aniônica e na retenção dos analitos em um cartucho com fase estacionária propícia para esse fim. A passagem da amostra pelos cartuchos foi realizada em uma única operação. Para tanto, os cartuchos foram acondicionados sequencialmente (*in tandem*) de forma que a amostra passasse primeiro pelo cartucho de troca aniônica, retendo a matéria orgânica, e depois pelo cartucho próprio para retenção dos analitos. Com base nesse trabalho, desenvolveu-se um método de SPE *in tandem* empregando um cartucho Strata SAX para retenção da matéria orgânica e um cartucho OASIS HLB para retenção dos analitos.

O pH da amostra durante sua passagem por um sistema de SPE é uma variável importante. Foram avaliados dois valores de pH empregando o sistema de SPE desenvolvido. A Tabela 9 mostra as recuperações obtidas para a extração de soluções contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos antibióticos em água Milli-Q em dois valores de pH. Os resultados não mostram uma diferença significativa na recuperação de cinco antibióticos (TMP, TET, NOR, CIP e SMX) entre os dois valores de pH avaliados. Somente AMX apresentou uma diferença expressiva entre os dois estudos. Observou-se uma recuperação próxima a 30% para o pH 2,4 enquanto o pH 4,0 apresentou uma recuperação de 2%. Dessa forma, definiu-se como necessário ajustar o pH da amostra para o valor de 2,4 através da adição de HCl antes de iniciar o procedimento de extração.

O método proposto foi submetido a uma avaliação através da extração de uma amostra de água do ribeirão Anhumas contaminada em laboratório com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos antibióticos. A Figura 18 mostra duas regiões do cromatograma obtido para o extrato dessa amostra. Dentre os seis analitos

contemplados pelo método somente dois antibióticos, TMP e SMX, puderam ser identificados através do t_R e do comprimento de onda máximo de absorção. Nenhum dos outros quatro compostos puderam ser identificados no extrato de amostra de água superficial devido à interferência da matriz. Além dos diversos picos existentes no cromatograma obtido (Figura 18), a matéria orgânica interfere no espectro UV dos compostos eluídos, impossibilitando a visualização dos comprimentos de onda máximos de absorção dessas moléculas.

Tabela 9 – Porcentagem de recuperação em amostras de água Milli-Q contaminadas com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos.

pH	AMX	TMP	TET	NOR	CIP	SMX
2,4	28	80	98	57	65	74
4,0	2	91	109	57	58	86

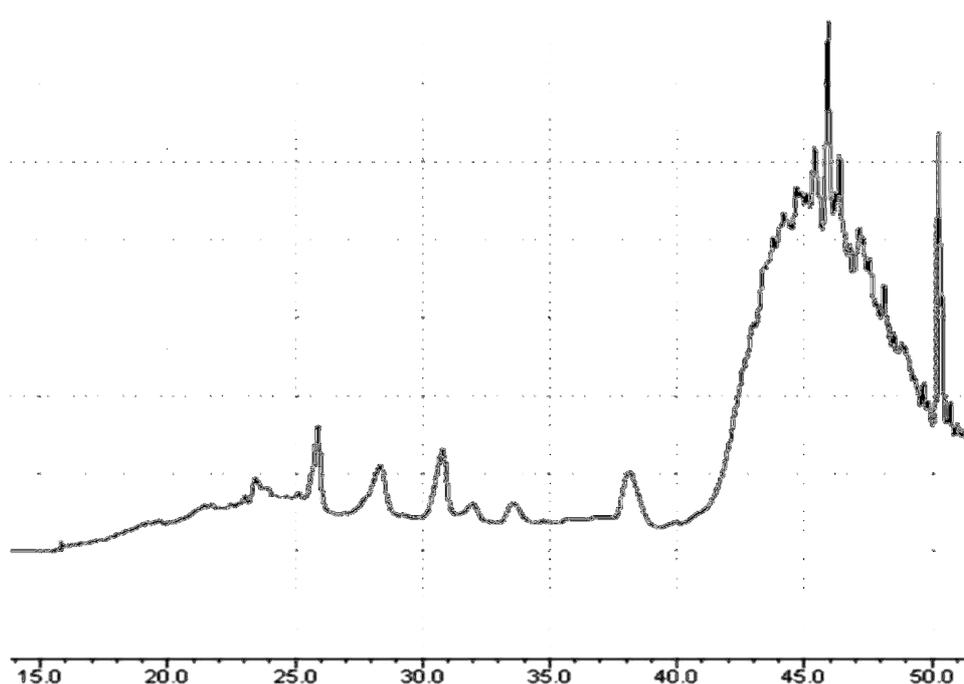


Figura 18 - Região do cromatograma obtido para a amostra do ribeirão Anhumas contaminada com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos antibióticos por HPLC-DAD.

Os resultados obtidos por HPLC-DAD-FL ilustram a dificuldade de se quantificar oito antibióticos pertencentes a seis diferentes classes em uma única

análise cromatográfica. A grande diferença nas propriedades físico-químicas dos analitos aumenta a dificuldade na elaboração de um único método multiclasse empregando HPLC-DAD-FL. Os resultados obtidos e as diversas abordagens analíticas avaliadas mostram que o emprego de HPLC-DAD-FL para o desenvolvimento de métodos multiclasse é inapropriado. Especificamente nesse caso estudado, uma alternativa para o emprego de HPLC-DAD-FL seria o desenvolvimento de várias etapas de extração e de separação cromatográfica, específicas para as classes de antibióticos avaliadas. No entanto, essa abordagem aumentaria os custos e o tempo da análise química, tornando-a inviável para uma futura aplicação rotineira.

Desenvolvimento do Método Analítico por SPE e LC-MS/MS

A partir dos inúmeros problemas já descritos referente ao método desenvolvido por HPLC-DAD-FL, desenvolveu-se um método analítico empregando separação e detecção por LC-MS/MS. Em alguns trabalhos encontrados na literatura são descritas as análises de diversas classes de antibióticos em água empregando LC-MS/MS. Hao *et al.* (2006) determinaram compostos das classes das sulfonamidas, tetraciclinas, macrolídeos, além do trimetoprim em amostras de água do Grand River, Canadá. Brown *et al.* (2006) determinaram sete classes de antibióticos em amostras de esgoto hospitalar, efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e água do Rio Grande, EUA. Xu *et al.* (2007) determinaram nove antibióticos, de cinco classes diferentes, em amostras de água do Pearl River, China e do Victoria Harbour, Hong Kong.

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 o modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). A possibilidade de quantificação dos compostos que coeluem possibilitou a obtenção de um método cromatográfico rápido, com tempo de análise de 13 min. O desenvolvimento do método de

detecção por MS/MS no modo MRM iniciou-se com a seleção dos íons precursores através da realização de uma análise no modo *scan*. Nesse modo há a obtenção de um espectro de massas do composto após a ionização pela fonte electrospray. A Figura 19 mostra o espectro de massas no modo *scan* para o CIP, enquanto a Tabela 10 mostra os íons precursores escolhidos para cada composto.

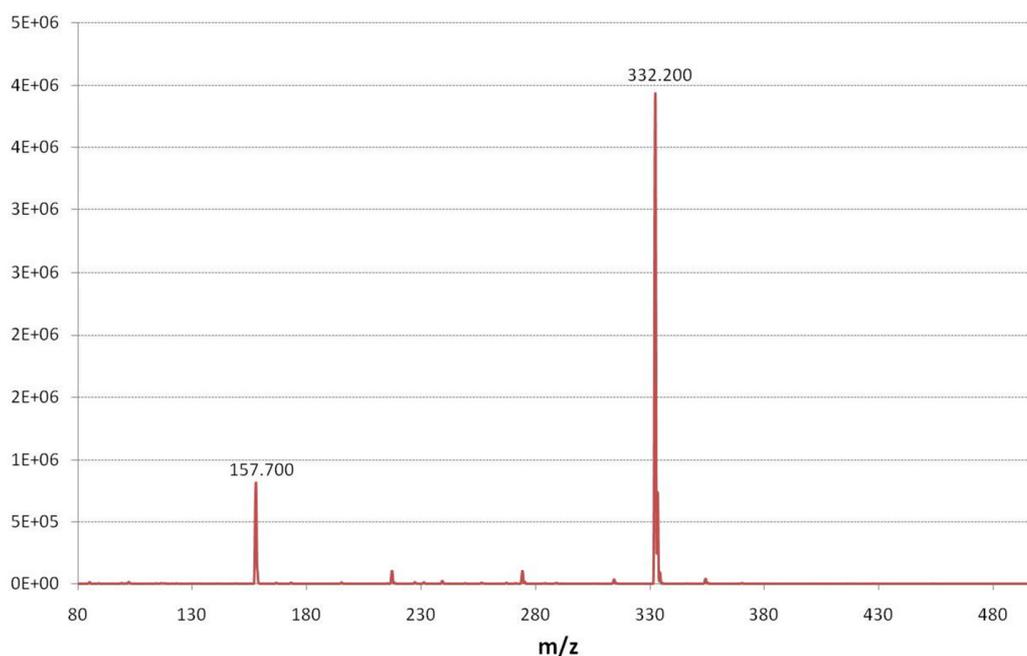


Figura 19 – Espectro de massas obtido para o ciprofloxacino no modo *scan*.

Tabela 10 - Íons precursores para os oito compostos investigados neste projeto.

Composto	Íon precursor
AMX	366,1
TMP	291,2
TET	445,2
SMX	254,1
CEF	348,2
AMP	350,1
NOR	320,2
CIP	332,2

Todos os íons precursores escolhidos representam a espécie protonada do íon molecular do analito, cuja notação empregada é $[M-H]^+$. Selecionado o íon

precursor de cada composto foi necessário otimizar a voltagem do fragmentador, que é uma região do espectrômetro de massas responsável pela fragmentação inicial da molécula após a ionização. O modo de aquisição empregado nessa etapa foi o *Selected Ion Monitoring* (SIM). Nesse modo, o espectrômetro de massas só detecta o íon selecionado. Para cada composto, selecionou-se o íon previamente escolhido na etapa anterior e variou-se a voltagem do fragmentador entre 70 V e 130 V. A Figura 20 mostra a variação da intensidade do sinal para o CIP com o aumento na voltagem do fragmentador enquanto a Tabela 11 mostra os valores otimizados da voltagem para cada composto.

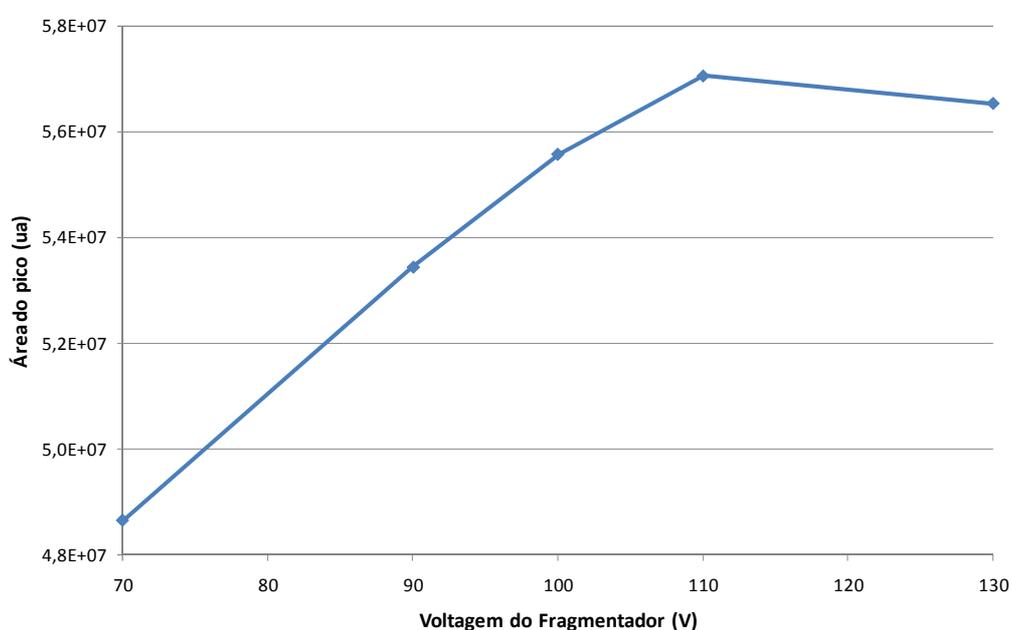


Figura 20 – Variação da intensidade do sinal do CIP para as voltagens do fragmentador.

Tabela 11 – Voltagem do fragmentador (V) para os oito compostos investigados.

Composto	Voltagem do fragmentador (V)
AMX	90
TMP	130
TET	110
SMX	100
CEF	90
AMP	100
NOR	110
CIP	110

Otimizados a voltagem do fragmentador e o íon precursor, realizou-se a fragmentação desse íon na cela de colisão para escolher os fragmentos que foram utilizados no modo MRM. O modo de aquisição empregado nessa etapa é chamado de *Product Ion*. A energia empregada na cela para gerar os fragmentos foi variada entre 5 V e 40 V. A Figura 21 mostra os espectros de massas obtidos no modo *Product Ion* para o CIP em quatro energias de colisão diferentes. Para cada composto foram escolhidos dois fragmentos, sendo o mais intenso para ser utilizado para a quantificação e o segundo para confirmação do analito. A Tabela 12 mostra os fragmentos escolhidos assim como as energias de colisão empregadas para cada analito.

Tabela 12 – Fragmentos de quantificação e de confirmação selecionados e energias de colisão para cada composto.

Composto	Quantificação		Confirmação	
	m/z	Energia de colisão (V)	m/z	Energia de colisão (V)
AMX	114,1	25	208,1	5
TMP	230,2	20	261,1	20
TET	410,2	12	427,3	5
SMX	156,0	10	92,1	20
CEF	158,1	5	174,0	5
AMP	106,2	15	174,1	10
NOR	302,2	15	231,1	40
CIP	314,2	15	231,1	35

Após a otimização dos parâmetros inerentes a cada analito, foi otimizada a voltagem do capilar responsável pela inserção dos íons gerados na fonte de ionização para o restante do espectrômetro de massas. Variou-se essa voltagem entre 1800 V e 4000 V sendo a voltagem de 2200 V a escolhida como ótima uma vez que alguns compostos apresentaram melhor desempenho com a menor voltagem e outros, com a maior. A Figura 22 mostra um cromatograma obtido para uma solução dos padrões no modo MRM com todos os parâmetros otimizados.

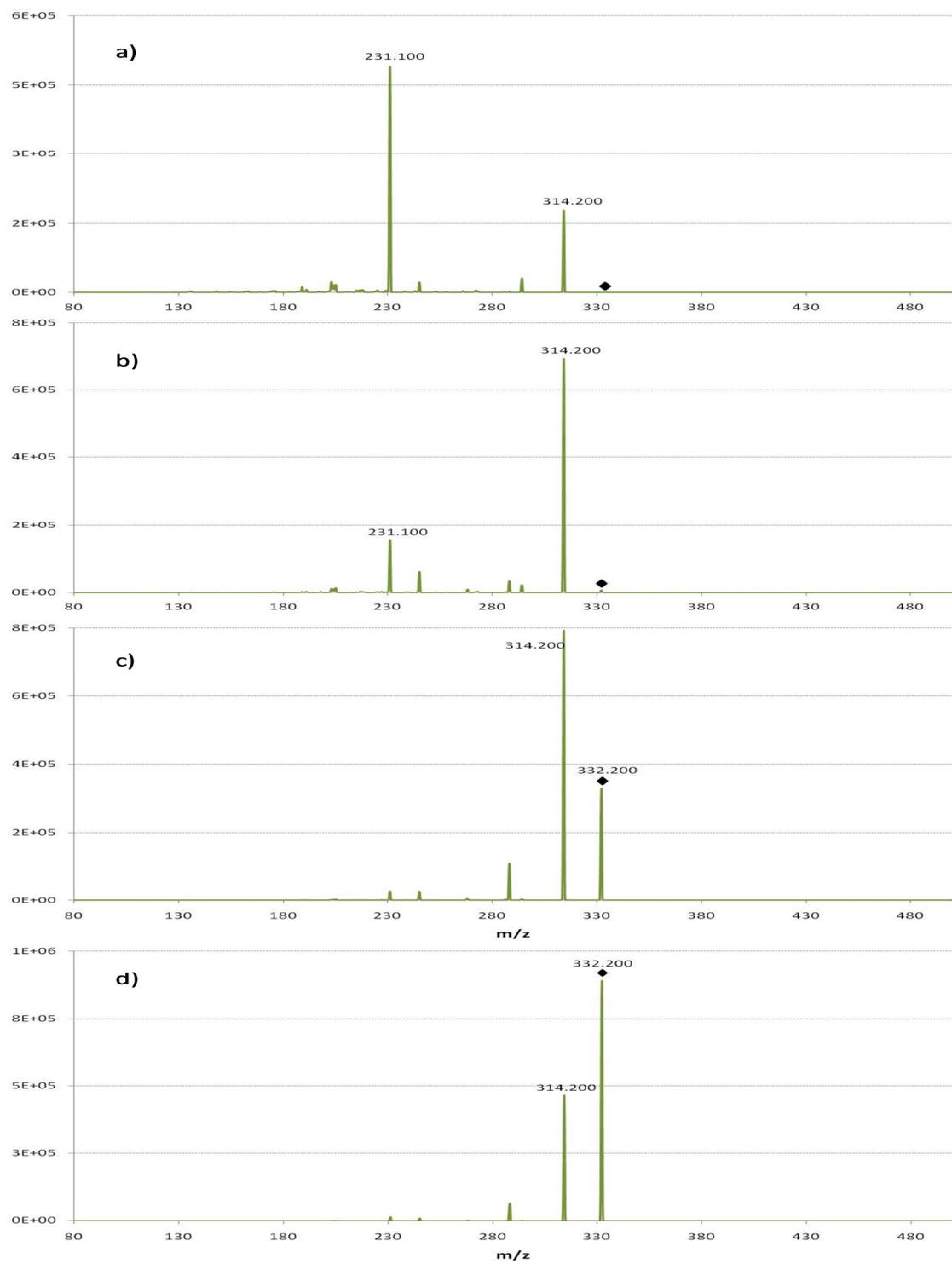


Figura 21 - Espectros de massas obtidos para CIP a partir da aplicação de diferentes energias de colisão (EC) sobre o íon precursor $[M-H]^+$ (marcado com \blacklozenge). a) EC 35 V; b) EC 25 V; c) EC 15 V; d) EC 5 V.

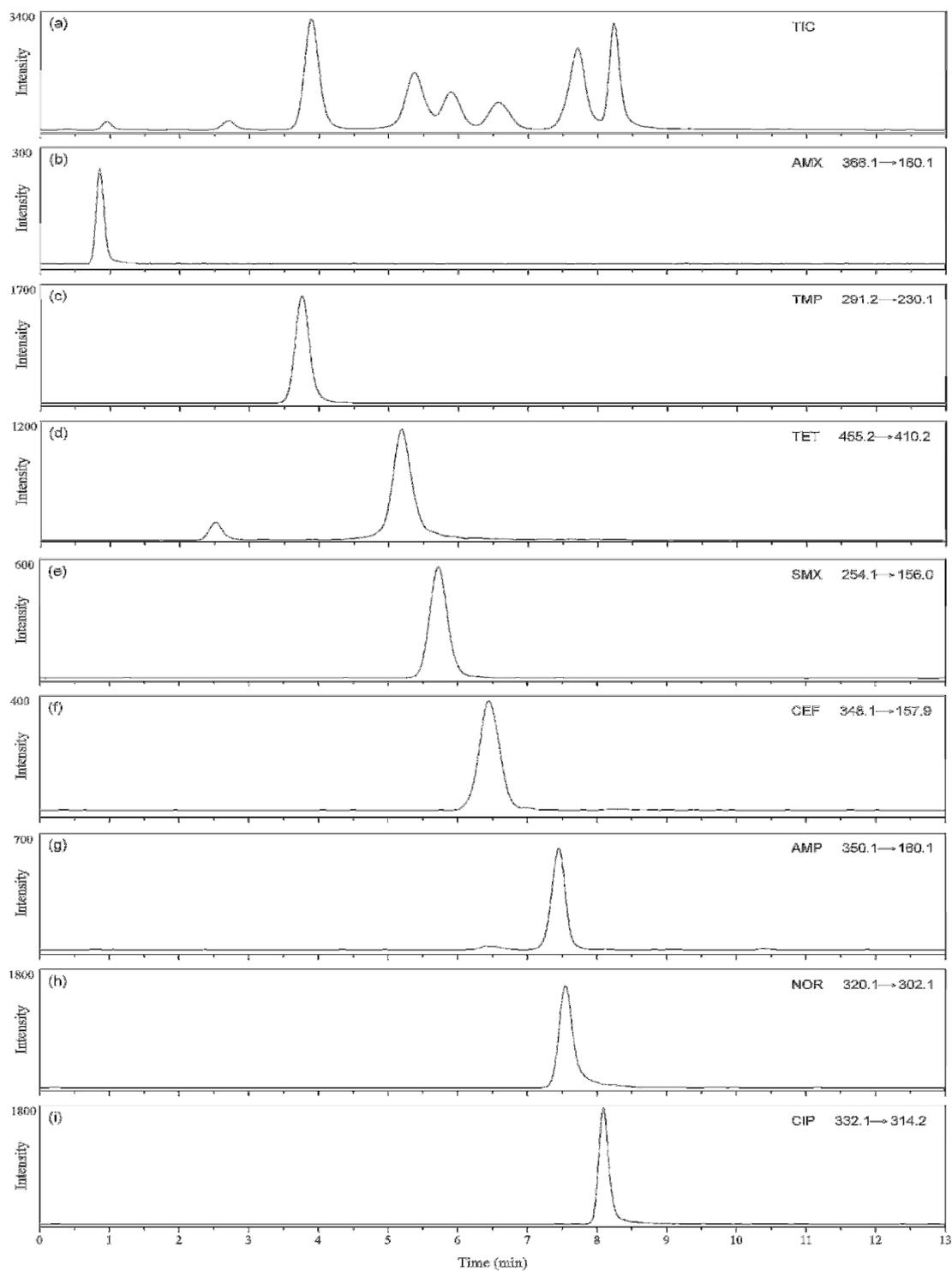


Figura 22 – Cromatogramas obtidos para um padrão dos antibióticos no modo MRM por LC-MS/MS. Cromatograma (a) total; (b) AMX; (c) TMP; (d) TET; (e) SMX; (f) CEF; (g) AMP; (h) NOR; (i) CIP.

Os cromatogramas mostrados na Figura 22 comprovam que não há a necessidade de uma separação cromatográfica eficiente para que se quantificar os analitos quando se emprega LC-MS/MS no modo MRM. Com exceção da AMX e do TMP, todos os outros antibióticos não apresentam uma separação cromatográfica eficiente. No entanto, o modo MRM permite a visualização de cada transição contemplada no método. Dessa forma, é possível integrar os picos como se não houvesse coeluição uma vez que cada analito possui uma transição MRM específica.

A Figura 22 ainda mostra que o cromatograma associado à transição da TET apresenta dois picos, sendo o primeiro de menor intensidade (t_R 2,5 min) e o segundo de maior intensidade (t_R 5,3 min). Os compostos da classe das tetraciclinas apresentam tautomerismo e epimerização (Spisso *et al.*, 2009; Cherlet *et al.*, 2006). Portanto, a TET apresenta dois epímeros, cuja diferença é a orientação do grupo $-N(CH_3)_2$ e para cada epímero há uma forma ceto e uma enol totalizando quatro possíveis configurações. As tetraciclinas sofrem epimerização em meio ácido (McCormick *et al.*, 1957) e, como o pH da fase móvel é ácido, é possível que os picos no cromatograma sejam referentes aos epímeros. A Figura 23 mostra os epímeros para a TET.

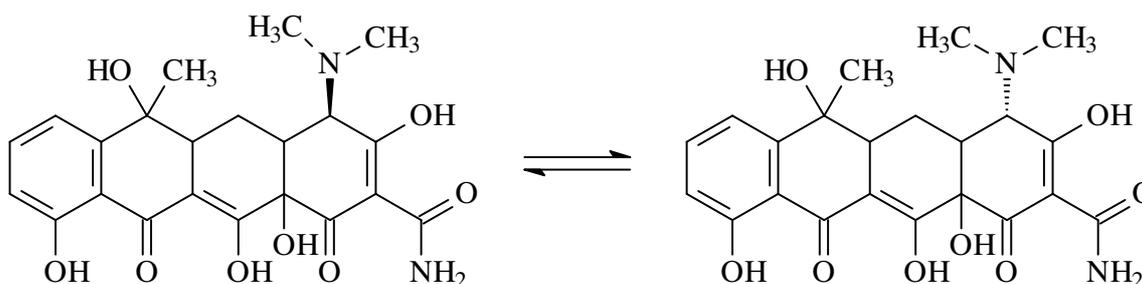


Figura 23 – Epimerização presente na molécula de tetraciclina.

Figuras de mérito

Algumas figuras de mérito foram calculadas a partir das curvas analíticas obtidas para os antibióticos. A Tabela 13 mostra alguns parâmetros empregados para a quantificação de cada um dos antibióticos estudados. O limite de detecção

(LD) do equipamento foi definido como a massa do analito correspondente a uma razão sinal/ruído (do inglês, S/N) igual a 3 vezes enquanto o limite de quantificação (LQ) do equipamento foi considerado como 10 vezes a razão S/N (Petrovic *et al.*, 2006). Os LD e LQ do equipamento foram obtidos a partir do programa controlador do equipamento. Os LD e LQ do método foram calculados a partir dos LD e LQ do equipamento considerando o fator de concentração do extrato (1000 vezes) e o volume injetado no LC (5 μ L).

Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do equipamento e do método, faixa linear e coeficientes de correlação.

Composto	LD _{equip} (pg)	LQ _{equip.} (pg)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Faixa linear (ng L ⁻¹)	r ²
AMX	2	4	0,4	0,8	0,8-1.000	0,991
TMP	0,5	1	0,1	0,2	0,2-1.000	0,999
TET	1	2	0,2	0,4	0,4-1.000	0,999
SMX	2	3	0,4	0,6	0,6-1.000	0,996
CEF	1	3	0,2	0,6	0,6-1.000	0,992
AMP	1	3	0,2	0,6	0,6-1.000	0,997
NOR	1	3	0,2	0,6	0,6-1.000	0,997
CIP	2	3	0,4	0,6	0,6-1.000	0,990

Nota: Para cada composto foram construídas três curvas analíticas contemplando toda a faixa linear. O coeficiente de correlação mostrado corresponde à curva analítica para as menores concentrações.

Os LD e LQ do método podem ser considerados extremamente baixos quando comparados com outros trabalhos da literatura que usam a mesma técnica analítica. Sacher *et al.* (2001) obtiveram LD do método 10 vezes superior aos mostrados na Tabela 12 para TMP e SMX. Os LD obtidos por Senta *et al.* (2008) para SMX, TMP, NOR e CIP são de 25 a 100 vezes superiores aos mostrados na Tabela 13. Os LD e LQ obtidos nesse trabalho apresentam-se na mesma ordem de magnitude ou são até mesmo inferiores aos limites obtidos por UPLC (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), técnica que apresenta limites de detecção usualmente menores que HPLC. Tamtam *et al.* (2009) obtiveram LD para SMX e TMP na mesma ordem de magnitude dos mostrados na Tabela 13. Já os limites obtidos por Tamtam e colaboradores para CIP e NOR são cerca de 10 vezes superiores aos mostrados na Tabela 13. López-Roldán *et al.* (2010) também

obtiveram LD para SMX e TMP na mesma ordem de magnitude dos obtidos nesse trabalho.

Para cada composto foram construídas três curvas analíticas compreendendo diferentes faixas de trabalho mostradas no Anexo 1. As curvas analíticas foram obtidas a partir da injeção de padrões e apresentaram linearidade adequada, expressa por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r^2), com valores acima de 0,9919. Os coeficientes de correlação mostrados na Tabela 13 são referentes às curvas analíticas construídas para as menores faixas de trabalho.

Teste de recuperação

Ensaio de recuperação empregando dois cartuchos em série foram realizados novamente quantificando os antibióticos por LC-MS/MS. A recuperação dos antibióticos foi avaliada em duplicata para duas concentrações diferentes: 50 e 500 ng L⁻¹. A Figura 24 mostra os valores médios obtidos para os ensaios de recuperação para cada concentração avaliada bem como os desvios médios.

Os antibióticos β -lactâmicos (AMX, AMP e CEF) apresentaram recuperação baixa em relação aos demais compostos estudados, provavelmente devido à instabilidade dessas substâncias em meio ácido. Urraca *et al.* (2007) determinaram baixas recuperações para penicilinas em meio ácido justificando esse fato devido à hidrólise, em meio ácido, do anel β -lactâmico presente em suas estruturas. Watkinson *et al.* (2009) realizaram extração em meio ácido e observaram recuperações similares às mostradas na Figura 24 para AMX e CEF. As fluoroquinolonas e o TMP apresentaram recuperações próximas de 100%. Para efeito de comparação, Chico *et al.* (2008) obtiveram recuperações ligeiramente menores das obtidas nesse projeto para esses compostos. Já Bueno *et al.* (2007) obtiveram recuperação maior para o TMP e menor para CIP quando comparada com os valores da Figura 24.

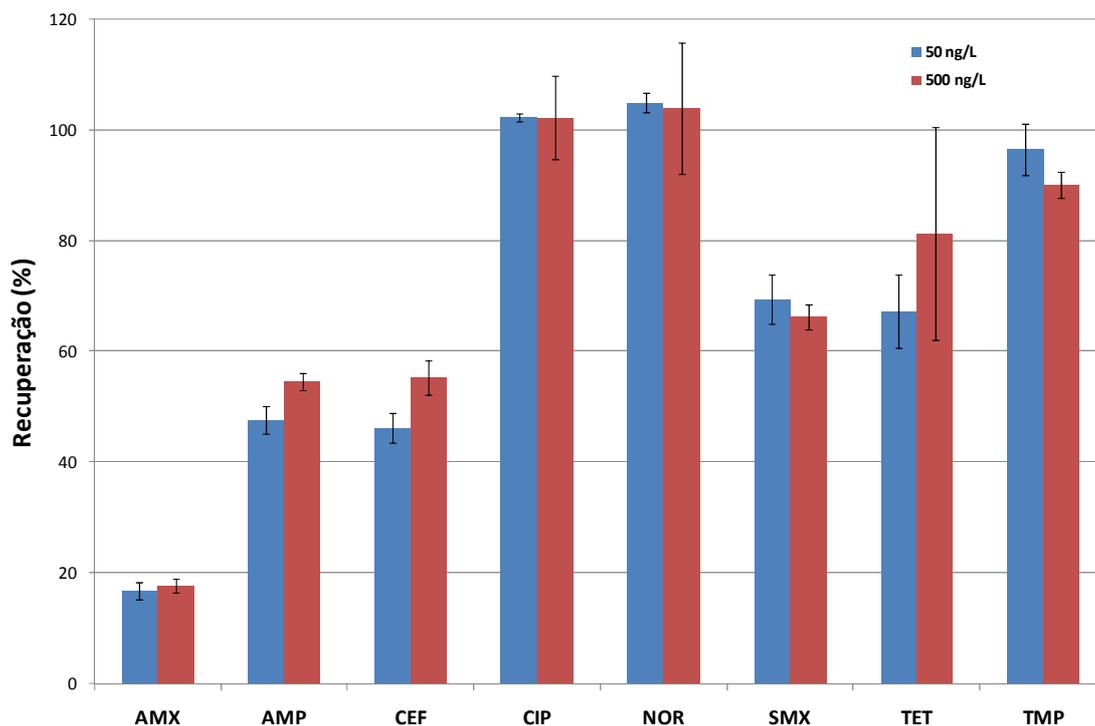


Figura 24 – Porcentagem de recuperação dos antibióticos e desvios médios para os testes realizados com soluções contendo 50 e 500 ng L⁻¹.

Os desvios médios entre as replicatas foram menores para AMX, AMP, CEF, SMX e TMP em ambas as concentrações analisadas. As fluoroquinolonas apresentaram maior desvio para o ensaio realizado com uma concentração mais elevada. Por fim, a TET apresentou desvios médios maiores para os dois níveis de concentração avaliados. De maneira geral, foram obtidos valores próximos de recuperação entre as duas concentrações analisadas para os antibióticos, com exceção de CEF e AMP que apresentaram recuperação maior para a concentração de 500 ng L⁻¹.

Determinação dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia

O método desenvolvido para determinação de antibióticos em amostras de água superficial foi aplicado em amostras coletadas ao longo do rio Atibaia gerando os primeiros resultados sobre a presença desses compostos em corpos aquáticos brasileiros. O Rio Atibaia está inserido em uma região de clima tropical

e, portanto, apresenta-se com maior vazão no verão devido ao período de chuvas e com menor vazão no inverno devido à menor pluviosidade nessa estação.

As amostras foram coletadas em três pontos distribuídos ao longo do rio Atibaia contemplando uma região menos impactada pelo aporte de esgoto doméstico, localizada no município de Atibaia, e uma região mais impactada por esse tipo de aporte, localizada na região da cidade de Campinas (CETESB, 2010). As amostragens foram realizadas em dois períodos distintos do ano para que fosse possível estudar variações nas concentrações dos antibióticos nas amostras de água do rio Atibaia em diferentes momentos hidrológicos. As Figuras 25 e 26 mostram as pluviosidades medidas pelo Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE) na região de Campinas nas épocas em que as amostras foram coletadas (CPTEC, 2011).

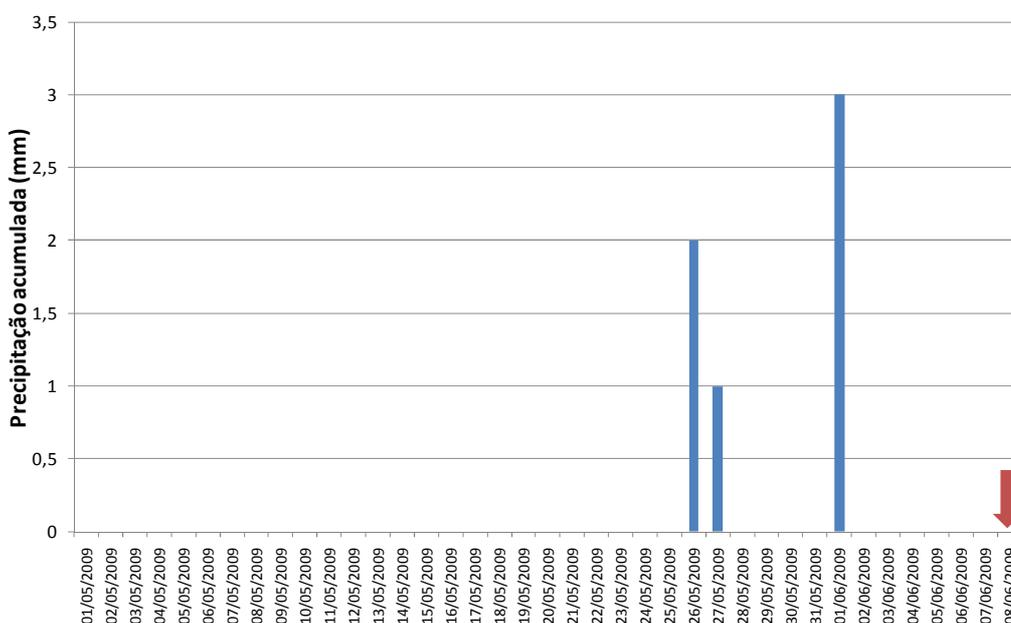


Figura 25 – Pluviosidade acumulada na região de Campinas no período de seca anterior à coleta realizada em 2009. A seta indica a data da amostragem.

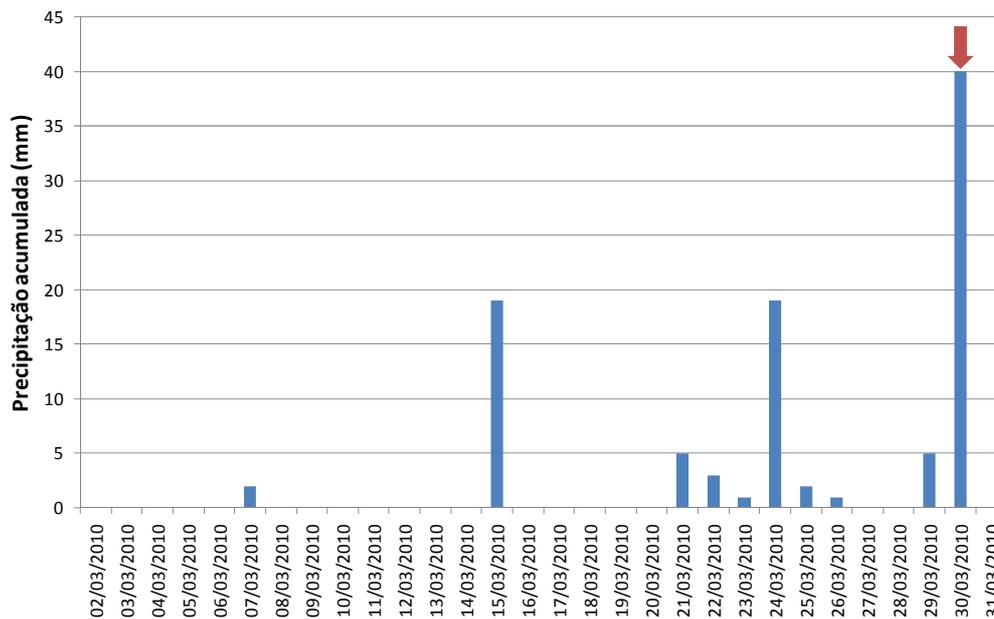


Figura 26 – Pluviosidade acumulada na região de Campinas no período de chuvas anterior à coleta realizada em março de 2010. A seta indica a data da amostragem.

Os dados pluviométricos mostram que o período de seca em 2009 foi bastante acentuado, com pluviosidade acumulada de 6 mm nos 38 dias anteriores à amostragem. Já o período de chuvas apresentou pluviosidade acumulada de 57 mm nos 30 dias anteriores à coleta. A média de pluviosidade no mês de março dos últimos 10 anos calculada a partir dos dados disponibilizados pelo CPTEC é de 103,2 mm. Ou seja, o mês de março de 2010 apresentou uma precipitação acumulada um pouco superior à metade da pluviosidade média acumulada para esse mês. Isso representa que o período de chuvas avaliado não proporcionou um aumento considerável da vazão do rio Atibaia em relação ao período de seca. A Tabela 14 mostra a concentração dos oito antibióticos nas amostras de água do rio Atibaia coletadas nos três pontos amostrais nos períodos de seca e cheia do rio. Tais valores foram obtidos por calibração externa e não foram corrigidos pela porcentagem de recuperação mostrada na Figura 24.

Os dados da Tabela 14 mostram que a TET não foi quantificada em nenhuma amostra coletada. Uma das razões para explicar esse resultado é o fato da tetraciclina ser um antibiótico cujo uso majoritário acontece em ambientes hospitalares no Brasil (de Madureira, 2006). Com isso, seria necessário o aporte

de efluentes hospitalares próximos aos pontos de coleta para que fosse possível quantificar a TET nas amostras coletadas. Além disso, a TET é um composto que apresenta elevada afinidade por matéria orgânica e por materiais inorgânicos e encontra-se, portanto, adsorvida a esses materiais em ambientes naturais (Kulshrestha *et al.*, 2004; Avisar *et al.*, 2010; Pils e Laird, 2007).

Tabela 14 – Concentração (ng L⁻¹) dos antibióticos nos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia nos períodos de chuva e seca.

Composto	P1		P2		P3	
	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva
AMX	9	12	17	6	4	5
TMP	3	6	7	4	6	3
TET	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
SMX	2	2	1	0,9	1	1
CEF	26	28	29	28	28	19
AMP	<0,6	1	<0,6	<0,6	<0,6	1
NOR	0,5	<0,6	2	4	0,7	2
CIP	0,6	<0,6	2	2	1	<0,6

Segundo os dados da Tabela 7, os antibióticos mais consumidos no Brasil são os pertencentes à classe dos β -lactâmicos, sendo AMX, AMP e CEF a ordem de maior consumo. A AMP apresentou concentrações abaixo ou próximas ao LQ do método conforme mostra os resultados mostrados na Tabela 14. As concentrações de AMX foram superiores às de AMP com máximo de 17 ng L⁻¹ na amostra coletada no P2 no período de seca. Por fim, a CEF foi o antibiótico que apresentou as maiores concentrações em todas as amostras analisadas.

O terceiro antibiótico com maior concentração nas amostras foi o TMP, apesar desse composto apresentar baixo consumo em comparação com os demais. Assim como a AMP, as fluoroquinolonas (CIP e NOR) apresentaram concentrações abaixo do LQ ou ligeiramente superiores a esse valor. Por fim, SMX foi quantificado em todas as amostras analisadas, porém apresentando

concentrações variando entre 0,9 e 2 ng L⁻¹, mesmo sendo o quarto antibiótico mais consumido no país.

Os resultados da Tabela 14 evidenciam que não há uma correlação exata entre a quantidade consumida do antibiótico pela população e as concentrações encontradas em águas superficiais. Ou seja, o antibiótico mais consumido por uma população não é necessariamente o que apresenta a maior concentração no corpo receptor. Outros fatores fazem parte nessa equação, tais como as constantes de fotodegradação, biodegradação e adsorção dos compostos além do consumo regionalizado de medicamento.

As β -lactamas apresentam tempos de meia vida curtos em ambientes naturais devido à instabilidade do anel β -lactâmico presente em suas estruturas. Os compostos dessa classe podem sofrer hidrólise ou serem biodegradados através da ação das enzimas β -lactamases (Cha *et al.*, 2006). Portanto, seria esperado que os compostos dessa classe apresentassem concentrações abaixo dos LQ ou muito próximas a eles. No entanto, a detecção desses compostos indica que há um aporte contínuo e, provavelmente, em concentrações elevadas. Já as fluoroquinolonas apresentam comportamento diferente das β -lactamas. Elas 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). Portanto, concentrações baixas em amostras de água superficiais são esperadas.

Para comparar a variação da concentração dos antibióticos ao longo do Rio Atibaia foram construídos os gráficos para o período de seca e de chuvas com os valores mostrados na Tabela 14. A Figura 27 mostra a concentração dos oito antibióticos avaliados nos três pontos amostrados ao longo do Rio Atibaia no período de seca e a Figura 28 mostra o mesmo gráfico para o período de chuvas.

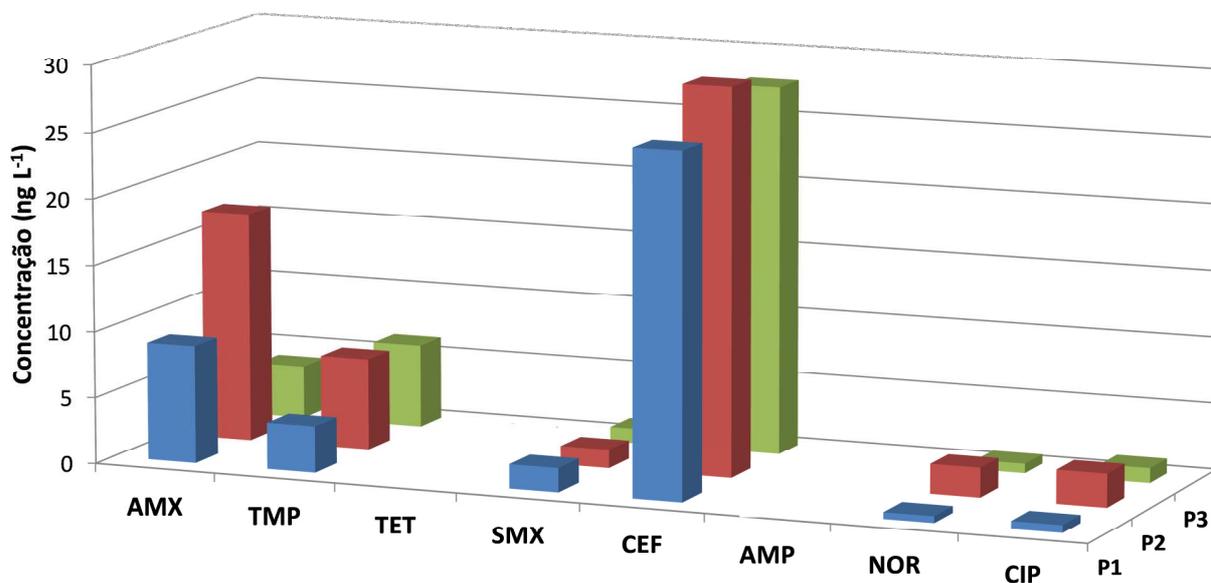


Figura 27 – Concentração dos antibióticos (ng L^{-1}) ao longo do rio Atibaia nas amostras coletadas no período de seca.

A partir do gráfico mostrado na Figura 27 é possível observar que, de maneira geral, a concentração dos antibióticos atinge os maiores valores no P2. Esse ponto está localizado ao lado da estação de captação de água da cidade de Campinas e sofre grande influência do aporte do ribeirão Pinheiros, localizado cerca de 1.000 m à montante do ponto de coleta. Segundo a CETESB, o Ribeirão Pinheiros apresentou Índice de Qualidade da Água (IQA) variando entre péssimo e regular ao longo do ano de 2009 e Índice de Estado Trófico (IET) hipereutrófico durante o ano todo devido ao aporte de esgoto bruto e efluente de ETE dos municípios de Vinhedo, Valinhos e Campinas (CETESB, 2010).

Nota-se que a concentração dos antibióticos não apresenta diminuição considerável entre o P2 e o P3, como seria esperado devido ao efeito de diluição presente em corpos aquáticos superficiais. A partir dessa constatação pode-se inferir que deve haver um aporte desses contaminantes entre esses dois pontos. O P3 está localizado há, aproximadamente, 4 km à jusante do aporte do Ribeirão Anhumas ao Rio Atibaia e é um dos grandes receptores do esgoto bruto e tratado da cidade de Campinas. Ele também apresentou valores de IQA variando entre péssimo e regular e IET hipereutrófico durante o ano de 2009 (CETESB, 2010)

devido à contaminação oriunda do aporte de esgoto em suas águas e, portanto, é a fonte de antibióticos presente entre o P2 e o P3.

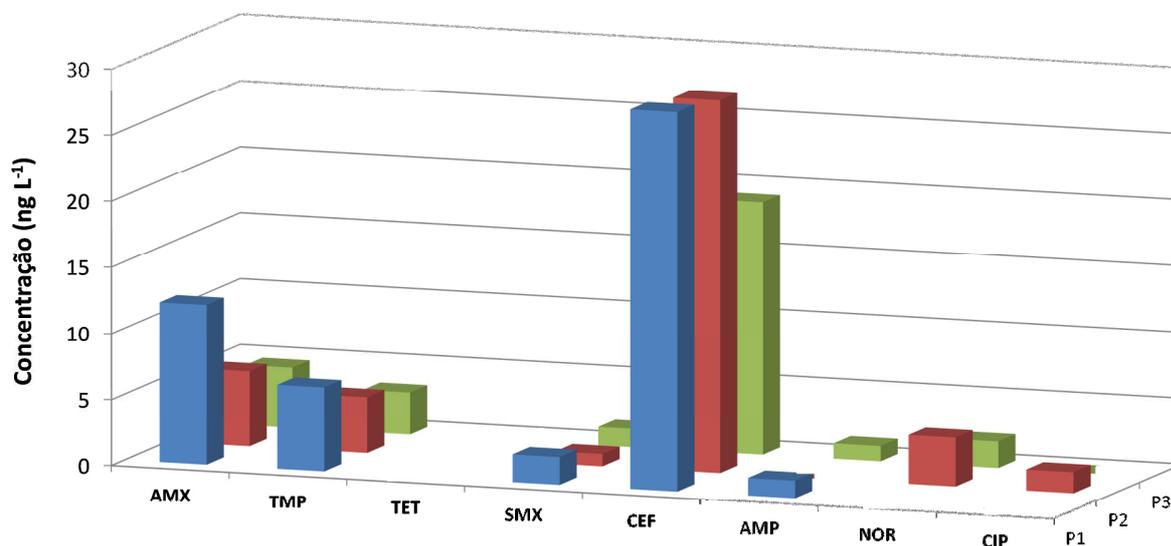


Figura 28 – Concentração dos antibióticos (ng L^{-1}) ao longo do rio Atibaia nas amostras coletadas no período de chuvas.

O gráfico da Figura 28 mostra um cenário diferente para o período de chuvas do que o apresentado no período de seca. No período de cheia do rio Atibaia, o P1 foi o ponto que apresentou as maiores concentrações para cinco dos oito antibióticos estudados (AMX, TMP, SMX, CEF e AMP). Somente CIP e NOR apresentaram maiores concentrações no P2. O P1 apresentou valores bons de IQA e IET durante o ano de 2009 (CETESB, 2010) eliminando a presença de aporte contínuo de esgoto nesse ponto. Como a amostragem foi realizada discretamente é possível que um aporte pontual tenha ocorrido explicando as maiores concentrações nesse ponto.

A comparação entre os resultados no período de seca e de chuvas mostra que não há uma grande variação na concentração dos contaminantes nas amostras analisadas entre os dois períodos. Considerando a diluição provocada pelo aumento da vazão do rio, seriam esperadas concentrações menores no período de chuvas. No entanto, o período de chuva em questão não foi muito intenso como mostrado na Figura 26 proporcionando pouca diluição da amostra.

Além disso, variações no uso dos antibióticos ao longo do ano refletem diretamente na concentração desses compostos nas águas de corpos aquáticos superficiais.

Obtenção de um perfil 24 h de concentração

A variação da concentração de contaminantes em águas superficiais pode indicar se há o aporte contínuo das espécies em questão no corpo aquático em estudo. Visando observar a presença desse aporte como também inferir dados sobre o consumo dos antibióticos pela população foi obtido um perfil horário da concentração dos analitos durante 24 h. Amostras do P2 foram coletadas entre os dias 22 e 23 de novembro de 2009, a cada quatro horas. A Figura 29 mostra a variação da concentração dos antibióticos quantificados em todas as seis amostras analisadas.

A partir da observação do gráfico mostrado na Figura 29 nota-se que houve pouca variação na concentração dos antibióticos CEF e TMP ao longo de um período de 24h. A concentração de TMP variou entre $1,6 \text{ ng L}^{-1}$ e $2,4 \text{ ng L}^{-1}$ enquanto a concentração de CEF variou entre $4,5 \text{ ng L}^{-1}$ e 10 ng L^{-1} . Todos os outros seis antibióticos contemplados no método analítico apresentaram concentração abaixo do LQ do método em pelo menos uma das seis amostras analisadas para esse levantamento de concentração.

A concentração de fármacos em águas naturais é reflexo do consumo desses compostos pela população (Daughton, 2001). Considerando essa premissa, a Figura 29 mostra que o consumo desses compostos ao longo de um dia é constante. Ou seja, não há indicativos de um horário com maior incidência de uso desses compostos pela população.

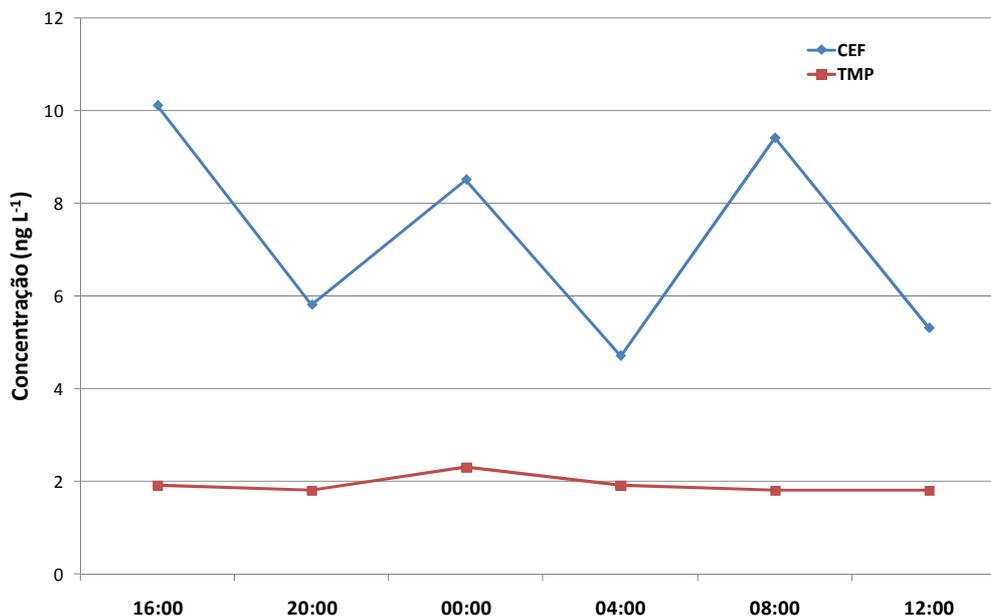


Figura 29 – Variação da concentração (ng L⁻¹) de cefalexina (CEF) e trimetoprim (TMP) no rio Atibaia ao longo de 24 h no ponto localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas.

Obtenção de um perfil semanal de concentração

Além do estudo da variação na concentração dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia ao longo de 24 h, avaliou-se também a variação da concentração desses contaminantes ao longo de uma semana. Para tanto, amostras de água do Rio Atibaia foram coletadas no P2 durante sete dias consecutivos (25 a 31 de janeiro de 2010) no período entre 15:30 e 16:00. A Figura 30 mostra a variação na concentração de quatro dos oito antibióticos contemplados no método analítico. Os outros quatro antibióticos apresentaram pelo menos uma amostra com concentração abaixo do LQ do método.

A Figura 30 mostra que não há uma variação expressiva na concentração dos antibióticos ao longo da semana. Há somente um pico de concentração para a CEF na amostra coletada na quarta-feira. TMP é o antibiótico que apresentou as menores concentrações ao longo desse ensaio, seguido pela AMX e pelo CIP. Assim como nas campanhas de amostragem realizadas nos períodos de seca e

cheia do rio Atibaia, CEF foi o antibiótico que apresentou as maiores concentrações nas amostras.

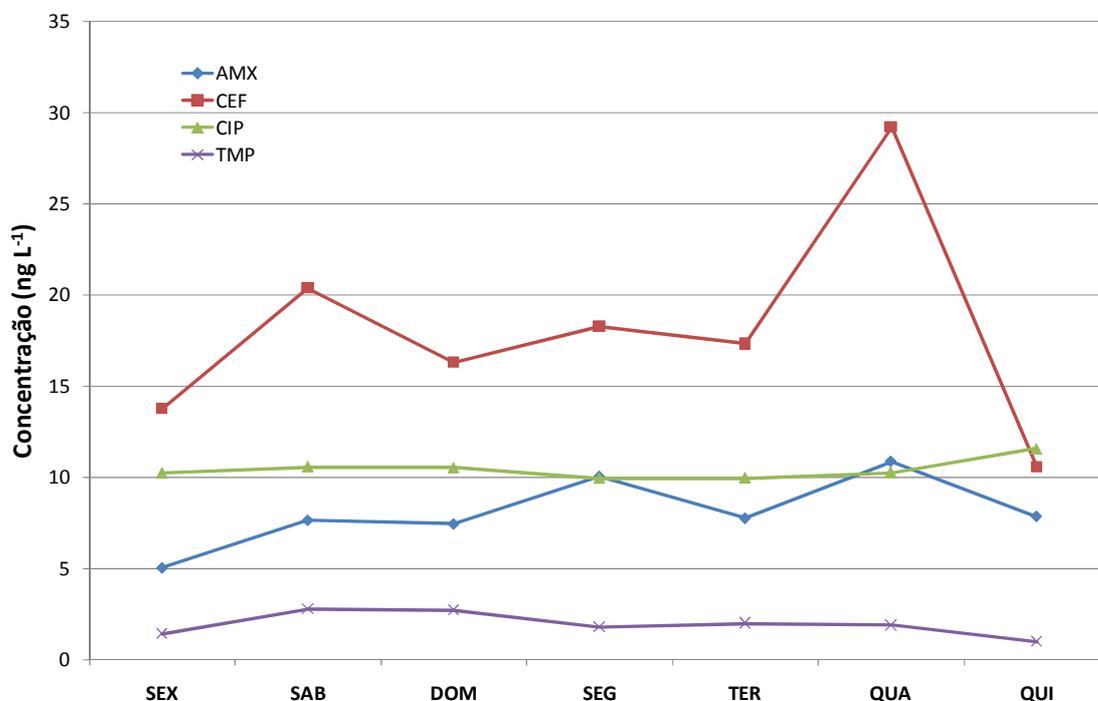


Figura 30 – Variação da concentração (ng L^{-1}) de cefalexina (CEF), trimetoprim (TMP), ciprofloxacino (CIP) e amoxicilina (AMX) no rio Atibaia, no ponto de coleta localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de uma semana.

Comparação entre as concentrações no Rio Atibaia e em outros rios

As concentrações dos antibióticos determinadas no Rio Atibaia e mostradas na Tabela 14 e nas Figuras 27 a 30 são baixas em termos absolutos já que estão na faixa de ng L^{-1} para a maioria dos valores e pg L^{-1} para alguns poucos. No entanto, uma comparação com outras concentrações desses compostos nas águas de corpos aquáticos ao redor do mundo é necessária para uma melhor compreensão das concentrações determinadas nesse trabalho. A Tabela 15 mostra os valores encontrados para o Rio Atibaia bem como a concentração dos antibióticos determinados em alguns rios do Planeta.

Tabela 15 – Concentração (ng L⁻¹) de amoxicilina (AMX), ampicilina (AMP), cefalexina (CEF), norfloxacino (NOR), ciprofloxacino (CIP), sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP) em diversos corpos de água superficial.

Local	AMX	AMP	CEF	NOR	CIP	SMX	TMP	Referência
Rio Atibaia (este trabalho) ^a	4-17	1-2	5-29	0,5-4	0,6-11	0,9-2	1-7	Este trabalho
Rio Sena (França) ^b	- ^d	-	-	31	ND ^e	40	16	Tamtam <i>et al.</i> (2008)
49 rios (EUA) ^c	-	-	-	ND	30	ND	20	Focazio <i>et al.</i> (2008)
6 rios (Austrália) ^c	200	-	100	1.150	1.120	2.000	150	Watkinson <i>et al.</i> (2009)
Rios Taff e Ely (Reino Unido) ^a	<10-542	-	-	-	-	<0,5-4	<1,5-183	Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> (2008)
Rio Pearl (China) ^c	ND	-	-	251	-	193	-	Xu <i>et al.</i> (2007)
Rio Amarelo + 8 tributários (China) ^a	-	-	-	46-327	-	3-68	-	Xu <i>et al.</i> (2009)
Rio Høje (Suécia) ^c	-	-	-	-	-	10	20	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Rio Pó (Itália) ^a	<2,08	-	-	-	1,32-16,0	1,83-2,39	-	Zuccato <i>et al.</i> (2010)
Rio Reno (Alemanha) ^a	3-6	<10 ^b	-	-	<10 ^c	98 ^c	71 ^c	Christian <i>et al.</i> (2003)
3 ribeirões (EUA) ^a	ND	ND	-	ND	<5-116	29-564	<5-61	Massey <i>et al.</i> (2010)
Rio Danúbio (Sérvia) ^c	ND	ND	ND	-	-	ND	25	Grujić <i>et al.</i> (2009)

Nota: a – valores mínimos e máximos; b – valores médios; c – valores máximos; d – Não analisado; e – não determinado.

Os valores da Tabela 15 mostram que o Rio Atibaia apresenta baixa concentração dos antibióticos quando comparado com outros corpos aquáticos superficiais. Diversos fatores devem ser considerados para analisar os valores da Tabela 15. Apesar do comportamento geoquímico dos compostos no ambiente aquático reger a concentração dos analitos na fase dissolvida, o padrão de consumo dos antibióticos por determinada população é um fator a ser considerado. Por exemplo, populações que consomem mais fluoroquinolonas tem a tendência a apresentar maior concentração desses compostos em seus rios.

A presença de ETE na região bem como o grau de tratamento fornecido ao esgoto antes de seu aporte ao corpo receptor também influenciam a concentração dos antibióticos nas águas dos rios. Watkinson *et al.* (2007) avaliaram a remoção de 28 antibióticos em uma ETE de Brisbane, Austrália e concluíram que o tratamento biológico convencional remove 25% das sulfonamidas, 99% das β -lactamas e 83% das quinolonas. Dessa forma, a falta de tratamento do esgoto lançado ao corpo receptor eleva a concentração dos analitos nas águas desse corpo aquático em comparação com o aporte de efluente de uma ETE.

As características biogeoquímicas dos rios também influenciam a concentração dos antibióticos em suas águas. Rios com elevada vazão apresentam um fator de diluição maior que rios com média e baixa vazão. A qualidade e quantidade de matéria orgânica presente na fase aquosa, a concentração de material particulado e de metais bem como a comunidade microbiológica desse ecossistema também regem a dinâmica dos compostos que são aportados em um corpo aquático. Além desses fatores relacionados aos corpos aquáticos, a estabilidade da molécula em relação ao pH do meio bem como à incidência de radiação solar também devem ser considerados em uma avaliação do comportamento geoquímico dos compostos em sistemas aquáticos.

O Rio Atibaia é um rio que apresenta elevada vazão quando comparado com alguns corpos aquáticos cujos resultados são mostrados na Tabela 15. Alguns desses rios são constituídos majoritariamente por efluentes de ETE, como por exemplo os rios Taff e Ely no Reino Unido e alguns ribeirões nos EUA e, portanto, apresentam baixo fator de diluição dos antibióticos aportados. Quando

comparado com rios de maior volume de água, como o Sena, o Pó ou o Reno, a concentração dos antibióticos no Rio Atibaia encontra-se na mesma ordem de magnitude.

Aplicação do MIP em amostras da bacia do Rio Atibaia

O uso de MIP como sorvente em processos de SPE tem se tornado uma opção na diminuição do efeito da matriz na análise instrumental (Qiao *et al.*, 2006). Diversos MIP já foram desenvolvidos e aplicados em SPE para a determinação de inúmeros compostos e classes de compostos em matrizes aquosas ambientais (Sun *et al.*, 2008; Demeestere *et al.*, 2010; Hoshina *et al.*, 2009). A cooperação entre o LQA da UNICAMP e o GSOLFA da UCM permitiu aplicar o MIP para fluoroquinolonas desenvolvido pelo grupo espanhol na determinação de CIP e NOR nas águas do Rio Atibaia. Antes da aplicação do MIP foram realizados ensaios de recuperação através da análise de amostras de água Milli-Q contendo 500 ng L^{-1} de cada um dos oito analitos contemplados nesse trabalho. A Figura 31 mostra os resultados obtidos para os ensaios de recuperação.

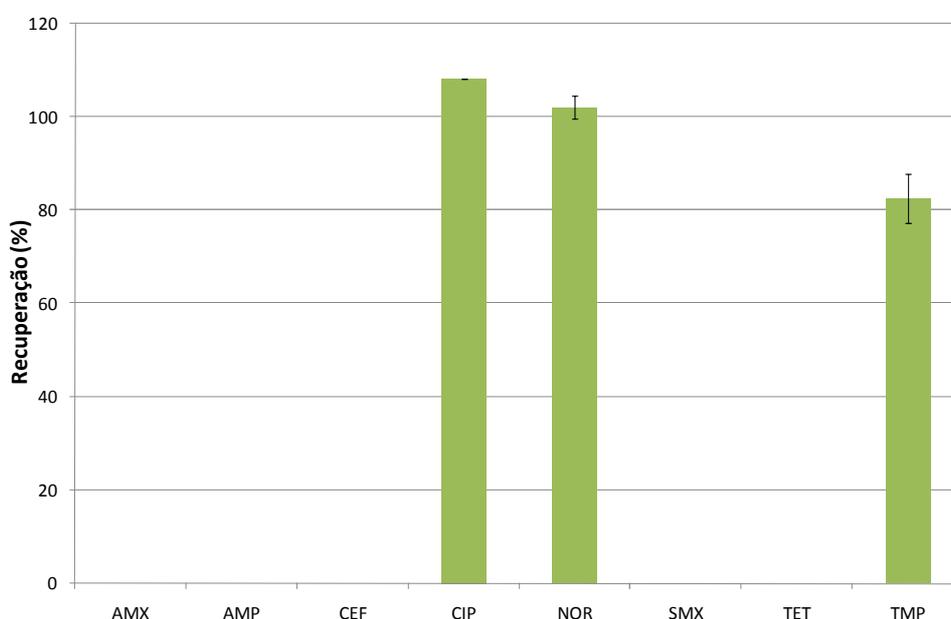


Figura 31 – Porcentagem de recuperação dos antibióticos e erros relativos para uma amostra de água Milli-Q contaminada com 500 ng L^{-1} de cada analito.

O uso de MIP em processos de SPE proporcionam grande seletividade na análise. Os resultados da Figura 31 evidenciam a seletividade do MIP avaliado já que somente as fluoroquinolonas (CIP e NOR) e o TMP foram retidos pelo MIP. O TMP não deveria apresentar retenção no MIP pois não é uma fluoroquinolona. No entanto, ele deve apresentar sítios de interação não específicos com o MIP que proporcionam sua retenção. As recuperações obtidas para CIP e NOR são próximas de 100% e apresentam erro relativo pequeno indicando repetibilidade. Mesmo não sendo preparado para reter o TMP, o MIP avaliado apresentou-se eficiente na extração desse composto. Após verificar a eficiência do MIP na retenção dos analitos, ele foi aplicado em amostras de água superficial da bacia do Rio Atibaia. A Figura 32 mostra a concentração dos três antibióticos nos cinco pontos amostrais coletados. Os valores mostrados na Figura 32 foram obtidos por calibração externa e não foram corrigidos pela porcentagem de recuperação mostrada na Figura 31.

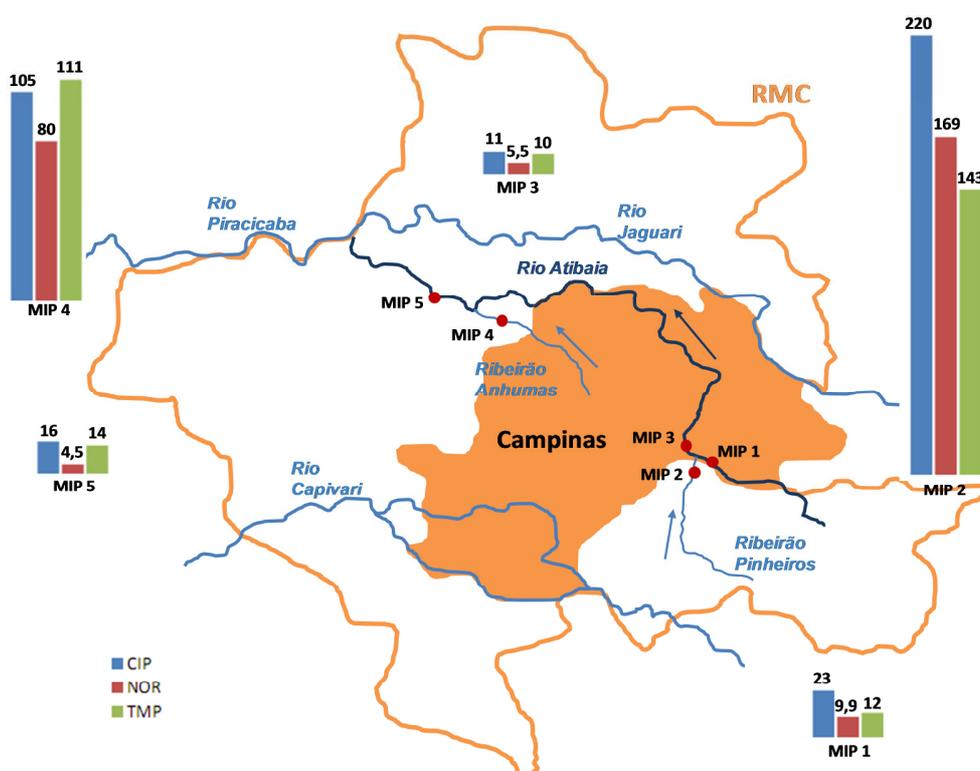


Figura 32 – Concentração (ng L⁻¹) de ciprofloxacino (CIP), norfloxacino (NOR) e trimetoprim (TMP) nos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.

Os resultados empregando o MIP como sorvente de SPE mostrados na Figura 32 indicam que o Ribeirão Pinheiros e o Ribeirão Anhumas apresentam concentração muito superior dos antibióticos do que o Rio Atibaia. Ambos corpos aquáticos recebem elevada quantidade de esgoto bruto e efluentes de ETE e, por esse motivo, apresentam concentração maior dos antibióticos. Além disso, esses corpos aquáticos apresentam uma vazão menor que a do Rio Atibaia o que contribui para uma concentração maior. As concentrações nos ribeirões Pinheiros e Anhumas são uma ordem de magnitude maiores do que aquelas encontradas no Rio Atibaia.

Nota-se pela Figura 32 que o aporte das águas do Ribeirão Pinheiros não provoca um aumento na concentração dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia. Pelo contrário, há um declínio na concentração dos três antibióticos. No entanto, deve-se ter em mente que a amostragem foi pontual e discreta e, por esse motivo, representa somente a concentração da pequena porção de amostra coletada. O aporte do Ribeirão Anhumas também não modifica consideravelmente a concentração dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia.

CONCLUSÕES

A avaliação da presença de antibióticos em águas superficiais é um quesito de elevada importância. Sob a óptica ambiental, o surgimento de bactérias resistentes a esses compostos é uma preocupação latente da comunidade científica. Existem também evidências de efeitos em algas e micro-organismos aquáticos devido à exposição a essas substâncias. Além das consequências ecotoxicológicas associadas à presença de antibióticos em águas superficiais, esses compostos podem indicar o aporte de esgoto em corpos aquáticos. Como esses corpos são utilizados como suprimento de água para a população, a presença de antibióticos em águas superficiais pode se apresentar como um problema de saúde pública. Nesse sentido, a avaliação da presença desses compostos nos mananciais é fundamental para subsidiar políticas públicas de proteção da vida humana.

Os oito antibióticos mais consumidos no Brasil foram escolhidos para serem determinados nas águas do rio Atibaia. Desenvolveram-se métodos analíticos baseados em SPE e HPLC-DAD e HPLC-FL. No entanto, a interferência da matriz impossibilitou a aplicação desses métodos nas análises. A grande diferença de propriedades químicas entre os analitos, já que os oito compostos pertencem a seis classes diferentes de antibióticos, foi a responsável pela necessidade de um método cromatográfico abrangente resultando em uma análise demorada e mais suscetível à interferência da matriz.

O desenvolvimento de um método baseado em SPE e LC-MS/MS possibilitou a quantificação dos antibióticos nas águas do rio Atibaia nos períodos de seca e de chuvas. As concentrações encontradas são baixas quando comparadas com rios de outros países. No entanto, as características de cada corpo aquático devem ser ponderadas nessa comparação. Cefalexina e amoxicilina foram os compostos que apresentaram as maiores concentrações nas águas coletadas no rio Atibaia nas duas amostragens realizadas, com concentração máxima de 29 e 17 ng L⁻¹, respectivamente. As fluoroquinolonas, ciprofloxacino e norfloxacino, apresentaram concentrações próximas ao limite de

quantificação do método. No período de seca, o ponto de coleta localizado ao lado da Estação de Captação de Água do município de Campinas no rio Atibaia apresentou as maiores concentrações de antibióticos. Já no período de chuvas, o ponto de coleta localizada na cidade de Atibaia foi o que apresentou as maiores concentrações de antibióticos. Os perfis horário e diário de concentração dos antibióticos mostraram que não há uma variação significativa na concentração dos antibióticos nas águas do Rio Atibaia ao longo das horas e dos dias da semana.

A aplicação de um método de extração seletiva para as fluoroquinolonas baseado em polímeros de impressão molecular também foi realizada. As concentrações dos compostos dessa classe foram de 169 ng L⁻¹ para ciprofloxacino e 220 ng L⁻¹ para norfloxacino no ribeirão Pinheiros e de 105 ng L⁻¹ e 80 ng L⁻¹ para ciprofloxacino e norfloxacino, respectivamente, no ribeirão Anhumas. Os resultados desse método mostraram que os ribeirões Anhumas e Pinheiros, afluentes do rio Atibaia, apresentam elevadas concentrações de norfloxacino e ciprofloxacino, reflexo do aporte de esgoto bruto e de efluentes de estações de tratamento de esgoto nesses corpos aquáticos.

CAPÍTULO 4

A PRESENÇA DE DROGAS ILÍCITAS NA BACIA DO RIO ATIBAIA

INTRODUÇÃO

Em 1910 o então Ministro das Relações Exteriores da Inglaterra, Sir Edward Grey, escreveu uma carta para o Embaixador dos Estados Unidos em Londres dizendo "...a propagação do uso da morfina e da cocaína está se tornando um mal mais sério e mais mortal do que fumar ópio, e esse mal certamente aumentará...". A preocupação de Sir Edward Grey tornou-se uma realidade além da sua imaginação. Para se ter uma ideia da dimensão que o mercado de drogas ilícitas atingiu, em 2003 ele movimentou mais de US\$ 320 bilhões (UNODC, 2005). Com esse valor, ele seria a vigésima sétima maior economia mundial naquele ano.

Em 2008, as diversas drogas ilícitas conhecidas foram consumidas ao menos uma vez por 155 a 250 milhões de pessoas entre 15 e 64 anos (UNODC, 2010). Muitos desses usuários são dependentes químicos e físicos dessas substâncias. Graves problemas sociais enfrentados diariamente pela população estão diretamente associados a esses dependentes. Tráfico de drogas, crimes cometidos por dependentes sob o efeito das drogas ou na abstinência, violência familiar e gastos com saúde pública são só alguns exemplos.

Classes

Basicamente, existem quatro classes consideradas nos levantamentos do mercado de drogas ilícitas: cocaína, *Cannabis*, opiáceos e drogas sintéticas. Dentre as drogas sintéticas as anfetaminas e as substâncias tipo anfetamina (do inglês, *amphetamine type substances*, ATS) compreendem a grande parte das substâncias comercializadas.

Opiáceos

Os opiáceos constituem uma classe de substâncias originadas ou sintetizadas a partir da papoula, planta que quando cortada elimina um tipo de seiva branca que seca passa a se chamar ópio. É difícil estimar quando e onde o

ópio passou a ser consumido. Por volta de 3.000 a.C. os sumérios, que habitavam a região que hoje corresponde ao Irã, já cultivavam a papoula e preparavam o ópio. Provavelmente, o ópio era utilizado em rituais religiosos sendo aspirado ou inalado a partir de recipientes aquecidos. Anos mais tarde, o ópio passou a ser empregado medicinalmente como ingrediente de alguns remédios e até mesmo em eutanásias. No entanto, foi a partir do século XVI que o uso narcótico do ópio começou. Inicialmente na Turquia, Egito, Alemanha e Inglaterra e posteriormente, no século XVII, na China. No século XIX, a morfina foi isolada do ópio e passou a ser empregada como analgésico e anestésico (Brownstein, 1993).

Os principais constituintes dessa classe de compostos são a morfina e a heroína, sendo que a morfina é obtida diretamente do ópio e a heroína é sintetizada através da acetilação da morfina. Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas de 2010 divulgado pela Organização das Nações Unidas, mais especificamente pelo seu Escritório sobre Crimes e Drogas (do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) existem mais de 15 milhões de pessoas consumindo opiáceos ilícitos no mundo movimentando um mercado estimado em US\$ 65 bilhões (UNODC, 2010).

A heroína é o opiáceo mais consumido e também o mais letal. Ela é consumida através do fumo e, principalmente, da injeção. O uso de seringas compartilhadas agrava a situação do usuário devido aos riscos de contágio de doenças como HIV/AIDS e hepatite C.

Anfetaminas e estimulantes tipo anfetaminas (ATS)

As anfetaminas constituem um grupo de compostos sintéticos originariamente desenvolvidos para fins farmacológicos. A anfetamina foi sintetizada em 1887 e comercializada em 1932 como descongestionante nasal. Amplamente empregada na II Guerra Mundial pelos soldados, o mercado das anfetaminas aumentou com o término da guerra. Em meados dos anos 70, as anfetaminas perderam espaço no mercado farmacêutico. Atualmente, as anfetaminas são empregadas em fármacos para controle de déficit de atenção,

narcolepsia e para controle de obesidade (UNDCP, 1996). Apesar do mercado lícito existir, o uso recreativo e ilícito das anfetaminas é que apresenta maior magnitude. Dentre os compostos pertencentes a essa classe, anfetamina e metanfetamina são os mais consumidos. A quantidade estimada de usuários no ano de 2008 com idade entre 15 e 64 anos ficou entre 14 e 53 milhões de usuários (UNODC, 2010).

As ATS são substâncias que apresentam estrutura química relacionada a das anfetaminas. De maneira geral, essas substâncias não apresentam atividade terapêutica e são sintetizadas única e exclusivamente para uso recreativo. A principal substância dessa classe é o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), também conhecido popularmente como *Ecstasy*. Além desse composto, os outros dois principais são o 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e o 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA). Essas substâncias apresentam um crescimento contínuo em sua produção desde os anos 90.

Cocaína

A cocaína é uma substância extraída das folhas de uma planta da família das eritroxiláceas, *Erythroxylum coca*. No começo da década de 1860, ela foi isolada pela primeira vez por Albert Niemann (Niemann, 1860). No entanto, seu consumo passou a crescer após a publicação de dois trabalhos no fim do século XIX. No primeiro trabalho, Sigmund Freud descreveu as sensações oriundas do consumo de cocaína (Freud, 1884). No segundo, Karl Koller descreveu as propriedades anestésicas desse composto (Koller, 1884). Em apenas três anos, a produção de cocaína da Merck, principal produtora europeia da época, saltou de 0,75 lb/ano para 158.352 lb/ano, ou aproximadamente 71 t/ano (Karch, 1999). Nessa época, a cocaína passou a ser largamente empregada em tônicos, tratamento para dor de dente, remédios em geral e até mesmo chocolate (Goldstein *et al.*, 2009). Atualmente, a produção mundial de cocaína é estimada em 865 t/ano, movimentando cerca de US\$ 88 bilhões (UNODC, 2010).

O composto químico cocaína compreende duas variedades de drogas ilícitas consumidas: a cocaína em pó e o *crack*, que é a cocaína na forma de pedra. A primeira é, na verdade, o cloridrato de cocaína que é consumido através da sua inalação apresentando efeitos mais tênues e preços mais elevados. Ela também pode ser injetada proporcionando seus efeitos mais rapidamente. Já o *crack* é fumado, apresenta preço mais barato que a cocaína em pó e seus efeitos são intensos e rápidos.

Metabolização da cocaína

Ao entrar no corpo humano, a cocaína é assimilada através das reações de biotransformação. Essas reações estão diretamente relacionadas à rota de consumo da cocaína. A metabolização da droga ocorre através de múltiplas reações enzimáticas sendo formados três principais metabólitos: benzoilecgonina, norcocaína e ecgonina-metil-éster. A benzoilecgonina é o metabólito majoritário (aproximadamente 50%) independente da rota de administração da cocaína. Ela é formada no fígado a partir da hidrólise da droga proporcionada pela carboxilesterase. A norcocaína é o produto da N-desmetilação hepática e representa cerca de 5% dos metabólitos formados. Já a ecgonina metil éster é formada a partir da reação da cocaína com butirilcolinesterase e representa cerca de 33% dos metabólitos. Outros metabólitos minoritários formados são *p*-hidróxicocaína, *m*-hidróxicocaína, *p*-hidróxibenzoilecgonina, *m*-hidróxibenzoilecgonina e norbenzoilecgonina (Goldstein *et al.*, 2009).

O consumo de cocaína em conjunto com álcool provoca a formação de um metabólito chamado cocaetileno. Esse composto é formado a partir da transesterificação do etanol com a cocaína. No caso da cocaína ser consumida na forma de *crack*, há a formação de anidroecgonina metil éster como produto da queima da cocaína. A metabolização desse produto de queima forma a anidroecgonina (Carvalho, 2006). A Figura 33 ilustra algumas das rotas de metabolização da cocaína.

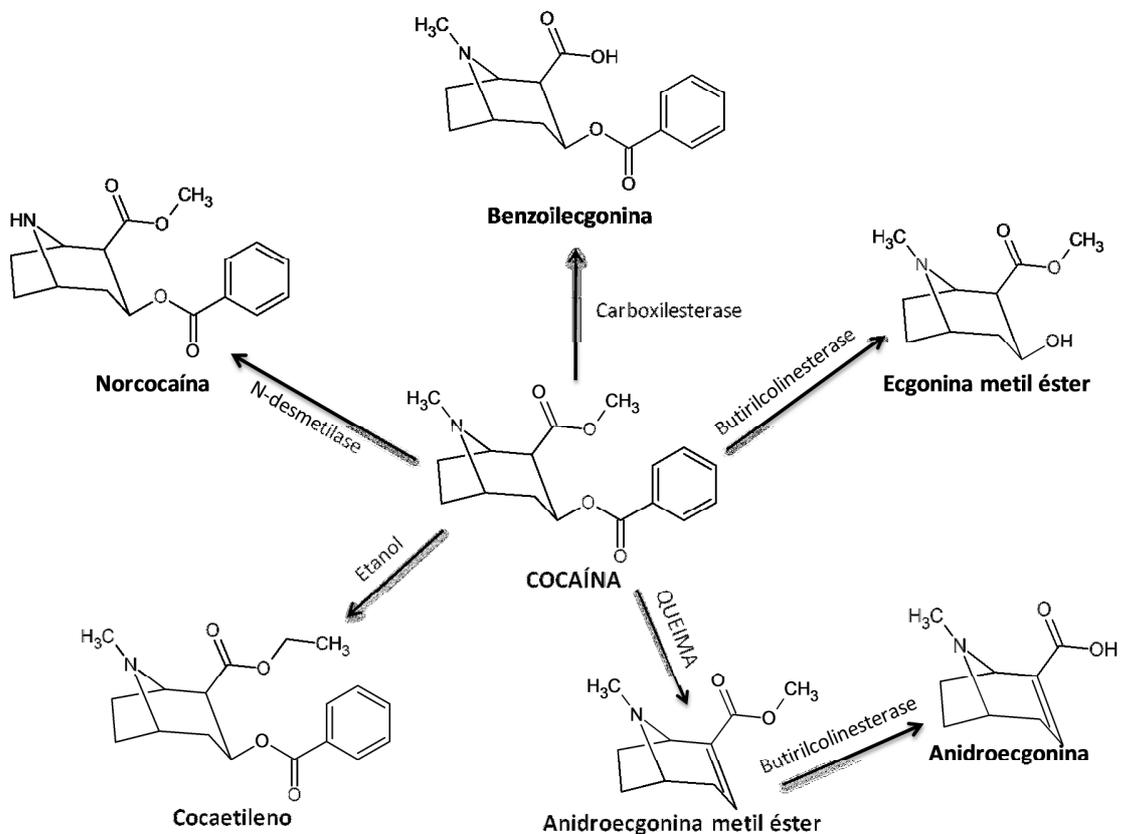


Figura 33 – Rotas de biotransformação da cocaína no corpo humano (baseado em Paul *et al.*, 2005 e Goldstein *et al.*, 2009).

Drogas ilícitas em matrizes ambientais

Assim como os fármacos, a presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais surge do consumo ou da disposição dessas substâncias. Após serem consumidas, as drogas são metabolizadas e atingem o sistema de esgotamento sanitário, passando por uma ETE e, por fim, sendo aportados em corpos aquáticos. No caso do Brasil, cujo tratamento de esgoto sanitário é precário ou inexistente, há uma quantidade significativa de aporte de esgoto bruto nos corpos receptores.

A presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais é um tema extremamente recente. O primeiro trabalho publicado nessa área quantificou

MDMA em amostras de efluente de ETE dos EUA (Jones-Lepp *et al.*, 2004). A partir de então, alguns poucos trabalhos foram publicados mostrando concentrações de drogas ilícitas em amostras de águas superficiais. Zuccato *et al.* (2008a) determinaram a concentração de cocaína e alguns metabólitos, ATS, morfina e um metabólito de maconha em amostras dos rios Pó, Arno, Lambro e Olona (Itália) e no rio Tâmis (Inglaterra). Kasprzyk-Hordern *et al.* (2008) determinaram cocaína, benzoilecgonina e anfetamina em amostras coletadas no Rio Taff (Reino Unido). Bartelt-Hunt *et al.* (2009) quantificaram metanfetamina em amostras de quatro corpos aquáticos superficiais nos EUA. Além desses estudos, drogas ilícitas foram quantificadas em amostras de águas superficiais da Espanha (Postigo *et al.*, 2010), Bélgica (van Nuijs *et al.*, 2009a) e Irlanda (Bones *et al.*, 2007). Além de águas superficiais, drogas ilícitas foram quantificadas em amostras de água potável. Huerta-Fontela *et al.* (2008) quantificaram cocaína, benzoilecgonina, MDMA e anfetamina em amostras de água potável coletadas após a finalização do tratamento evidenciando a exposição humana involuntária a esses compostos. Apesar desses estudos apresentarem a presença de drogas ilícitas em amostras de água superficial e potável, não existem trabalhos sobre a exposição e ecotoxicidade desses compostos em ambientes aquáticos.

Apesar dos problemas relacionados à exposição da biota e dos seres humanos ocorrerem em águas superficial e potável, a matriz ambiental mais avaliada quanto à presença de drogas ilícitas é o esgoto doméstico. O principal motivo para isso é a possibilidade de se estimar a quantidade de droga consumida por uma determinada população a partir da concentração dos metabólitos e dos compostos parentais no esgoto bruto. Estudos dessa natureza já foram realizados na França (Karolak *et al.*, 2010), Croácia (Terzic *et al.*, 2010), Itália (Zuccato *et al.*, 2005), Espanha (Huerta-Fontela *et al.*, 2007), Bélgica (van Nuijs *et al.*, 2009b), Irlanda (Bones *et al.*, 2007) e Suíça (Berset *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

A presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais é uma questão bastante recente mundialmente. Os efeitos provocados à biota ainda não foram elucidados e, antes disso acontecer, é necessário desenvolver métodos analíticos e obter as concentrações presentes no ambiente a que a biota está continuamente sendo exposta. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram:

1. Desenvolver um método analítico para a determinação de drogas ilícitas em matrizes aquosas;
2. Estudar a presença e a variação na concentração desses compostos em diversos pontos de amostragem localizados na bacia do rio Atibaia gerando os primeiros resultados sobre a presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais brasileiras;
3. Situar os resultados obtidos fornecendo assim dados sobre o consumo de drogas ilícitas e o aporte dessas drogas ao ambiente de tal maneira que possam servir de base para orientação de políticas públicas de combate ao uso e ao tráfico de drogas.

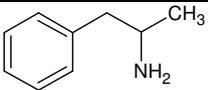
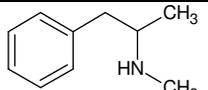
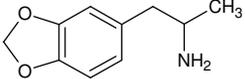
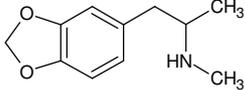
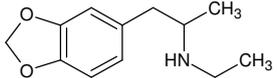
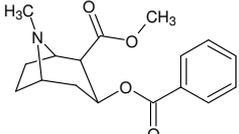
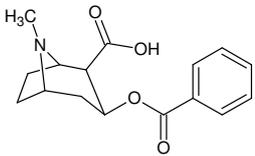
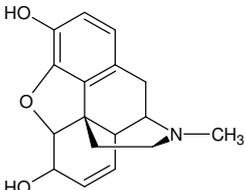
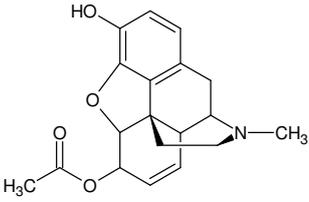
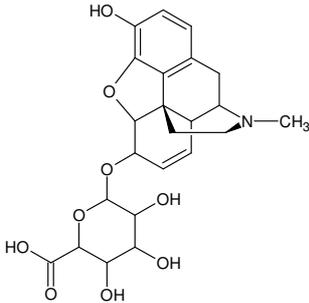
PARTE EXPERIMENTAL

A presença de drogas ilícitas em corpos aquáticos surgiu como preocupação ambiental há menos de uma década. O impacto causado por essas substâncias à biota de um corpo aquático ainda não foi avaliado e é uma questão a ser elucidada. Para que isso ocorra é necessário avaliar a concentração a que os organismos de um ecossistema estão expostos. Até hoje, poucos são os dados sobre a presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais, principalmente corpos aquáticos. Para que esses dados sejam gerados é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para cada matriz e para os analitos a serem estudados. Nesse trabalho, desenvolveu-se um método analítico baseado em SPE-LC-MS/MS para a determinação de algumas drogas ilícitas bem como alguns de seus metabólitos em amostras de água superficial. O método desenvolvido foi aplicado em uma campanha de amostragem na bacia do Rio Atibaia contemplando seis pontos amostrais. O perfil de consumo horário e diário dessas substâncias foi avaliado através da análise da água do Rio Atibaia ao longo de 24 h e ao longo de uma semana.

Preparo dos padrões das drogas ilícitas

Os padrões puros das drogas ilícitas foram fornecidos pelo Departamento de Polícia Federal do Brasil. Foram fornecidos padrões de substâncias ilícitas e alguns metabólitos: morfina (MOR), morfina-glucoronídeo (MOG), 6-acetilmorfina (6AM), anfetamina (ANF), metanfetamina (MAN), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN). A Tabela 16 mostra as estruturas químicas dessas substâncias. As soluções estoque de cada um dos compostos foram preparadas dissolvendo-se os compostos em metanol (MeOH). As soluções de trabalho foram preparadas quinzenalmente diluindo-se apropriadamente as soluções estoque, protegendo-as da luz com papel alumínio e conservadas em congelador (temperatura aproximada de -18°C) até o momento de utilização.

Tabela 16 – Estruturas químicas das drogas ilícitas e metabólitos.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
ANF		MAN	
MDA		MDMA	
MDEA		COC	
BEN		MOR	
6AM		MOG	

Nota: n.d. – não disponível

Desenvolvimento do método analítico por SPE e LC-MS/MS

O método cromatográfico foi desenvolvido no mesmo equipamento utilizado para a determinação dos antibióticos (Agilent 6410B). As fases móveis foram água Milli-Q (A) e MeOH (B), ambas contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão da fase móvel foi de 0,3 mL min⁻¹ e empregou-se uma coluna cromatográfica Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm, Agilent). O gradiente de eluição, em função da concentração da fase móvel B, foi: 10% por 4 min e aumento para 100% em 6 min. Esta composição foi mantida por 5 min. Entre cada corrida cromatográfica o sistema foi mantido à 10% de B por 7 min para recondição da coluna. A temperatura do compartimento contendo a coluna

foi mantida em 35°C por 10 min sendo, então, elevada a 45°C a um gradiente de 10°C min⁻¹ e mantida a 45°C por 4 min. Os analitos foram ionizados em uma fonte de electrospray no modo positivo. Nitrogênio ultrapuro foi utilizado na cela de colisão e como gás de arraste/secagem a uma vazão de 10 L min⁻¹ (350 °C). A pressão do nebulizador foi fixada em 55 psi e a voltagem RF na interface entre o espectrômetro e a fonte de ionização foi otimizada em 2.500 V. A Tabela 17 mostra as transições empregadas para quantificação e confirmação dos analitos bem como os parâmetros do espectrômetro de massas otimizados para a quantificação.

Desenvolvimento do método de extração (SPE)

Para a extração das drogas ilícitas de matrizes aquosas desenvolveu-se um método de SPE utilizando cartuchos poliméricos OASIS HLB (500 mg). Foram avaliados três valores de pH das amostras (2,5, 7,0 e 10,6). O procedimento consistiu em ajustar o pH da amostra e passá-la pelo cartucho de SPE a uma vazão aproximada de 5,0 mL min⁻¹. O condicionamento dos cartuchos de SPE foi realizado com 6 mL de MeOH, 6 mL de água Milli-Q e 6 mL de água Milli-Q com o pH ajustado. Após a passagem da amostra, secou-se o cartucho com fluxo de nitrogênio por 20 min. A eluição dos analitos foi realizada com 6 mL de MeOH. O extrato foi levado à secura sob fluxo de nitrogênio, redissolvido em 1000 µL da fase móvel inicial (10% de B) e analisado pelo método desenvolvido. Testes de recuperação foram realizados com amostras de água Milli-Q (500 mL) fortificadas com 50 ng L⁻¹ e com amostras do rio Atibaia (500 mL) fortificadas com 200 ng L⁻¹.

Determinação das drogas ilícitas em amostras da bacia do rio Atibaia

Após o desenvolvimento do método analítico, a próxima etapa do trabalho foi sua aplicação na determinação das drogas ilícitas em amostras reais coletadas em seis pontos na bacia do rio Atibaia a fim de se avaliar a qualidade das águas desse corpo aquático. Foi realizada uma única campanha de amostragem no

período de chuvas. Além disso, foram avaliadas as concentrações das drogas ilícitas nas águas da bacia do rio Atibaia em um ponto específico ao longo de 24 h através de coletas de amostras a cada 4 h. Avaliou-se também a concentração desses compostos ao longo de uma semana através de amostras coletadas diariamente.

Tabela 17 – Tempo de retenção, transições monitoradas, voltagem do fragmentador e energia de colisão.

Composto	t _R (min)	Fragmentador (V)	Transição	Energia de colisão (V)
MOG	0,4	130	462,2→286,2	30
			462,2→201,0	50
			462,2→165,1	60
MOR	0,6	130	286,1→152,1	70
			286,1→165,1	40
			286,1→128,1	70
ANF	1,9	70	136,1→91,1	10
			136,1→119,1	5
			136,1→65,1	40
MAN	2,2	80	150,1→91,2	20
			150,1→119,2	5
			150,1→65,2	35
MDA	2,4	70	180,1→163,1	5
			180,1→105,1	20
			180,1→77,1	40
MDMA	2,7	80	194,1→163,1	5
			194,1→135,1	20
			194,1→105,1	20
6AM	3,1	130	328,2→165,1	40
			328,2→181,2	40
			328,2→152,2	70
MDEA	4,1	90	208,1→163,1	5
			208,1→105,1	20
			208,1→77,2	50
BEN	7,9	110	290,2→168,2	15
			290,2→105,1	30
			290,2→77,2	35
COC	8,6	120	304,2→182,2	15
			304,2→105,1	30
			304,2→82,2	30

Os procedimentos de descontaminação da vidraria utilizada na coleta bem como o processo de amostragem empregado são os mesmos descritos no capítulo anterior sobre a determinação de antibióticos na bacia do Rio Atibaia. Os procedimentos de descontaminação da vidraria estão descritos na página 41 enquanto a descrição sobre os procedimentos de amostragem empregados estão na página 43.

Pontos amostrais

Amostras de água superficial foram coletadas em quatro pontos do rio Atibaia e em dois de seus afluentes (ribeirões Anhumas e Pinheiros) com a finalidade de se determinar a possível presença e a concentração das drogas ilícitas nas águas dessa bacia hidrográfica. Tais pontos são uma junção dos locais coletados nas campanhas de amostragem para a determinação de antibióticos, descritos nas páginas 41 e 42 e mostrados na Figura 14, com os locais coletados para a aplicação do MIP na determinação de fluoroquinolonas, descritos nas páginas 45 e 46 e mostrados na Figura 16. A Figura 34 mostra a localização dos pontos onde foram coletadas amostras para a determinação das drogas ilícitas enquanto a Tabela 18 fornece as coordenadas globais dos pontos amostrais.

Tabela 18 – Coordenadas globais dos cinco pontos amostrais distribuídos pela bacia do Rio Atibaia.

Ponto Amostral	Localização	Coordenada Sul	Coordenada Oeste
D1	Rio Atibaia	23°06'14"	46°32'44"
D2	Rio Atibaia	22°54'40"	46°57'22"
D3	Ribeirão Pinheiros	22°54'53"	46°57'39"
D4	Rio Atibaia	22°54'14"	46°58'27"
D5	Ribeirão Anhumas	22°46'10"	47°05'42"
D6	Rio Atibaia	22°44'44"	47°09'34"

Campanha de amostragem

Foi realizada uma única campanha de amostragem compreendendo os cinco pontos amostrais mostrados no mapa da Figura 34. Essa campanha foi

realizada em 30 de março de 2010, visando obter dados sobre a concentração das drogas ilícitas nas águas do rio Atibaia em um período de chuvas.

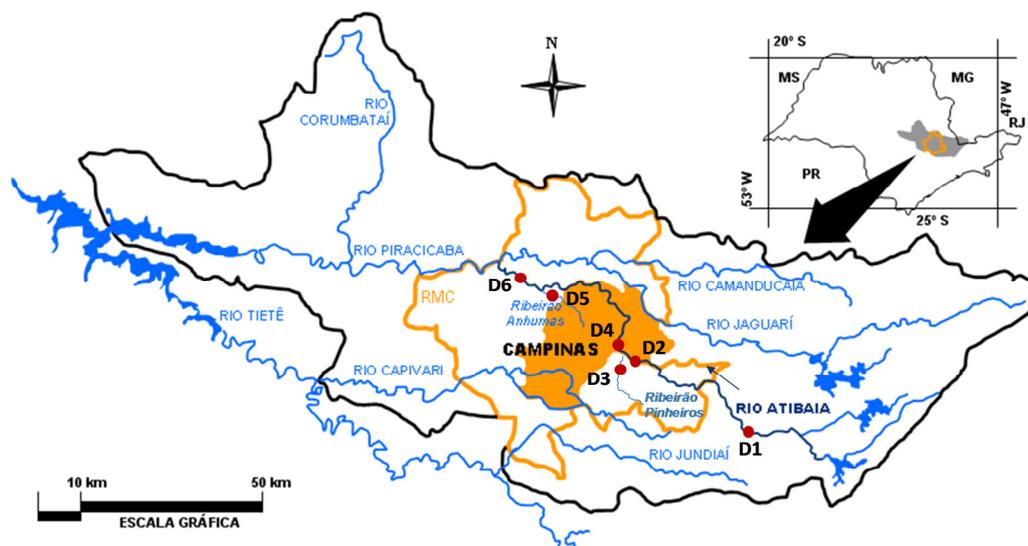


Figura 34 – Localização dos pontos amostrais ao longo do rio Atibaia e dos seus afluentes, os ribeirões Pinheiros e Anhumas. As setas indicam as direções dos cursos d'água.

Obtenção de um perfil 24 h das drogas ilícitas

Amostras de água do Rio Atibaia foram coletadas no ponto amostral número 2 (D4), localizado ao lado da Estação de Captação de água da cidade de Campinas. Foram realizadas amostragens a cada 4 h durante um período de 24 h, totalizando seis amostragens. A amostragem iniciou-se às 16 h do dia 22 de novembro de 2010 e terminou às 12 h do dia seguinte seguindo os procedimentos descritos anteriormente. Após coletadas, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, filtradas em filtros de fibra de vidro e em membranas de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm . Ajustou-se o pH de 500 mL de amostra filtrada para 2,5 através da adição de ácido clorídrico e realizou-se o procedimento de análise desenvolvido.

Obtenção de um perfil semanal das drogas ilícitas

Amostras de água do rio Atibaia foram coletadas diariamente no D4 ao longo de uma semana com o intuito de se avaliar a variação da concentração das drogas ilícitas durante os dias da semana. A coleta iniciou-se no dia 25 de janeiro de 2010 e terminou no dia 31 do mesmo mês. As amostras foram coletadas diariamente entre 15:30 e 16:00 seguindo o procedimento descrito anteriormente e analisadas de acordo com o método desenvolvido.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação sobre a presença, variação e comportamento de drogas ilícitas em matrizes ambientais é um dos tópicos mais atuais no cenário da Química Ambiental. Os resultados obtidos visaram estudar a presença, a variação na concentração e o aporte de algumas drogas ilícitas e de alguns metabólitos em amostras de água superficial do Rio Atibaia. Para isso, desenvolveu-se um método analítico baseado em SPE e LC-MS/MS para a quantificação dos analitos em amostras aquosas. Após validado, o método foi aplicado em amostras de água superficial coletadas no Rio Atibaia e em dois de seus afluentes no período de chuvas. Perfis de concentração de cocaína e de um metabólito ao longo de 24 horas e ao longo de sete dias foram obtidos fornecendo informações sobre o consumo dessa droga.

Desenvolvimento do método analítico por SPE-LC-MS/MS

O desenvolvimento e a otimização da separação cromatográfica e dos parâmetros do espectrômetro de massas seguiram os mesmos procedimentos descritos para a otimização dos parâmetros relacionados aos antibióticos apresentados no capítulo anterior. Em resumo, para cada droga ilícita, foram otimizados os fragmentos e as energias do fragmentador e da cela de colisão. Otimizou-se também a voltagem do capilar responsável pela inserção dos fragmentos no espectrômetro de massas. Os parâmetros otimizados encontram-se na Tabela 17. A Figura 35 mostra o cromatograma obtido no modo MRM para os 10 compostos contemplados no método cromatográfico.

Testes de recuperação

Foram realizados ensaios de recuperação empregando-se o método desenvolvido em amostras de água Milli-Q, contaminadas com 50 ng L⁻¹, e em amostras de água do rio Atibaia coletadas sob a ponte da rodovia SP-332,

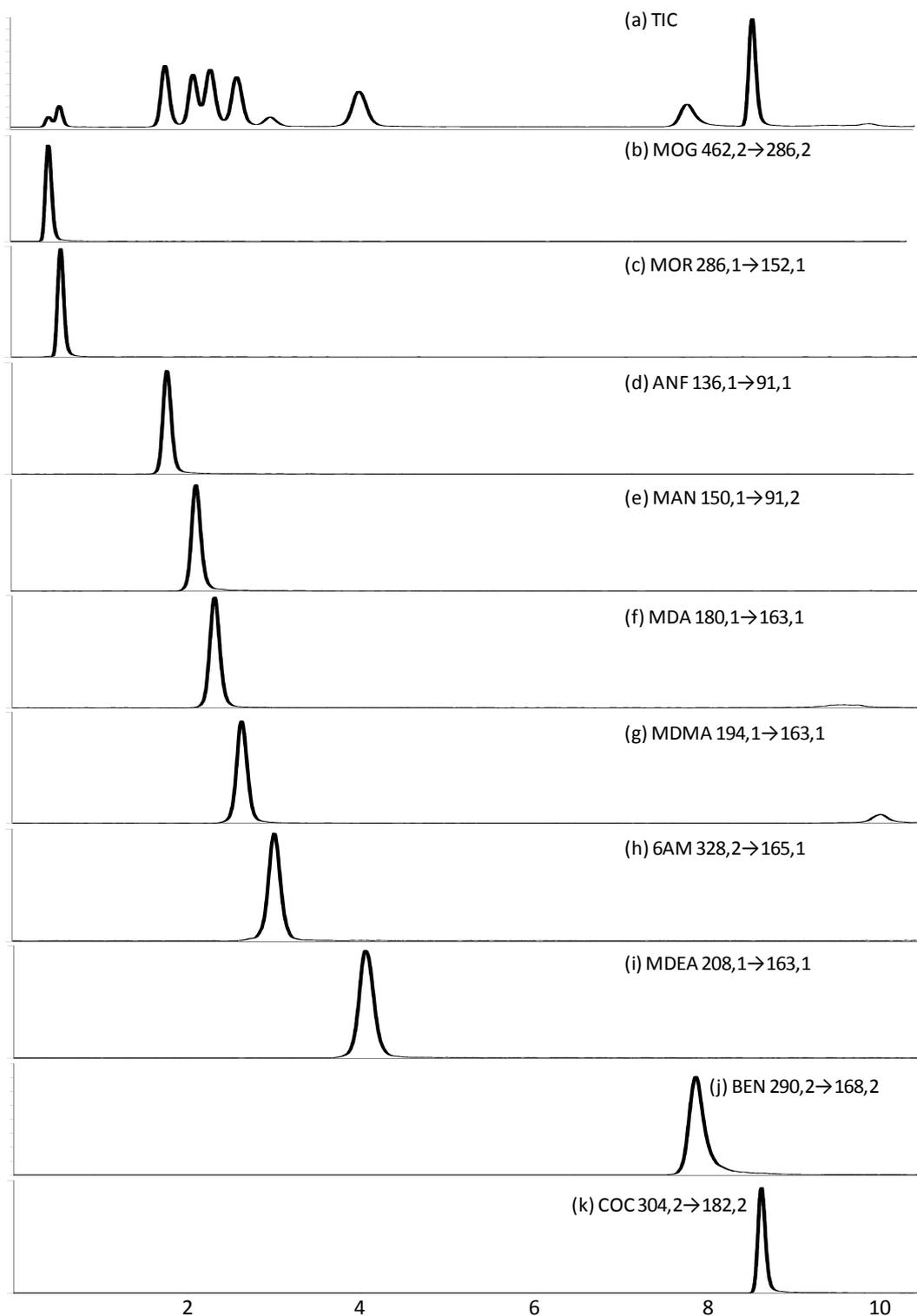


Figura 35 - Cromatogramas obtidos para um padrão das drogas ilícitas no modo MRM por LC-MS/MS. Cromatograma (a) total; (b) MOG; (c) MOR; (d) ANF; (e) MAN; (f) MDA; (g) MDMA; (h) 6AM; (i) MDEA; (j) BEN; (k) COC.

enriquecidas com 200 ng L⁻¹. A Figura 36 mostra a porcentagem de recuperação dos analitos em três valores de pH ajustados no ensaio com água Milli-Q enriquecida com 50 ng L⁻¹ das drogas.

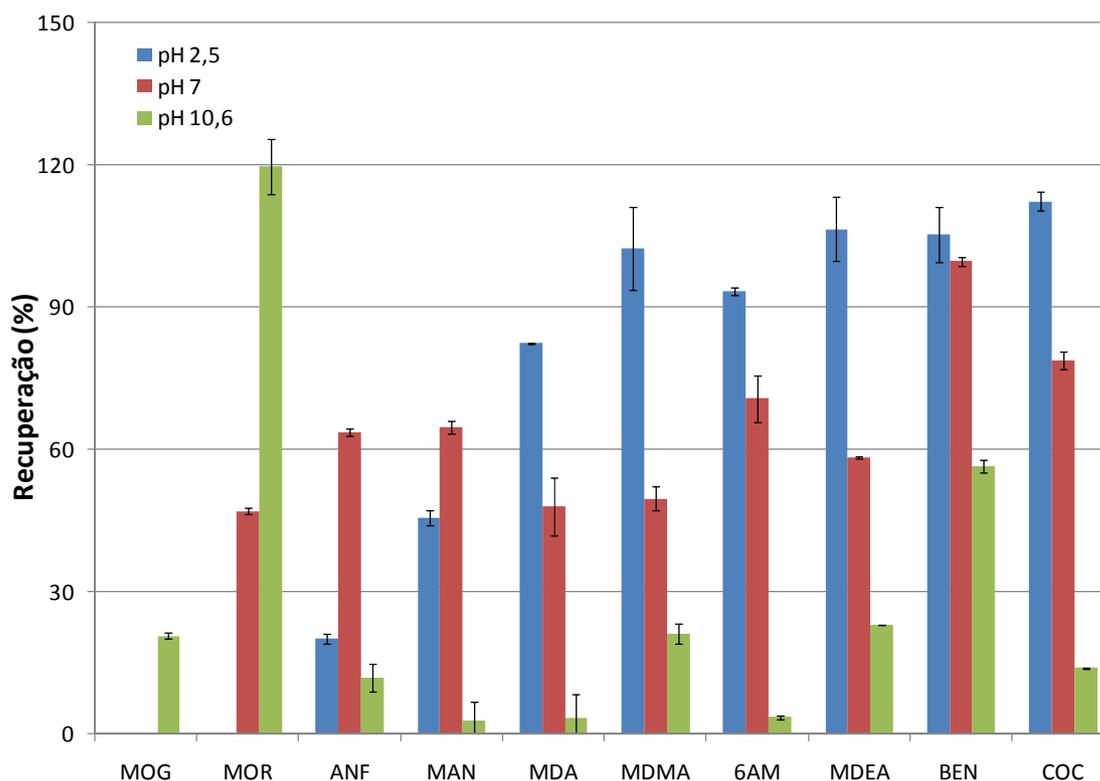


Figura 36 – Porcentagem de recuperação das drogas ilícitas em amostras de água Milli-Q enriquecidas com 50 ng L⁻¹ nos três valores de pH avaliados. As barras de erro representam os erros relativos.

Os dados da Figura 36 mostram que, com exceção da MOR, todos os outros compostos apresentaram baixa recuperação em pH elevado. A anfetamina e a metanfetamina apresentaram melhores recuperações em pH neutro. Entretanto, os derivados de anfetamina MDA, MDMA e MDEA apresentaram recuperações muito boas em pH ácido assim como 6AM, COC e BEN. Para esses seis compostos, recuperações acima de 80% foram obtidas. Van Nuijs *et al.* (2009c) observaram comportamento semelhante ao mostrado na Figura 36. Eles

obtiveram melhores recuperações em pH ácido do que em pH neutro para COC, BEM, MAN, ANF, MDMA e 6AM. De acordo com os resultados obtidos e considerando que o intuito do método proposto era quantificar o maior número de compostos em uma única etapa de extração, as amostras tiveram o pH ajustado em 2,5 antes de serem extraídas.

Figuras de mérito analítico

Alguns parâmetros analíticos foram calculados para o método proposto. A Tabela 19 mostra os Limites de Detecção (LQ) e de Quantificação (LQ) do equipamento e do método, a linearidade (expressa em termos do coeficiente de correlação de Pearson, r^2) e a faixa linear de trabalho. O método proposto foi reprodutivo, como mostrado pelo erro relativo na Figura 36, cujo valor máximo não ultrapassou 2,4% para a condição em meio ácido. Os LD e LQ são considerados baixos quando comparados com outros trabalhos da literatura, em especial para COC e BEN. Kasprzyk-Hordern *et al.* (2008) obtiveram LQ de 1 ng L⁻¹ para BEN e 0,3 ng L⁻¹ para COC utilizando SPE e UPLC. Huerta-Fontela *et al.* (2007) obtiveram LQ de 0,15 ng L⁻¹ para COC também empregando SPE e UPLC.

As curvas analíticas apresentaram linearidade, expressa por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r^2), com valores acima de 0,996. Para cada composto foram construídas três curvas analíticas compreendendo diferentes faixas de trabalho, como exemplificado no Anexo 1 para os antibióticos. Os coeficientes de correlação mostrados na Tabela 19 são referentes às curvas analíticas construídas para as menores faixas de trabalho.

Determinação das drogas ilícitas nas águas da bacia do Rio Atibaia

O método proposto para a quantificação das drogas ilícitas e de seus metabólitos em amostras de água superficial foi aplicado em amostras coletadas nos seis pontos amostrais distribuídos na bacia do Rio Atibaia gerando os primeiros resultados sobre a presença desses compostos em matrizes ambientais

brasileiras. De todos os analitos contemplados no método analítico, somente COC e BEN apresentaram concentrações acima do LQ. A Figura 37 mostra a concentração desses dois compostos nos diversos pontos amostrais da bacia do Rio Atibaia. Os valores mostrados na Figura 37 foram obtidos por calibração externa e não foram corrigidos pela porcentagem de recuperação mostrada na Figura 36.

Tabela 19 – Figuras de mérito do método proposto para a determinação de drogas ilícitas em águas superficiais.

Composto	LD_{equip} (pg)	LQ_{equip} (pg)	LD_{met} (ng L⁻¹)	LQ_{met} (ng L⁻¹)	Faixa linear (ng L⁻¹)	r²
MOG	2	8	0,8	3,2	3,2-160	0,996
MOR	2	4	0,8	1,6	1,6-160	0,998
ANF	2	8	0,8	3,2	3,2-160	0,998
MAN	2	12	0,8	4,8	4,8-160	0,999
MDA	8	12	3,2	4,8	4,8-160	0,998
MDMA	8	16	3,2	6,4	6,4-160	0,997
6AM	2	4	0,8	1,6	1,6-160	0,997
MDEA	2	4	0,8	1,6	1,6-160	0,998
BEN	0,8	2	0,3	0,8	0,8-160	0,997
COC	0,2	0,4	0,08	0,2	0,2-160	0,999

Nota: Para cada composto foram construídas três curvas analíticas contemplando toda a faixa linear. O coeficiente de correlação mostrado corresponde à curva analítica para as menores concentrações.

A Figura 37 mostra que os afluentes do Rio Atibaia, pontos D3 e D5, apresentam as maiores concentrações de BEN e de COC. O Ribeirão Anhumas (D5) apresenta a maior concentração do metabólito enquanto o Ribeirão Pinheiros (D3) apresenta maior concentração de COC. Esses dois corpos aquáticos são bastante impactados pelo aporte de esgoto bruto e de efluentes de ETE (CETESB, 2009). Como a presença desses compostos está diretamente relacionada ao aporte de esgoto, é natural que ambos os corpos aquáticos apresentem concentrações maiores dos dois compostos (Zuccato e Castiglioni, 2009).

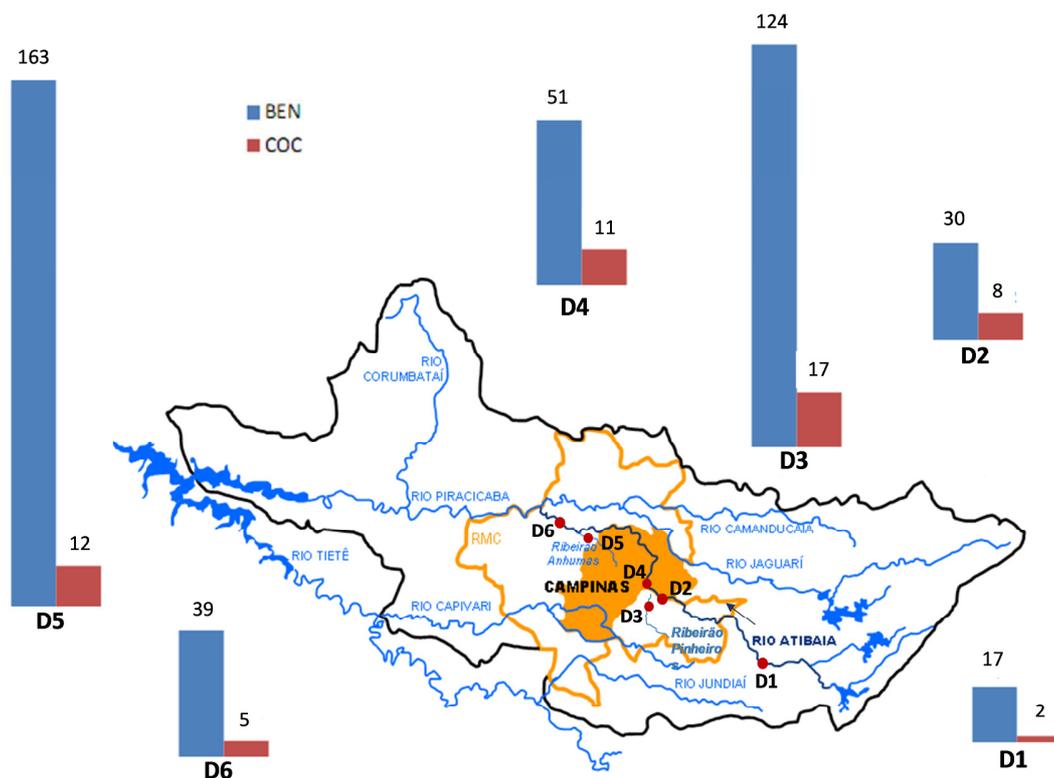


Figura 37 – Concentração (ng L⁻¹) de benzoilecgonina (BEN - azul) e de cocaína (COC – vermelho) nos pontos amostrais distribuídos ao longo da bacia do Rio Atibaia.

Com relação aos pontos localizados no Rio Atibaia, nota-se que conforme o rio flui por regiões com maior concentração urbana, há um aumento na concentração de ambos os compostos. As menores concentrações foram determinadas no município de Atibaia (D1). Ao chegar próximo à cidade de Campinas (D2), à montante do aporte do Ribeirão Pinheiros, a concentração de BEN sofre um aumento de 71% e a de COC, 333%. No ponto amostral localizado ao lado da estação de captação de água de Campinas (D3), à jusante do aporte do Ribeirão Pinheiros, há um novo aumento na concentração dessas substâncias. Esse ponto é o que apresenta as maiores concentrações tanto de BEN como de COC. Por fim, após percorrer um longo caminho e receber o aporte do Ribeirão Anhumas, há um pequeno declínio na concentração de ambos os compostos no ponto localizado sob ponte da rodovia SP-332 (D6).

Para avaliar o grau de contaminação do Rio Atibaia bem como de seus dois afluentes é necessário uma comparação com outros corpos aquáticos. A Tabela 20 mostra as concentrações de BEN e de COC em diversos rios de países europeus. Os dados da Tabela 20 mostram que as concentrações de BEN e de COC obtidas nos rios da bacia do Rio Atibaia estão na mesma ordem de magnitude das encontradas em diversos corpos aquáticos. De maneira geral, os corpos que apresentam as maiores concentrações na Tabela 20 são riachos e ribeirões em locais à jusante do aporte de efluentes de ETE. Essa observação corrobora os resultados obtidos para os ribeirões Pinheiros e Anhumas. Os rios apresentam concentrações menores do que corpos aquáticos com menor vazão devido à diluição ocasionada pelo grande volume de água desses corpos aquáticos.

Tabela 20 – Concentração (ng L⁻¹) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) em corpos de água superficial de diversos países.

Corpo aquático	BEN	COC	Referência
Rio Atibaia e 2 tributários	17-163	2-17	Este trabalho
Rio Pó (Itália)	25	1,2	Zuccato <i>et al.</i> (2005)
Rio Sar (Espanha)	316	30	González-Mariño <i>et al.</i> (2010)
Rio Ebro e tributários (Espanha)	1,4-346	0,4-59,2	Postigo <i>et al.</i> (2010)
Rios Taff e Ely (Reino Unido)	<1-123	<0,3-7	Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> (2008)
Rio Llobregat (Espanha)	50	10	Huerta-Fontela <i>et al.</i> (2008)
5 rios (Bélgica)	8-520	2-115	Van Nuijs <i>et al.</i> (2009a)

A partir das concentrações de BEN e de COC em matrizes aquosas é possível obter informações importantes sobre o consumo de cocaína. Após ser consumida e metabolizada, a cocaína é excretada pelo usuário atingindo o sistema de esgotamento sanitário. A razão entre a concentração de COC e BEN (COC/BEN) no momento de excreção tem sido uma maneira de se empregar as concentrações mensuradas na matriz analisada com a finalidade de se estimar a maneira como a cocaína atingiu essa matriz. Ou seja, a partir da razão COC/BEN é possível estimar se a cocaína foi consumida ou despejada pura na matriz, seja ela esgoto ou água superficial. Apesar dessa abordagem parecer simples, estipular o limite da razão de ambos os compostos no momento da excreção não

é trivial. A metabolização é função de diversos parâmetros: (a) quantidade de cocaína consumida, (b) rota de administração, (c) características individuais do usuário (idade, metabolismo, pH da urina) (Gheorghe *et al.*, 2008). Kasprzyk-Hordern (2009) definiram que a razão COC/BEN é de 0,2 (9% da cocaína é excretada como COC e 45%, como BEN). Já Postigo *et al.* (2010) indicam que há uma faixa de razão entre 0,02 e 0,27 devido às diferenças existentes entre os usuários na excreção dos compostos (1-9% para COC e 35-54% para BEN). Há ainda autores que trabalham com razões até o valor de 0,75 (Van Nuijs *et al.*, 2009b). A Tabela 21 mostra as razões calculadas para cada um dos seis pontos amostrais a partir dos valores da Figura 37.

Tabela 21 – Razões entre as concentrações de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) para cada um dos pontos amostrais.

Ponto amostral	D1	D2	D3	D4	D5	D6
COC/BEN	0,11	0,27	0,13	0,22	0,08	0,13

A partir dos valores mostrados na Tabela 21 é possível afirmar que a presença de COC e de BEN nas amostras da bacia do Rio Atibaia é oriunda do uso de cocaína. Em amostras de águas naturais, a COC é passível de sofrer hidrólise gerando como produto a BEN. Gheorge *et al.* (2008) observaram que 90% da COC degradaram após 24h. Além da hidrólise, fotodegradação e biodegradação também provocam diminuição da concentração de COC (Postigo *et al.*, 2008). Essas reações de degradação provocam uma diminuição na razão COC/BEN, já que há diminuição da concentração de COC e aumento na concentração de BEN. Portanto, a análise da razão COC/BEN deve ser realizada com precaução e considerando esses possíveis desvios provocados pela degradação do composto parental.

A partir das concentrações mostradas na Figura 37 e da vazão do rio é possível calcular a carga desses compostos. Tentou-se obter a vazão do rio Atibaia e de seus dois tributários na data da amostragem para se calcular o aporte desses compostos no dia de coleta. No entanto, só foi possível a obtenção da vazão do rio Atibaia no ponto D4, que foi de 72,43 m³ s⁻¹ (Umbuzeiro, 2010). Com

isso, o aporte de BEN nesse ponto, que é ao lado da estação de captação de água da cidade de Campinas, foi de 318 g d⁻¹ e o de COC, 71,3 g d⁻¹. Com esses valores, extrapolando esse cálculo para um ano, tem-se que passam por este ponto do Rio Atibaia 116 kg do metabólito e 26 kg de cocaína anualmente.

Obtenção de um perfil 24h de concentração

A obtenção de um perfil horário da concentração das drogas ilícitas em amostras de água superficial pode indicar se há um aporte contínuo dessas substâncias ao meio. Como esse aporte está diretamente relacionado ao uso dessas substâncias, a variação nesse aporte é um indicativo da variação no uso das drogas ao longo do período avaliado. Foi obtido um perfil de concentração das drogas ilícitas no ponto amostral D4 ao longo de 24 h. Amostras de água do Rio Atibaia foram coletadas a cada quatro horas durante o período de um dia. De todos os analitos contemplados no método analítico, somente BEN e COC apresentaram concentrações acima do LQ. A Figura 38 mostra o perfil de concentração desses dois compostos ao longo de 24 h.

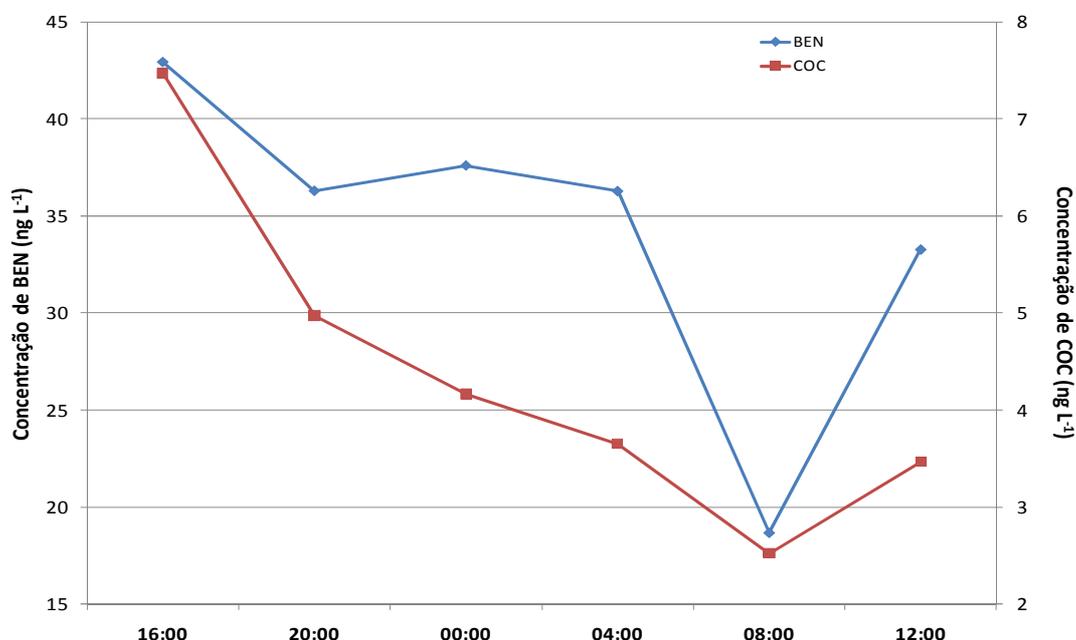


Figura 38 - Concentração de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) no Rio Atibaia, ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de 24 h.

A Figura 38 mostra que os perfis de concentração de BEN e de COC são bastante parecidos. De maneira geral, há um pico de concentração às 16 h seguido de um declínio da concentração até às 8 h, horário em que há a menor concentração dos compostos. Após esse horário, observa-se um aumento na concentração de COC e de BEN. A diferença existente entre os dois perfis é que o valor da concentração de BEN entre 20 h e 4 h mantém-se praticamente constante nesse período enquanto a concentração de COC declina praticamente linearmente até às 8 h.

O maior consumo de substâncias ilícitas ocorre no período noturno. No entanto, a maior concentração de ambos os compostos foi observada às 16 h. Essa diferença aparece devido ao tempo de residência das substâncias no sistema de esgotamento sanitário, estações de tratamento (quando existe) e o tempo de transporte pelo corpo aquático até atingir o ponto de amostragem. A vazão do Rio Atibaia no ponto amostral D4 nos dias em que as amostras foram coletadas era de 13,84 e 11,42 m³ s⁻¹. A partir desses valores de vazão e das concentrações de BEN e de COC mostradas na Figura 38 estimou-se a carga dessas substâncias que passam pelo ponto de coleta. Os valores calculados encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Carga (g d⁻¹) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nos horários coletados.

Composto	16:00	20:00	0:00	4:00	8:00	12:00
BEN	51,3	43,4	37,1	35,8	18,4	32,8
COC	8,93	5,95	4,11	3,60	2,49	3,42

Os dados da Tabela 22 mostram que há uma variação na carga dessas substâncias de 279% para BEN e de 359% para COC. A média das cargas calculadas a partir dos dados da Tabela 22 foi de 36,5 g d⁻¹ para BEN e de 4,70 g d⁻¹. A partir desses valores, a carga anual dessas substâncias é de 13,4 kg de BEN e de 1,7 kg de COC. Esses valores são menores dos que os calculados para esse mesmo ponto anteriormente. Essa variação é reflexo das diferentes

concentrações dos compostos, e conseqüentemente das diferenças no consumo da cocaína, e das diferentes vazões do rio entre as duas amostragens.

Obtenção de um perfil semanal de concentração

Além do perfil horário, que reflete a variação do consumo das drogas ao longo de um dia, o perfil construído com a concentração dos compostos ao longo de sete dias mostra a variação do consumo dessas substâncias ilícitas ao longo de uma semana. Para a obtenção desse perfil, amostras de água foram coletadas no Rio Atibaia ao lado da estação de captação de água de Campinas (D4) entre 15:30 e 16:00, horário que apresentou a maior concentração dos compostos no perfil 24 h. A Figura 39 mostra o perfil semanal obtido para COC e BEN, únicos compostos que apresentaram concentração acima do LQ.

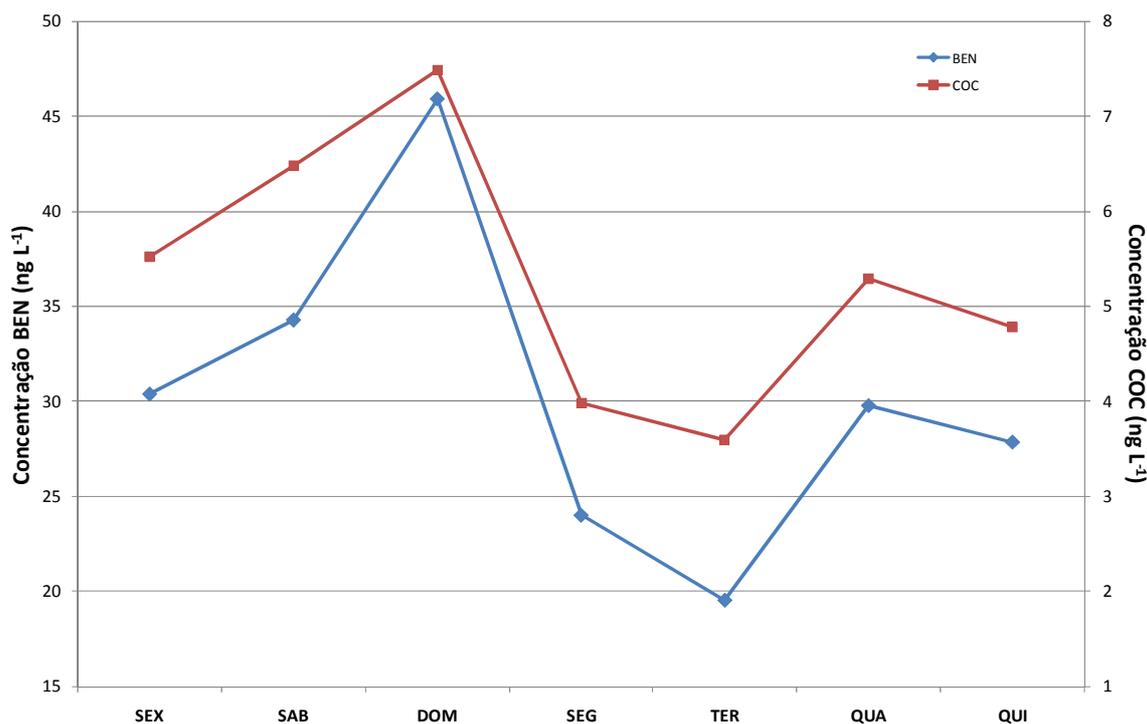


Figura 39 - Concentração de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BEN) no Rio Atibaia, ao lado da estação de captação de água de Campinas, ao longo de sete dias.

Os perfis de concentração de COC e de BEN mostrados na Figura 39 apresentam o mesmo comportamento. Há um pico de concentração na amostra

coletada no domingo, que representa a cocaína consumida no fim de semana, seguido de um declínio na concentração de ambos os compostos durante os dias de semana. A concentração de COC variou entre 3,60 e 7,50 ng L⁻¹ e a de BEN variou entre 19,5 e 45,9 ng L⁻¹.

Avaliações de consumo de cocaína durante os dias da semana a partir da análise de matrizes ambientais já foram desenvolvidas. Zuccato *et al.* (2008b) analisaram esgoto bruto de Milão, Itália, e encontraram maior concentração de COC e de BEN nas amostras coletadas no sábado. Nesse mesmo estudo, eles observaram que as concentrações de morfina (metabólito excretado após uso de heroína) e de 11-nor-9-carbóxitetrahidrocanabinol (metabólito excretado após uso de maconha) não apresentam variações expressivas durante os dias da semana indicando uso periódico e não eventual. Van Nuijs *et al.* (2009a) determinaram a concentração de BEN e de COC em amostras de esgoto bruto coletadas em ETE da Bélgica durante 19 dias consecutivos e também observaram picos durante o fim de semana e concentrações menores durante os dias da semana. Já Huerta-Fontela *et al.* (2008) quantificaram COC e BEN em amostras de água superficial coletadas na entrada de uma estação de tratamento de água espanhola e observaram concentrações maiores na amostra coletada na segunda-feira, refletindo o consumo de cocaína durante o fim de semana. Esse resultado é ligeiramente diferente do mostrado na Figura 39 uma vez que fatores como uso da droga pela população, tempo de residência do esgoto no sistema de esgotamento sanitário e na ETE e tempo de residência no corpo aquático até o momento da coleta influem no resultado final. Além disso, a falta de tratamento de esgoto no Brasil diminui o tempo de residência dos compostos até atingir o ponto de coleta.

CONCLUSÕES

O consumo de substâncias ilícitas na sociedade é atualmente um dos maiores problemas sociais existentes e está surgindo também como um possível problema ambiental. A presença de drogas ilícitas em matrizes ambientais, principalmente águas superficiais, surge como uma questão associada ao aporte de efluentes de ETE e, em países com baixo índice de tratamento de esgoto como o Brasil, está associada ao aporte de esgoto bruto.

Devido à complexidade das matrizes e da importância da determinação dessas substâncias, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis é uma necessidade quando se visa estudar um corpo aquático. Desenvolveu-se um método analítico para a quantificação de 10 substâncias ilícitas em matrizes aquosas. A aplicação desse método em amostras de água da bacia do Rio Atibaia forneceu os primeiros resultados sobre a presença de substâncias ilícitas em matrizes ambientais brasileiras. A análise da água do Rio Atibaia e de dois de seus afluentes (ribeirões Anhumas e Pinheiros) mostrou que esses corpos aquáticos apresentam a presença de cocaína e de seu metabólito, benzoilecgonina. Concentrações mais elevadas foram mensuradas nos dois afluentes do rio Atibaia, corpos aquáticos que são receptores de esgoto bruto e efluente de ETE. As concentrações de cocaína e de benzoilecgonina aumentam no Rio Atibaia conforme o rio atinge regiões com maior densidade populacional. O ponto no rio Atibaia que apresentou as maiores concentrações desses compostos localiza-se ao lado da estação de captação de água da cidade de Campinas, apresentando uma carga anual estimada de 116 kg do metabólito e de 26 kg de cocaína.

O perfil horário de concentração das drogas ilícitas no Rio Atibaia mostrou que há maior concentração dessas substâncias por volta das 16 h refletindo o consumo noturno dessas substâncias. O perfil semanal de concentração mostrou que há um pico de concentração no final de semana evidenciando o consumo recreativo de cocaína nesses dias.

CAPÍTULO 5

ESTUDO DE CASO: PRESENÇA DE DROGAS
ILÍCITAS EM ETE DE BRASÍLIA (DF) E ESTIMATIVA
DE USO DE COCAÍNA PELA POPULAÇÃO

INTRODUÇÃO

A repressão internacional aos entorpecentes iniciou-se oficialmente a partir da Conferência de Xangai, em 1909 (UNODC, 2009). Desde então, há um enorme esforço de diversos setores da sociedade no combate ao uso e ao tráfico das mais variadas substâncias entorpecentes existentes. Um indicador importante relacionado ao combate das drogas ilícitas é a quantidade de substância que circula ou é consumida em uma cidade, estado ou país. Atualmente, esse dado é obtido de forma indireta através de extrapolações de pesquisas sócio-epidemiológicas (van Nuijs *et al.*, 2009a). Tais pesquisas utilizam dados de apreensões de drogas, registros de internações médicas, pesquisas populacionais e entrevistas com usuários. No entanto, tais métodos são obtidos de maneira muito onerosa e lenta e não proporcionam um conhecimento em tempo real sobre o consumo e/ou tráfico de entorpecentes em uma região (Postigo *et al.*, 2008).

Em 2001, Daughton sugeriu que seria possível estimar o consumo de drogas em uma determinada população através da análise dos seus metabólitos presentes no esgoto (Daughton, 2001). Utilizando a porcentagem de excreção de um metabólito, sua concentração no esgoto, a vazão de aporte de esgoto em uma ETE e a população servida pela ETE é possível calcular o consumo *per capita* da droga em estudo. A primeira aplicação dessa técnica foi realizada em 2005 em amostras de esgoto da Itália (Zuccato *et al.*, 2005). Desde então, diversos trabalhos foram realizados gerando resultados sobre o consumo de drogas ilícitas na Irlanda (Bones *et al.*, 2007), Espanha (Huerta-Fontela *et al.*, 2007), Bélgica (van Nuijs *et al.*, 2009b), Estados Unidos (Bartelt-Hunt *et al.*, 2009), entre outros.

OBJETIVOS

Esse trabalho foi uma parceria formada entre o Laboratório de Química Ambiental (LQA) da UNICAMP, o Laboratório de Química Ambiental da UnB, o Departamento de Polícia Federal do Brasil (DPF) e a Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB) visando estimar:

1. A quantidade de drogas ilícitas consumidas no Distrito Federal (DF) através da quantificação dessas substâncias no esgoto sanitário bruto.
2. A eficiência das ETE do DF na remoção desses compostos.

PARTE EXPERIMENTAL

O método desenvolvido anteriormente e discutido no Capítulo 3 foi aplicado em amostras de esgoto bruto e tratado do DF coletadas em seis ETE. Após a quantificação, calculou-se a quantidade de droga consumida pela população servida pelas ETE e a eficiência dessas estações na remoção desses compostos da matriz original.

Amostragem

Foram realizadas duas campanhas de amostragem de esgoto bruto (16 e 17 de março de 2010 e 1 e 2 de Junho de 2010). Amostras compostas do esgoto foram coletadas em quatro ETE na primeira campanha (Asa-Sul, Asa-Norte, Paranoá e Riacho-Fundo) e em seis ETE na segunda (as quatro anteriores mais Melchior e Samambaia). A amostragem composta foi realizada utilizando um amostrador automático refrigerado (Teledyne Isco, Lincoln, NE, EUA) e ficou sob responsabilidade da CAESB. Amostras do período diurno (D) foram coletadas entre 7 h e 19 h e amostras representativas do período noturno (N) foram coletadas entre 19 h e 7 h. Após coletadas, as amostras foram mantidas a 4°C por, no máximo, três dias antes de serem submetidas ao processo de extração. A Tabela 23 mostra as características das ETE e as vazões nos dias de coleta enquanto a Figura 40 mostra as regiões e cidades satélites contempladas na amostragem.

Extração e determinação das drogas ilícitas

O procedimento de extração e de determinação dos analitos foi o mesmo mostrado no Capítulo 4 com uma única alteração. O volume de esgoto bruto

extraído foi de 100 mL e o de efluente da ETE foi de 400 mL ao invés de 500 mL extraídos para amostras de água superficial.

Tabela 23 – Características das estações de tratamento de esgoto amostradas.

ETE	Cidades ou regiões servidas pela ETE	População (mil hab.) ¹	Vazão (L s ⁻¹)	
			Março	Junho
Melchior	Ceilândia, Taguatinga	641,9	na ²	768
Asa-Sul	Asa Sul, Lago Sul, Guará, Núcleo Bandeirantes, Candangolândia, Águas Claras, Cruzeiro	522,8	1.063	1.549
Samambaia	Samambaia	188,2	na	1.016
Asa-Norte	Asa Norte, Lago Norte	117,3	491	648
Paranoá	Paranoá, Itapoã	71,4	56	106
Riacho-Fundo	Riacho Fundo I	68,6	52	44

Nota: 1 – Secretaria da Saúde do DF (2010); 2 – não amostrado

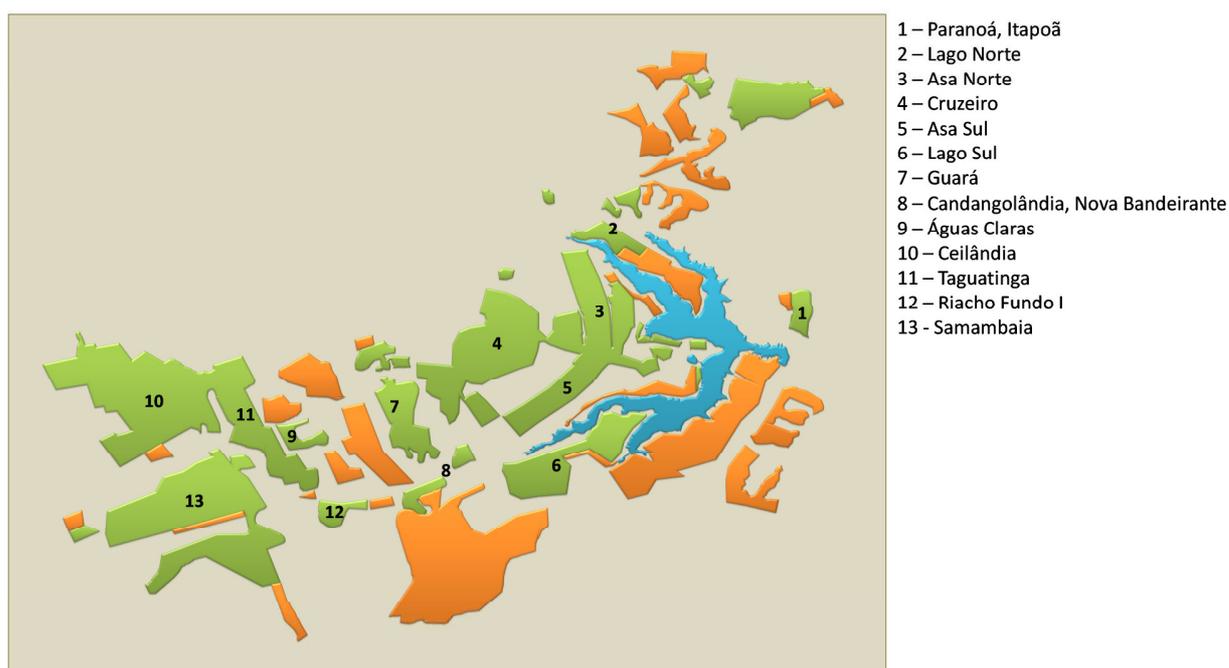


Figura 40 – Região do Distrito Federal contemplada na amostragem. As regiões azul, verde e laranja representam o Lago Paranoá, regiões com coleta e tratamento de esgoto e regiões sem tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de drogas ilícitas em esgoto doméstico e o posterior uso desse dado para se estimar o consumo dessas substâncias pela população servida pela rede coletora é uma ferramenta que tem surgido como uma alternativa viável e cujo resultado fornecido pode ser muito mais próximo do consumo real. Além desse resultado, a determinação desses compostos nos diversos estágios do tratamento de esgoto presente em uma ETE fornece informações sobre a eficiência das estações em remover esses compostos dessa matriz antes do seu lançamento em um corpo receptor.

A cidade de Brasília e algumas cidades satélites possuem uma rede coletora de esgotos que abrange mais de 90% da população e, por esse motivo, foi escolhida pelo DPF em conjunto com o LQA, a UnB e a CAESB como uma região modelo para a aplicação dessa abordagem de estimativa de consumo de drogas ilícitas a partir das suas concentrações em esgoto doméstico bruto. Dados sobre a remoção desses compostos no processo de tratamento de esgoto também foram gerados através da quantificação das drogas ilícitas no efluente das ETE estudadas.

Efeito da matriz

O efeito de matriz é definido como uma interferência no processo de análise provocado por um ou mais constituintes da matriz (Skoog *et al.*, 2004). Em espectrometria de massas empregando uma fonte de ionização do tipo *electrospray* esse efeito de matriz é observado como um aumento ou supressão na formação dos íons (Castiglioni *et al.*, 2008). Realizou-se um estudo simples para se determinar se havia efeito de matriz nos extratos gerados. Tal estudo baseou-se na quantificação das drogas no extrato bruto obtido do processo de SPE e em um extrato obtido a partir da diluição em 10 vezes do extrato bruto. As Figuras 41 e 42 mostram as concentrações de BEN e de COC, respectivamente,

obtidas para as amostras de esgoto bruto a partir da determinação no extrato bruto e no extrato diluído.

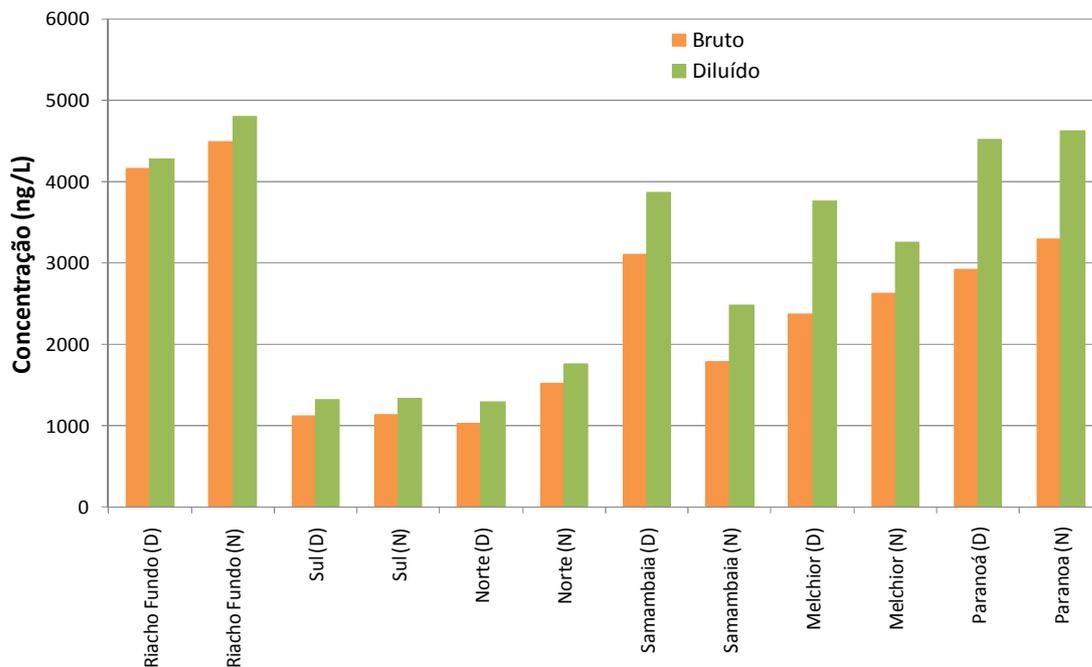


Figura 41 - Concentração (ng L^{-1}) calculada de benzoilecgonina no esgoto bruto através da análise do extrato bruto e do extrato diluído 10 vezes.

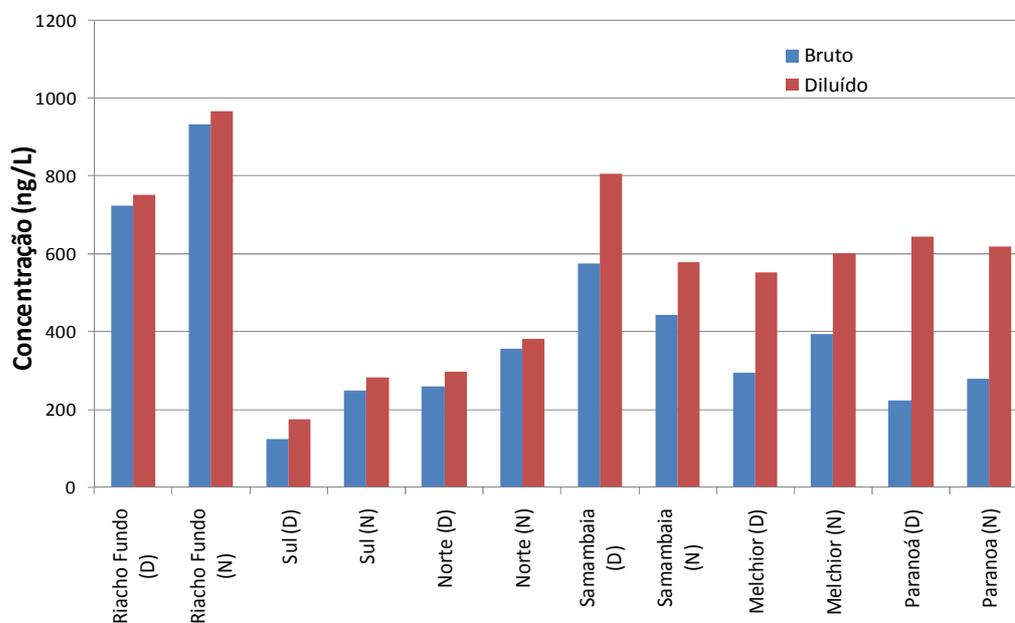


Figura 42 - Concentração (ng L^{-1}) calculada de cocaína no esgoto bruto através da análise do extrato bruto e do extrato diluído 10 vezes.

Os resultados mostrados nas Figuras 41 e 42 evidenciam a existência de um efeito de matriz em todas as amostras analisadas. Esse efeito é minimizado quando o extrato diluído é utilizado para a quantificação dos analitos de interesse. As amostras oriundas das ETE Samambaia, Melchior e Paranoá são as que apresentam maior variação entre a concentração obtida a partir do extrato bruto e do extrato diluído. A variação na concentração de COC na amostra Paranoá (D) quando se emprega o extrato diluído ao invés do extrato bruto na quantificação ultrapassa 200%. A partir dos resultados mostrados nas Figuras 42 e 43 e visando diminuir eventuais erros associados ao efeito de matriz, todos os extratos obtidos a partir do processo de extração SPE foram diluídos 10 vezes antes de serem submetidas à análise instrumental.

Esgoto bruto

A quantificação de drogas ilícitas em esgoto bruto foi realizada em duas campanhas ocorridas em Março e em Junho de 2010. Nas duas campanhas de amostragem só BEN e COC apresentaram concentrações acima dos LQ. Somente esse fato já é um indicativo de que a cocaína, seja ela inalada ou fumada na forma de *crack*, é a droga que apresenta maior consumo dentre todas as contempladas no método analítico. As concentrações desses dois compostos determinadas para cada ETE nas duas campanhas estão mostrados na Tabela 24.

A Tabela 24 mostra que as concentrações obtidas na campanha realizada em Junho de 2010 apresentam concentrações maiores do que as obtidas em Março do mesmo ano. Além de fatores inerentes às amostras, como vazão da ETE nos dias de coleta e o próprio consumo de cocaína nessas datas, uma diferença existente entre as duas campanhas é o fato de que a extração dos compostos na campanha de Março foi realizada pela Polícia Federal em condições diferentes das empregadas no desenvolvimento do método. De maneira geral não há grandes diferenças entre as amostras coletadas nos períodos diurno e noturno, com exceção das amostras de Março da ETE Paranoá e da ETE

Samambaia em Junho. As ETE com maior concentração dos compostos foram Paranoá e Riacho Fundo em ambas as campanhas. Outra informação importante é que a concentração do metabólito foi sempre maior que a de COC, refletida em uma razão COC/BEN menor que 1.

Tabela 24 – Concentração (ng L^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Março e Junho de 2010.

Amostra (ETE/ D ou N ¹)	Março			Junho		
	BEN	COC	COC/BEN	BEN	COC	COC/BEN
Melchior/D	-	-	-	3.753	553	0,15
Melchior/N	-	-	-	3.251	601	0,18
Asa-Sul/D	742	392	0,53	1.330	174	0,13
Asa-Sul/N	675	410	0,61	1.343	282	0,21
Samambaia/D	-	-	-	3.866	805	0,21
Samambaia/N	-	-	-	2.477	579	0,23
Asa-Norte/D	771	536	0,69	1.293	298	0,23
Asa-Norte/N	663	646	0,97	1.761	382	0,22
Paranoá/D	9.717	3.690	0,38	4.513	645	0,14
Paranoá/N	2.432	1.921	0,79	4.625	617	0,13
Riacho-Fundo/D	1.915	222	0,12	4.282	752	0,18
Riacho-Fundo/N	1.288	705	0,55	4.796	966	0,20

Nota: 1 - Amostras compostas para o período diurno (D) e noturno (N).

A razão COC/BEN é uma informação importante como já discutido no Capítulo 3. Ela pode inferir se os compostos presentes no esgoto são oriundos do consumo da cocaína ou do aporte da droga antes de ser consumida. Usualmente, a razão COC/BEN menor que 0,27 (Postigo *et al.*, 2010) indica o aporte de cocaína consumida, apesar de existir autores que trabalham com uma razão limite de 0,75 (Van Nuijs *et al.*, 2009b). Portanto, do ponto de vista forense, a razão COC/BEN é fundamental para a identificação do aporte de drogas *in natura* no sistema de esgotamento sanitário podendo ser utilizada pelas forças de inteligência policial como uma ferramenta de localização de laboratórios de refino ou manuseio dessas substâncias.

A partir da concentração dos compostos no esgoto bruto mostrada na Tabela 24 e da vazão da ETE na data de amostragem mostrada na Tabela 23,

calculou-se o aporte diário dos compostos mostrado na Tabela 25. Como apenas a campanha de Junho de 2010 foi realizada da maneira como o método foi desenvolvido, somente ela será considerada nos cálculos e discussões a seguir.

Tabela 25 – Carga (g d^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Junho de 2010.

Amostra (ETE/ D ou N¹)	BEN	COC
Melchior/D	249	36,7
Melchior/N	216	39,9
Asa-Sul/D	178	16,0
Asa-Sul/N	180	37,7
Samambaia/D	339	70,7
Samambaia/N	217	50,8
Asa-Norte/D	72,4	16,7
Asa-Norte/N	98,6	21,4
Paranoá/D	41,3	5,91
Paranoá/N	42,4	5,65
Riacho-Fundo/D	16,3	2,86
Riacho-Fundo/N	18,2	3,67

Nota: 1 - Amostras compostas para o período diurno (D) e noturno (N).

A partir da concentração de BEN no esgoto doméstico é possível realizar uma estimativa do consumo de cocaína pela população servida pela ETE em estudo. Essa abordagem foi conceitualmente desenvolvida por Daughton em 2001 (Daughton, 2001) e aplicada pela primeira vez por Zuccato e colaboradores (Zuccato *et al.*, 2005). Para que a estimativa seja realizada são necessárias quatro informações: a concentração de BEN no esgoto, a vazão de entrada de esgoto bruto na ETE, a população servida pela ETE e um fator de conversão. A primeira informação é determinada experimentalmente, a segunda mensurada na entrada de ETE enquanto a terceira é estimada ou obtida através de pesquisa domiciliar. A última informação, o fator de conversão, foi originalmente calculado por Zuccato *et al.* (2005) e está explicitado em Zuccato *et al.* (2008b). O fator de conversão leva em consideração a razão molar entre o composto parental (COC) e o metabólito (BEN) e a porcentagem de excreção do metabólito pelo ser humano. Considerando um aporte de metabólito de $1 \text{ mg/d}/1000 \text{ hab.}$, a porcentagem

excretada de BEN como 45% e a razão de massa molar entre COC/BEN como 303/289 calcula-se o fator de conversão da seguinte maneira:

$$\frac{1}{0,45} \times \frac{303}{289} = 2,33$$

O fator de conversão de Zuccato e colaboradores leva em consideração que a cocaína é consumida na forma de base livre, forma em que a cocaína encontra-se pura. No entanto, a cocaína para ser inalada passa por uma reação com ácido clorídrico que transforma a base livre em cloridrato de cocaína (Maldaner, 2010). Considerando esse fato, há uma mudança no fator de conversão, já que a razão molar entre a droga consumida e o metabólito passa a ser 339/289. Dessa maneira, o fator de conversão quando se considera o cloridrato de cocaína é 2,61.

Com os dados de aporte mostrados na Tabela 25 e os fatores de conversão, calculou-se a quantidade de cocaína consumida pela população servida pelas ETE. Os valores encontrados considerando o consumo na forma de base livre e na forma de cloridrato de cocaína estão na Tabela 26.

Tabela 26 – Estimativa do consumo de cocaína (kg ano^{-1}) a partir das concentrações de benzoilecgonina nas amostras de esgoto bruto coletadas no Distrito Federal em Junho de 2010.

ETE	COC	COC.HCl
Melchior	199	223
Asa-Sul	152	170
Samambaia	256	287
Asa-Norte	71,7	80,3
Paranoá	35,6	39,9
Riacho-Fundo	14,3	16,0

Os resultados da Tabela 26 mostram que a ETE Samambaia é a que apresenta o maior aporte de cocaína, seguida pela ETE Melchior e pela Asa-Sul. A quantidade de cocaína consumida pela população dessas ETE durante um ano é de cerca de 728 kg considerando a cocaína base livre e de 816 kg considerando o cloridrato de cocaína. As seis estações contempladas nesse trabalho coletam o

esgoto de cerca de 72% da população do DF. Extrapolando o consumo dessas ETE para todo o DF, tem-se um consumo anual estimado de 1.011 kg de cocaína base livre e de 1.133 kg de cloridrato de cocaína. Considerando os valores mostrados na Tabela 26 e a população atendida pelas ETE é possível estimar o consumo de cocaína a cada 1.000 habitantes. A Tabela 27 mostra esse consumo estimado bem como a quantidade de doses consumidas considerando que a cocaína seja consumida na forma de pó (cloridrato de cocaína) e que cada dose possui cerca de 100 mg da droga (UNODC, 2005).

Tabela 27 – Estimativa de consumo de cocaína pela população servida pelas ETE a partir do aporte de cloridrato de cocaína e extrapolação para todo o Distrito Federal (DF).

ETE	g ano⁻¹ 1000 hab⁻¹	Doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹
Melchior	347	3.470
Asa-Sul	325	3.250
Samambaia	1.525	15.250
Asa-Norte	685	6.850
Paranoá	559	5.590
Riacho-Fundo	233	2.330

Considerando a extrapolação da quantidade de cloridrato de cocaína consumida (1.133 kg ano⁻¹) e a população de 2.455.903 habitantes no DF (Brasília, 2011) tem-se uma estimativa de consumo de cloridrato de cocaína de 461 g ano⁻¹ 1000 hab⁻¹, o que representa um consumo de 4,6 doses ano⁻¹ hab⁻¹. Deve-se levar em consideração que a droga consumida pelos usuários é diluída pelos traficantes e que, dessa maneira, a quantidade efetivamente comercializada de cocaína é maior do que a estimada a partir da concentração do metabólito no esgoto.

A abordagem desenvolvida por Zuccato e colaboradores e aplicada aqui para o Distrito Federal surge como uma ferramenta rápida para estimar o consumo de qualquer droga ilícita uma vez que emprega um método direto de estimativa. Obviamente, essa abordagem apresenta incertezas associados e deve sempre ser considerada como uma estimativa. Com relação a essa abordagem para a cocaína, alguns pontos devem ser considerados. O método de estimativa leva em

consideração a concentração de BEN no esgoto e que o consumo da cocaína é realizado exclusivamente através da inalação do pó. Sabe-se que a BEN é também o principal metabólito do uso do *crack*. A quantidade de metabólito oriunda do consumo dessa outra forma de cocaína deve ser considerada. Para tanto, estimativas a partir de algum metabólito exclusivo de uma das formas de consumo deve ser desenvolvida para que um resultado mais exato seja obtido. Outro ponto relacionado ao metabólito é a porcentagem de excreção de 45% considerada por Zuccato. Essa porcentagem varia de indivíduo para indivíduo, entre as formas de uso e com o tempo decorrido de uso da droga. Com relação à forma de uso, a abordagem empregando o cloridrato de cocaína desenvolvida nesse trabalho corrige uma incoerência existente na abordagem anterior, já que a cocaína inalada está sempre na forma de cloridrato. Por fim, mas menos importante já que se trata de uma estimativa, deve-se considerar o fato de que o consumo em uma determinada região da cidade não é necessariamente oriundo da população dessa área já que algumas regiões de uma cidade são rotineiramente usadas para comercialização e consumo de drogas.

Esgoto tratado

Estações de tratamento de esgoto são projetadas para a remoção de patógenos e de matéria orgânica. Os diversos compostos orgânicos usados diariamente pela população e que atingem o sistema de esgotamento sanitário muitas vezes não são removidos nas ETE e, por esse motivo, aportam no ambiente, geralmente em corpos aquáticos superficiais. Os processos de remoção dessas substâncias em uma ETE são a adsorção ao lodo e a biodegradação (Tambosi *et al.*, 2010). A eficiência na remoção está associada às propriedades físico-químicas das moléculas, tais como coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}), presença de grupos reativos, biodegradabilidade, etc., como também das características do processo empregado na ETE, como tipo do tratamento (aeróbio ou anaeróbio), tempo de residência, idade do lodo, temperatura, etc. Remoções

variando de aproximadamente 0% a maiores que 99,9%, dependendo do composto, já foram publicadas (Tambori *et al.*, 2010).

A eficiência na remoção de COC e de BEN das ETE onde as amostras foram coletadas foi avaliada na campanha de amostragem realizada em Junho de 2010. Para isso, a concentração dessas substâncias foi determinada no esgoto bruto e no efluente gerado após o tratamento. A Tabela 24 mostra a concentração de COC e de BEN no esgoto bruto e a Tabela 28 mostra a concentração desses compostos no efluente de cada uma das seis ETE contempladas nesse estudo.

Tabela 28 – Concentração (ng L^{-1}) de benzoilecgonina (BEN) e de cocaína (COC) nas amostras de efluente das ETE e porcentagem de remoção.

ETE	Concentração (ng L^{-1})		Remoção (%)	
	BEN	COC	BEN	COC
Melchior	560	25,4	84,0	95,6
Asa-Sul	296	24,2	77,8	89,4
Samambaia	21,7	1,63	99,3	99,8
Asa-Norte	133	2,58	91,3	99,2
Paranoá	30,5	<LQ	99,3	>99,9
Riacho-Fundo	<LQ	1,18	>99,9	99,9

A Tabela 28 mostra que remoções acima de 77% foram constatadas para BEN e acima de 89% para COC nas seis ETE estudadas. Castiglioni *et al.* (2006b) determinaram remoções maiores que 99,9% para ambos os compostos em ETE da cidade de Losedo e de 82% para BEN e 95% para COC em ETE de Lugano, ambas na Itália. Van Nuijs *et al.* (2009a) determinaram remoções variando entre 93% e 99% para BEN e entre 93% e maiores que 99,9% para COC em seis ETE belgas. Portanto, as remoções encontradas para as ETE do Distrito Federal não diferem das determinadas para ETE de outros países.

Pela Tabela 28, a melhor eficiência na remoção de COC e de BEN foi encontrada na ETE Riacho Fundo e a pior na ETE Asa-Sul. Essas duas ETE, assim como a ETE Asa-Norte, são baseadas em sistema de lodo ativado com tratamento terciário. Essa observação indica que o sistema de tratamento aplicado não é uma variável importante nesse cenário. No entanto, devido à persistência

desses compostos ao tratamento empregado nas ETE faz-se necessário a implantação de processo de pós-tratamento visando a eliminação completa dessas substâncias do efluente para que esse possa ser descartado ao corpo receptor sem provocar danos à biota e até mesmo aos seres humanos.

CONCLUSÕES

A aplicação do método proposto anteriormente para a quantificação de drogas ilícitas e alguns metabólitos em amostras líquidas propiciou a obtenção da primeira estimativa do consumo de cocaína a partir da concentração de um metabólito no esgoto bruto. A concentração de cocaína no esgoto bruto coletado na entrada das ETE variou entre 222 e 3.690 ng L⁻¹ para a amostragem realizada em Março de 2010 e entre 174 e 966 ng L⁻¹ para a campanha de Junho de 2010. Já a concentração de benzoilecgonina variou entre 663 e 9.717 ng L⁻¹ para as amostras de Março de 2010 e entre 1.293 e 4.796 ng L⁻¹ para a amostragem de Junho de 2010. Foi proposta uma nova abordagem de cálculo levando em consideração a forma em que a cocaína é inalada. Por essa nova proposta, o consumo anual de cloridrato de cocaína no Distrito Federal é estimado em 1.133 kg. Isso representa um consumo anual de 461 mg de cloridrato de cocaína por habitante do DF.

A análise do efluente das ETE em conjunto com as concentrações de entrada dos analitos nas estações permitiu calcular a remoção desses compostos pela ETE. Remoções superiores a 77% para a benzoilecgonina e maiores que 89% para a cocaína foram obtidas. Nas ETE em estudo, observou-se que o tipo do sistema de tratamento dado ao esgoto não representou uma variável importante na remoção das drogas ilícitas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A presença dos chamados contaminantes emergentes em matrizes ambientais tem tomado e tomará bastante espaço no cenário científico. Dentre os contaminantes emergentes, os antibióticos apresentam grande relevância devido à possibilidade de desenvolvimento de resistência a essas substâncias por microorganismos patogênicos expostos a baixas concentrações. Esse trabalho gerou os primeiros resultados sobre a presença de antibióticos em águas superficiais brasileiras. As concentrações determinadas são baixas em termos absolutos, atingindo o valor máximo de 29 ng L⁻¹ para a cefalexina. No entanto, os efeitos associados à exposição contínua da biota a baixas concentrações não foram elucidados e devem ser estudados. Os resultados evidenciaram que o aporte de afluentes que recebem esgoto bruto e tratado piora a qualidade das águas do Rio Atibaia com relação à concentração de antibióticos. Dentre os pontos amostrados ao longo do Rio Atibaia, as maiores concentrações foram obtidas no ponto localizado próximo da captação de água da cidade de Campinas e na captação de água da cidade de Atibaia.

Junto da necessidade de resultados mais confiáveis devido às baixas concentrações encontradas no ambiente vem o desenvolvimento de novas técnicas e materiais analíticos. A aplicação de polímeros de impressão molecular (MIP) como sorventes em processos de extração em fase sólida (SPE) é uma alternativa surgida e que foi testado em amostras de água da bacia do rio Atibaia. O MIP para fluoroquinolonas desenvolvido pela Universidad Complutense de Madri mostrou-se bastante eficiente indicando que os Ribeirões Pinheiros e Anhumas possuem concentrações de fluoroquinolonas uma ordem de magnitude superiores às encontradas no Rio Atibaia.

Assim como os antibióticos, as drogas ilícitas também aparecem como contaminantes emergentes em matrizes ambientais. Esse trabalho gerou os primeiros resultados da presença desses compostos em águas superficiais brasileiras. Os Ribeirões Anhumas e Pinheiros, por apresentarem aporte de esgoto bruto e efluente de ETE, possuem concentração maior de cocaína e de seu principal metabólito, benzoilecgonina. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que há um aumento na concentração desses compostos nas águas do

Rio Atibaia ao passar por regiões mais povoadas. Os perfis de concentração de cocaína e de benzoilecgonina obtidos a partir da coleta da água do Rio Atibaia em um ponto ao lado da estação de captação de água de Campinas mostraram picos de concentração no período da tarde, relativo ao consumo noturno da droga, e no fim de semana.

A aplicação do método desenvolvido para a quantificação de drogas ilícitas em matrizes aquosas propiciou a obtenção da primeira estimativa de consumo de cocaína por uma população através da quantificação de um metabólito no esgoto bruto. A estimativa baseada no consumo de cloridrato de cocaína, e não da base livre, foi uma mudança proposta que fornece um resultado mais exato. Em parceria com a Polícia Federal, com a Universidade de Brasília e com a Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal estimou-se um consumo anual de 1.133 kg de cloridrato de cocaína em todo o Distrito Federal. A remoção de cocaína e de seu metabólito observada nas ETE foi superior a 77% para a benzoilecgonina e maior que 89% para o composto parental.

Esse trabalho fornece bases para que diversas medidas possam ser tomadas pelos órgãos competentes, ao prover uma visão geral da concentração de alguns antibióticos e drogas ilícitas em corpos aquáticos superficiais do Estado de São Paulo. Trabalhando um cenário preventivo ideal, agências ambientais deveriam determinar a presença de bactérias resistentes em seus pontos de monitoramento em conjunto com a concentração dos antibióticos para elucidar o real impacto da presença desses compostos em corpos aquáticos. O monitoramento de algas susceptíveis à ação dos antibióticos também pode ser realizado para esse fim. Já as concessionárias de água usadas no abastecimento público deveriam implementar um programa rotineiro para determinar a concentração desses compostos na água servida à população. Ações para minimizar o aporte desses compostos em matrizes aquáticas devem ser implementadas, tais como a universalização da coleta e tratamento de esgoto e uma regulamentação do descarte de medicamentos. No entanto, o Brasil sofre com a carência de investimentos no setor ambiental por parte do Estado tornando essas medidas ainda distantes da realidade.

Com relação às drogas ilícitas, esse trabalho pioneiro mostra que há uma exposição crônica direta da biota a essas substâncias. Ensaio visando observar os efeitos causados por essas substâncias na faixa de concentração mensurada devem ser realizados. A quantificação de drogas ilícitas em esgoto bruto é uma ferramenta que deve ser considerada pelas políticas públicas por fornecer informações de cunho social e policial importantes, como quantidade de droga em circulação e localização de áreas de refino. Além disso, o cruzamento com dados sociais e econômicos das populações com maior consumo poderia ser implementado como ferramenta para que se tenha um melhor investimento de recursos voltados à prevenção do uso, educação e saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI A.; Monti S. (2003) Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones; *Chem. Soc. Rev.*; **32**; 238-250.

ALCOCK R.E.; Sweetman A.; Jones K.C. (1999) Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physicochemical properties; *Chemosphere*; **38**; 2247-2262.

ANVISA (2010) Resolução da diretoria colegiada – RDC N^o 44, disponível em www.anvisa.gov.br, acessada em dezembro de 2010.

ASHTON D.; Thomas K.V.; Hilton M. (2004) Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom; *Sci. Total Environ.*; **333**; 167-184.

AVISAR D.; Primor O.; Gozlan I.; Mamane H. (2010) Sorption of sulfonamides and tetracyclines to montmorillonite clay; *Water Air Soil Pollut.*; **209**; 439-450.

BAIRD C., *Química Ambiental*, 2^a Edição, Bookman, São Paulo, Brasil, 2002.

BAQUERO F.; Martínez J.-L.; Cantón R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments; *Curr. Opin. Biotech.*; **19**; 260-265.

BARTELT-HUNT S.L.; Snow D.D.; Damon T.; Shockley J.; Hoagland K. (2009) The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska; *Environ. Pollut.*; **157**; 786-791.

BENDZ D.; Paxéus N.A.; Ginn T.R.; Loge F.J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden; *J. Hazard. Mater.*; **122**; 195-204.

BENITO-PEÑA E.; Urraca J.L.; Sellergren B.; Moreno-Bondi M.C. (2008) Solid-phase extraction of fluoroquinolones from aqueous samples using a water-compatible stoichiometrically imprinted polymer; *J. Chromatogr. A*; **1208**; 62–70.

BERSET J.-D.; Brenneisen R.; Mathieu C. (2010) Analysis of illicit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography – Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS); *Chemosphere*; **81**; 859-866.

BLACKWELL P.A.; Holten-Lützhøft H.C.; Ma H.-M.; Halling Sørensen B.; Boxall A.B.A.; Kay P. (2004) Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid phase

extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection; *J. Chromatogr. A*; **1045**; 111–117.

BONES J.; Thomas K.V.; Paull B. (2007) Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abused pharmaceuticals; *J. Environ. Monit.*; **9**; 701-707.

BOUND J.P.; Voulvoulis N. (2006) Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment; *Water Res.*; **40**; 2885-2892.

BRAIN R.A.; Hanson M.L.; Solomon K.R.; Brooks B.W. (2008) Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks; *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*; **192**; 67-115.

BRASÍLIA (2011) Portal do cidadão, disponível em <http://www.gdf.df.gov.br/045/04501018.asp>, acessada em Março de 2011.

BROWN K.D.; Kulis J.; Thomson B.; Chapman T.H.; Mawhinney D.B. (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico; *Sci. Total Environ.*; **366**; 772-783.

BROWNSTEIN M.J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **90**; 5391-5393.

BUENO M.J.M, Agüera A., Gómez M.J., Hernando M.D., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R. (2007) Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater; *Anal. Chem.*; **79**; 9372-9384.

BUERGE I.J.; Buser H.R.; Poiger T.; Muller M.D. (2006) Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters; *Environ. Sci. Technol.*; **40**; 7242-7250.

CARDOZA L.A.; Knapp W.; Larive K.; Belden B.; Lydy M.; Graham W. (2005) Factors affecting the fate of ciprofloxacin in aquatic field systems; *Water Air Soil Pollut.*; **161**; 383-398.

CARVALHO V.M., *Pesquisa dos indicadores de uso de crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal*, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2006, 108p.

CASTIGLIONI S.; Bagnati R.; Fanelli R.; Pomati F.; Calamari D.; Zuccato E. **(2006)** Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy; *Environ. Sci. Technol.*; **40**; 357-363.

CASTIGLIONI S.; Zuccato E.; Crisci E.; Chiabrando C.; Fanelli R.; Bagnati R.; **(2006b)** Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *Anal. Chem.*; **78**; 8421-8429.

CASTIGLIONI S.; Zuccato E.; Chiabrando C.; Fanelli R.; Bagnati R. **(2008)** Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water; *Mass Spectrom. Rev.*; **27**; 378-394.

CETESB, *Bacia do rio Atibaia: Relatório técnico preliminar*, Cetesb, São Paulo, Brasil, **1999**, 142 p.

CETESB, *Relatório de águas superficiais no Estado de São Paulo 2008*, Cetesb, São Paulo, Brasil, **2009**, 531 p.

CETESB, *Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2009*, CETESB, São Paulo, Brasil, **2010**, 310 p.

CHA J.M.; Yang S.; Carlson K.H. **(2006)** Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry.; *J. Chromatogr. A*; **1115**; 46–57.

CHERLET M.; De Backer P.; Croubels S. **(2006)** Control of the keto-enol tautomerism of chlortetracycline for its straightforward quantitation in pig tissues by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*.; **1133**; 135-141.

CHICO J.; Rúbies A.; Centrich F.; Companyó R.; Prat M.D.; Granados M. **(2008)** High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*.; **1213**; 189-199.

CHRISTIAN T.; Schneider R.J.; Färber H.A.; Skutlarek D.; Meyer M.T.; Goldbach H.E. **(2003)** Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters; *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*; **31**; 36-44.

CORCORAN J.; Winter M.J.; Tyler C.R. **(2010)** Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish; *Crit. Rev. Toxicol.*; **40**; 287-304.

CPTEC **(2011)** <http://www.cptec.inpe.br>, acessada em janeiro de 2011.

DAUGHTON C.G. (2001) Illicit drugs in municipal sewage: proposed new non-intrusive tool to heighten public awareness of societal use of illicit/abused drugs and their potential for ecological consequences. Em: Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Scientific and Regulatory Issues. (Daughton CG, Jones-Lepp TL, eds); Symposium Series 791, Washington, EUA, American Chemical Society, 348–364.

DAVEY P.; Ferech M.; Ansari F.; Muller A.; Goossens H. (2008) Outpatient antibiotic use in the four administrations of the UK: cross-sectional and longitudinal analysis; *J. Antimicrob. Chemother.*; **62**; 1441-1447.

DE ALDA M.J.L; Díaz-Cruz S.; Petrovic M.; Barceló D. (2003) Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment; *J. Chromatogr. A*; **1000**; 503-526.

DE MADUREIRA P.R. (2006) *Comunicação pessoal*.

DEMAIN A.L. (2009) Antibiotics: Natural products essential to human health; *Med. Res. Rev.*; **29**; 821-842.

DEMEESTERE K.; Petrovic M.; Gros M.; Dewulf J.; Van Langenhove H.; Barceló D. (2010) Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; **396**; 825-837.

DOMAGK G. (1935) Chemotherapy of bacterial infections; *Angew. Chem.*; **48**; 657-667.

DRUGBANK (2010) <http://www.drugbank.ca/>, acessada em agosto de 2010.

ESSACK S.Y. (2001) The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases; *Pharmaceut. Res.*; **18**; 1391-1399.

FATTA D.; Nikolau A.; Achilleos A.; Meriç S. (2007) Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater; *Trends Anal. Chem.*; **26**; 515-533.

FICK J.; Soderstrom H.; Lindberg R.H.; Phan C.; Tysklind M.; Larsson D.G.J. (2009) Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production; *Environ. Toxicol. Chem.*; **28**; 2522-2527.

FLEMING A. (1929) The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.; *Br. J. Exp. Pathol.*; **10**; 226-236.

FOCAZIO M.J.; Barnes K.K.; Furlong E.T.; Kolpin D.W.; Meyer M.T.; Zaugg S.D.; Barber L.B.; Thurman M.E. (2008) A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources; *Sci. Total Environ.*; **402**; 201-216.

FREUD S. (1884) Über coca; *Zentralblatt für die ges. Therapie*; **2**; 289-314.

GALLEN M.; Lamotte-Brasseur J.; Raquet X.; Dubus A.; Nonnaie D.; Knox J. R.; Frère J.-M. (1995) The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases; *Biochem. Pharmacol.*; **49**; 1171-1178.

GARCÍA-GALÁN M.J.; Villagrasa M.; Díaz-Cruz M.S.; Barceló D. (2010) LC-QqLITMS analysis of nine sulfonamides and one of their acetylated metabolites in the Llobregat River basin. Quantitative determination and qualitative evaluation by IDA experiments; *Anal. Bioanal. Chem.*; **397**; 1325-1334.

GARCÍA-RODRÍGUEZ J.A.; Gomis M.; Gonzalez J.; Prieto J., *Historia de la antibioterapia*, Ediciones Doyma, Madrid, Espanha, 1997, disponível em <http://www.sepeap.org/archivos/libros/antibioticos/1.pdf>, acessada em Junho de 2010.

GARRISON A.W.; Pope J.D.; Allen F.R.; GC/MS Analysis of organic compounds in domestic wastewaters. Em: *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water* (Keith C.H., ed). Ann Arbor, MI, EUA; Ann Arbor Science Publishers; **1976**; 517-556.

GHEORGHE A.; van Nuijs A.; Pecceu B.; Bervoets L.; Jorens P.G.; Blust R.; Neels H.; Covaci A. (2008) Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; **391**; 1309-1319.

GOLDSTEIN R.A.; DesLauriers C.; Burda A.M. (2009) Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review; *Dis. Mon.*; **55**; 6-38.

GOLET E.M.; Alder A.C.; Giger W. (2002) Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland; *Environ. Sci. Technol.*; **36**; 3645-3651.

GOMEZ M.J.; Petrovic M.; Fernandez-Alba A.R.; Barceló D. (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters; *J. Chromatogr. A*; **1114**; 224-233.

GONZALEZ L.S.; Spencer J.P. (1998) Aminoglycosides: a practical review; *Am. Fam. Physician*; **58**; 1811-1820.

GONZÁLEZ-MARIÑO I.; Quintana J.B.; Rodriguez I.; Cela R. (2010) Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1217**; 1748-1760.

GOOSSENS H.; Ferech M.; Coenen S.; Stephens P. (2007) Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries; *Clin. Infect. Dis.*; **44**; 1091-1095.

GRACIA-LOR E.; Sancho J.V.; Hernández F. (2010) Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1217**; 622-632.

GRUJIĆ S.; Vasiljević T.; Laušević M. (2009) Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography ion trap tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1216**; 4989-5000.

HAMAD B. (2010) The antibiotics market; *Nat. Rev. Drug Discov.*; **9**; 675-676.

HAO C.; Lissemore L.; Nguyen B.; Kleywegt S.; Yang P.; Solomon K. (2006) Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; **384**; 505-513.

HAO C.Y.; Clement R.; Yang P. (2007) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment - a decade's activities; *Anal. Bioanal. Chem.*; **387**; 1247-1257.

HIGNITE C.; Azarnoff D.L. (1977) Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent; *Life Sci.*; **20**; 337-342.

HIRSCH R.; Ternes T.; Haberer K.; Kratz K.-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment; *Sci. Total Environ.*; **225**; 109-118.

HOLM J.V.; Rügge K.; Bjerg P.L.; Christensen T.H. (1995) Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark); *Environ. Sci. Technol.*; **29**; 1415-1420.

HOSHINA K.; Horiyama S.; Matsunaga H.; Haginaka J. (2009) Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1216**; 4957-4962.

HUERTA-FONTELA M.; Galceran M.T.; Ventura F. (2007) Ultrapformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters; *Anal. Chem.*; **79**; 3821-3829.

HUERTA-FONTELA M.; Galceran M.T.; Ventura F. (2008) Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant.; *Environ. Sci. Technol.*; **42**; 6809-6816.

HUERTA-FONTELA M.; Galceran M.T.; Ventura F. (2010) Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources; *J. Chromatogr. A*; **1217**; 4212-4222.

IBGE, *Atlas de Saneamento*, IBGE, Rio de Janeiro, **2004**, 151 p.

IBGE, Pesquisa Nacional do Saneamento Básico 2000, IBGE, Rio de Janeiro, **2002**, 397 p.

IBGE, Pesquisa Nacional do Saneamento Básico 2008, IBGE, Rio de Janeiro, **2010**, 219 p.

IMS Health (2010) IMS Forecasts Global Pharmaceutical Market Growth of 5-8% Annually through 2014; Maintains Expectations of 4-6% Growth in 2010, disponível em www.imshealth.com, acessado em agosto de 2010.

JONES-LEPP T.L.; Alvarez D.A.; Petty J.D.; Huckins J.N. (2004) Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography–electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; **47**; 427-439.

KARCH S.B. (1999) Cocaine: history, use, abuse; *J. R. Soc. Med.*; **92**; 393-397.

KAROLAK S.; Nefau T.; Bailly E.; Solgadi A.; Levi Y. (2010) Estimation of illicit drugs consumption by wastewater analysis in Paris area (France); *Forensic Sci. Int.*; **200**; 153-160.

KASPRZYK-HORDERN B.; Dinsdale R.M.; Guwy A.J. (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK; *Water Res.*; **42**; 3498-3518.

KASPRZYK-HORDERN B.; Dinsdale R.M.; Guwy A.J. (2009) Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment – Forensic applications of environmental data. Part 1: Estimation of the usage of drugs in local communities; *Environ. Pollut.*; **157**; 1773-1777.

KAWAGUCHI M.; Hayatsu Y.; Nakata H.; Ishii Y.; Ito R.; Saito K.; Nakazawa H.; **(2005)** Molecularly imprinted solid phase extraction using stable isotope labeled compounds as template and liquid chromatography-mass spectrometry for trace analysis of bisphenol A in water sample; *Anal. Chim. Acta*; **539**; 83-89.

KNAPP C.W.; Cardoza L.A.; Hawes J.N.; Wellington E.M.H.; Larive C.K.; Graham D.W. **(2005)** Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions; *Environ. Sci. Technol.*; **39**; 9140-9146.

KOLLER K. **(1884)** Über die Verwendung des Kokains zur Anästhesierung am Auge; *Wien Med. Wochenshr.*; **34**; 1276-1309.

KOLPIN D.W.; Furlong E.T.; Meyer M.T.; Thurman E.M.; Zaugg S.D.; Barber L.B.; Buxton H.T. **(2002)** Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance; *Environ. Sci. Technol.*; **36**; 1202-1211.

KOSONEN J.; Kronberg L. **(2009)** The occurrence of antihistamines in sewage waters and in recipient rivers; *Environ. Sci. Pollut. R.*; **16**; 555-564.

KRIZ D.; Ramstrom O.; Mosbach K. **(1997)** Molecular imprinting - New possibilities for sensor technology; *Anal. Chem.*; **69**; 345A-349A

KUCH H.M.; Ballschmiter K. **(2001)** Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range; *Environ. Sci. Technol.*; **35**; 3201-3206.

KULSHRESTHA P.; Giese Jr R.F.; Aga D.S. **(2004)** Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil; *Environ. Sci. Technol.*; **38**; 4097-4105.

KÜMMERER K. **(2003)** Significance of antibiotics in the aquatic environment; *J. Antimicrob. Chemoth.*; **52**; 5-7.

LE NOIR M.; Plieva F.M.; Mattiasson B. **(2009)** Removal of endocrine-disrupting compounds from water using macroporous molecularly imprinted cryogels in a moving-bed reactor; *J. Sep. Sci.*; **32**; 1471-1479.

LEE H.-B.; Peart T.E.; Svoboda M.L.; Backus S. **(2009)** Occurrence and fate of rosuvastatin, rosuvastatin lactone, and atorvastatin in Canadian sewage and surface water samples; *Chemosphere*; **77**; 1285-1291.

LIETAVA J. **(1992)** Medicinal-Plants in a middle paleolithic grave Shanidar-IV.; *J. Ethnopharmacol.*; **35**; 263-266.

LINDSEY M.E.; Meyer M.; Thurman E.M. (2001) Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials, in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry; *Anal. Chem.*; **73**; 4640-4646.

LIU H.; Zhang G.; Liu C.-Q.; Li L.; Xiang M. (2009) The occurrence of chloramphenicol and tetracyclines in municipal sewage and the Nanming River, Guiyang City, China; *J. Environ. Monit.*; **11**; 1199-1205.

LOOS R.; Locoro G.; Contini S. (2010) Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS² analysis; *Water Res.*; **44**; 2325-2335.

LÓPEZ-ROLDÁN R.; Alda M.L.; Gros M.; Petrovic M.; Martín-Alonso J.; Barceló D. (2010) Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography–triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography–time of flight-mass spectrometry; *Chemosphere*; **80**; 1337-1344.

MALDANER A.O. (2010) *Comunicação pessoal*.

MANAGAKI S.; Murata A.; Takada H.; Tuyen B.C.; Chiem N.H. (2007) Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta; *Environ. Sci. Technol.*; **41**; 8004-8010.

MARTIN P.D.; Jones G.R.; Stringer F.; Wilson I.D. (2003) Comparison of normal and reversed-phase solid phase extraction methods for extraction of beta-blockers from plasma using molecularly imprinted polymers; *Analyst*; **128**; 345-350.

MARTINEZ-CARBALLO E.; Gonzalez-Barreiro C.; Scharf S.; Gans O. (2007) Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria; *Environ. Pollut.*; **148**; 570-579.

MASQUÉ N.; Marcé R.M.; Borrull F. (1998) New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water; *Trac-Trend Anal. Chem.*; **17**; 384-394.

MASSEY L.B.; Haggard B.E.; Galloway J.M.; Loftin K.A.; Meyer M.T.; Green W.R. (2010) Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams; *Ecol. Eng.*; **36**; 930-938.

MAURER M.; Escher B.I.; Richle P.; Schaffner C.; Alder A.C. (2007) Elimination of β -blockers in sewage treatment plants; *Water Res.*; **41**; 1614-1622.

MAYES A.G.; Mosbach K. (1997) Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?; *Trac-Trend Anal. Chem.*; **16**; 321-332.

McCORMICK J.R.D.; Fox S.M.; Smith L.L.; Bitler B.A.; Reichenthal J.; Orioni V.E.; Muller W.H.; Winterbottom R.; Doerschuk A.P. (1957) Studies of the reversible epimerization occurring in the tetracycline family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-tetracyclines; *J. Am. Chem. Soc.*; **79**; 2849-2858.

McDOWELL T.D.; Reid K.E. (1989) Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis; *Antimicrob. Agents Chemother.*; **33**; 1680-1685.

MIP TECHNOLOGIES (2011) www.miptechnologies.com, acessada em fevereiro de 2011.

MITSCHER L.A., *The chemistry of the tetracycline antibiotics*, 1st Ed., Marcel Dekker, New York, EUA, 1978. Pag??

MOLDOVAN Z. (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania; *Chemosphere*; **64**; 1808-1817.

MRM PROTEOMICS (2011) www.mrmproteomics.com, acessada em fevereiro de 2011.

NIEMANN A. (1860) Über eine neue organische Base in den Cocablättern; *Arch. Pharm.*; **153**; 129-155.

NORMAN (2008) 6th EU Framework Programme project NORMAN (Network of reference laboratories and related organizations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants), Contract number 018486, disponível em http://www.norman-network.net/index_php.php, acessada em agosto de 2008.

OHLSEN K.; Ziebuhr W.; Koller K.; Hell W.; Wichelhaus T.A.; Hacker J. (1998) Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alphatoxon (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates; *Antimicrob. Agents Chemother.*; **42**; 2817-2823.

OLIPHANT C.M.; Green G.M. (2002) Quinolones: a comprehensive review; *Am. Fam. Physician*; **65**; 455-464.

OMS (2007), <http://www.whooc.no/atcddd>, acessada em agosto de 2007.

OMS (2000) *Report on infectious diseases*, disponível em www.who.int/infectious-disease-report/2000/intro.htm, acessada em março de 2007.

PAUL B.D.; Lalani S.; Bosy T.; Jacobs A.J.; Huestis M.A. (2005) Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry; *Biomed. Chromatogr.*; **19**; 677-688.

PAXÉUS N. (2004) Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, β -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment; *Water Sci. Technol.*; **50**; 253-260.

PEREIRA-MAIA E.C.; Silva P.P.; Almeida W.B.; Santos H.F.; Marcial B.L.; Ruggiero R.; Guerra W. (2010) Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral; *Quim. Nova*; **33**; 700-706.

PEREZ-INESTROSA E.; Suau R.; Montanez M.I.; Rodriguez R.; Mayorga C.; Torres M.J.; Blanca M. (2005) Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications; *Curr. Opin. Allergy Cl.*; **5**; 323-330.

PETROVIC M.; Barceló D. (2006) Liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants; *Anal. Bioanal. Chem.*; **385**; 422-424.

PETROVIC M.; Gros M.; Barceló D. (2006) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1124**; 68-81.

PICÓ Y.; Andreu V. (2007) Fluoroquinolones in soil – risks and challenges; *Anal. Bioanal. Chem.*; **387**; 1287-1299.

PILS J.R.V.; Laird D.A. (2007) Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes; *Environ. Sci. Technol.*; **41**; 1928-1933.

POSTIGO C.; Lopez de Alda M.J.; Barceló D. (2008) Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC-MS²: A non-intrusive tool for drug abuse estimation at the community level; *Trends Anal. Chem.*; **27**; 1053-1069.

POSTIGO C.; Lopez de Alda M.J.; Barceló D. (2010) Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation; *Environ. Int.*; **36**; 75-84.

QIAO F.X.; Sun H.W.; Yan H.Y.; Row K.H. (2006) Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction; *Chromatographia*; **64**; 625-634.

RABIET M.; Togola A.; Brissaud F.; Seidel J.-L.; Budzinski H.; Elbaz-Poulichet F. **(2006)** Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment; *Environ. Sci. Technol.*; **40**; 5282–5288.

RACHKOV A.; Minoura N. **(2000)** Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach; *J. Chromatogr. A*; **889**; 111-118.

RICHARDSON M.L.; Bowron J.M. **(1985)** The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment; *J. Pharm. Pharmacol.*; **37**; 1-12.

SACHER F.; Lange F.T.; Brauch H.-J.; Blankenhorn I. **(2001)** Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany; *J. Chromatogr. A*; **938**; 199-210.

SALYERS A.A. **(2002)** An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture; *Anim. Biotechnol.*; **13**; 1-5.

SEADE, *Perfil Regional Região Metropolitana de Campinas*, Seade, São Paulo, Brasil, **2009**, 14 p.

SENTA I.; Terzic S.; Ahel M. **(2008)** Simultaneous determination of sulfonamides, fluoroquinolones, macrolides and trimethoprim in wastewater and river water by LC-tandem-MS; *Chromatographia*; **68**; 747-758.

SHELVER W.L.; Hakk H.; Larsen G.L.; DeSutter T.M.; Casey F.X.M. **(2010)** Development of an ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry multi-residue sulfonamide method and its application to water, manure slurry, and soils from swine rearing facilities; *J. Chromatogr. A*.; **1217**; 1273-1282.

SKOOG D.A.; West D.M.; Holler F.J.; Crouch S.R.; *Fundamentals of analytical chemistry*, 8th Ed., Belmont, CA, EUA, **2004**, pp.178-179.

SMITH V.H. **(2003)** Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems, a global problem; *Environ. Sci. Pollut. R.*; **10**; 126-139.

SNSA, Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2008, Ministério das Cidades, Brasília, **2010**, 408 p.

SODRÉ F.F.; Locatelli M.A.F.; Jardim W.F. **(2010)** Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais; *Quim. Nova*; **33**; 216-219.

SPELTINI A.; Sturini M.; Maraschi F.; Profumo A. (2010) Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: Sample preparation and determination; *J. Sep. Sci.*; **33**; 1115-1131.

SPISSO B.F.; Araújo Júnior M.A.G.; Monteiro M.A.; Lima A.M.B.; Pereira M.U.; Luiz R.A.; Nóbrega A.M. (2009) A liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto–enol tautomerism and epimerization phenomena; *Anal. Chim. Acta*; **656**; 72-84.

STÜLTEN D.; Zühlke S.; Lamshöft M.; Spiteller M. (2008) Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents; *Sci. Total Environ.*; **405**; 310-316.

SUN Z.; Schussler W.; Sengl M.; Niessner R.; Knopp D. (2008) Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer; *Anal. Chim. Acta*; **620**; 73-81.

TAMBOSI J.L.; Yamanaka L.Y.; José H.J.; Moreira R.F.P.M. (2010) Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP); *Quim. Nova*; **33**; 411-420.

TAMTAM F.; Mercier F.; Le Bot B.; Eurin J.; Dinh Q.T.; Clément M.; Chevreuil M. (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions; *Sci. Total Environ.*; **393**; 84-95.

TAMTAM F.; Mercier F.; Eurin J.; Chevreuil M.; Le Bot B. (2009) Ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters; *Anal. Bional. Chem.*; **393**; 1709-1718.

TERNES T.A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers; *Water Res.*; **32**; 3245-3260.

TERNES T.A. (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples; *Trac - Trends Anal. Chem.*; **20**; 419-434.

TERZIC S.; Senta I.; Ahel M. (2010) Illicit drugs in wastewater of the city of Zagreb (Croatia) - Estimation of drug abuse in a transition country; *Environ. Pollut.*; **158**; 2686-2693.

UMBUZEIRO G.A. (2010) *Comunicação pessoal*.

UNDCP, *Amphetamine-type stimulants: a global review*, Technical Series Number 3, UNDCP, **1996**, 139 p.

UNODC, *World drug report 2005 Volume 1. Analysis*, UNODC, Viena, Áustria, **2005**, 175 p.

UNODC, *World drug report 2009*, UNODC, Viena, Áustria, **2009**, 306 p.

UNODC, *World drug report 2010*, UNODC, Viena, Áustria, **2010**, 308 p.

URRACA J.L.; Moreno-Bondi M.C.; Hall A.J.; Sellergren B. **(2007)** Direct Extraction of Penicillin G and Derivatives from Aqueous Samples Using a Stoichiometrically Imprinted Polymer; *Anal. Chem.*; **79**; 695-701.

USGS **(2010)** <http://toxics.usgs.gov/regional/emc/>, acessada em julho de 2010.

VAN NUIJS A.L.N.; Pecceu B.; Theunis L.; Dubois N.; Charlier C.; Jorens P.G.; Bervoets L.; Blust R.; Neels H.; Covaci A. **(2009a)** Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment; *Water Res.*; **43**; 1341-1349.

VAN NUIJS A.L.N.; Pecceu B.; Theunis L.; Dubois N.; Charlier C.; Jorens P.G.; Bervoets L.; Blust R.; Meulemans H.; Neels H.; Covaci A. **(2009b)** Can cocaine use be evaluated through analysis of wastewater? A nation-wide approach conducted in Belgium; *Addiction*; **104**; 734-741.

VAN NUIJS A.L.N.; Tarcomnicu I.; Bervoets L.; Blust R.; Jorens P.G.; Neels H.; Covaci A. **(2009c)** Analysis of drugs of abuse in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; **395**; 819-828.

VAZQUEZ-ROIG P.; Segarra R.; Blasco C.; Andreu V.; Picó Y. **(2010)** Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; **1217**; 2471-2483.

VERBEECK R.K.; Blackburn J.L.; Loewen G.R. **(1983)** Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Clin. Pharm.*; **8**; 297-331.

VON SPERLING M., *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*, 3^a Ed., Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, **2005**, 452 p.

WATKINSON A.J.; Murby E.J.; Costanzo S.D. **(2007)** Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling; *Water Res.*; **41**; 4164-4176.

WATKINSON A.J.; Murby E.J.; Kolpin D.W.; Costanzo S.D. (2009) The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From waste water to drinking water; *Sci. Total Environ.*; **407**; 2711-2723.

WISHART D.S.; Knox C.; Guo A.C.; Cheng D.; Shrivastava S.; Tzur D.; Gautam B.; Hassanali M. (2008) DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets; *Nucleic Acids Res.*; **36**; D901-D906.

XIE J.; Zhu L.; Luo H.; Zhou L.; Li C.; Xu X. (2001) Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin; *J. Chromatogr. A*; **934**; 1-11

XU W.-H.; Zhang G.; Zou S.-C.; Li X.-D.; Liu Y.C. (2007) Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry; *Environ. Pollut.*; **145**; 672-679.

XU W.-H.; Zhang G.; Zou S.-C.; Ling Z.; Wang G.; Yan W. (2009) A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotics in the Yellow river and its tributaries, China; *Water Environ. Res.*; **81**; 248-254.

YANG S.; Carlson K. (2003) Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes; *Water Res.*; **37**; 4645-4656.

YIN J.; Meng Z.; Du M.; Liu C.; Song M.; Wang H. (2010) Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace β -lactam antibiotics in river and tap water; *J. Chromatogr. A*; **1217**; 5420-5426.

ZUCCATO E.; Chiabrando C.; Castiglioni S.; Calamari D.; Bagnati R.; Schiarea S.; Fanelli R. (2005) Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse; *Environ. Health*; **4**; 14-21.

ZUCCATO E.; Castiglioni S.; Bagnati R.; Chiabrando C.; Grassi P.; Fanelli R. (2008a) Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants; *Water Res.*; **42**; 961-968.

ZUCCATO E.; Chiabrando C.; Castiglioni S.; Bagnati R.; Fanelli R. (2008b) Estimating community drug abuse by wastewater analysis; *Environ. Health. Persp.*; **116**; 1027-1032.

ZUCCATO E.; Castiglioni S. (2009) Illicit drugs in the environment; *Phil. Trans. R. Soc. A*; **367**; 3965-3978.

ZUCCATO E.; Castiglioni S.; Bagnati R.; Melis M.; Fanelli R. (2010) Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment; *J. Hazard. Mater.*; **179**; 1042-1048.

ZWIENER C. (2007) Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment; *Anal. Bioanal. Chem.*; **387**; 1159-1162.

ANEXO 1

CURVAS ANALÍTICAS PARA OS ANTIBIÓTICOS

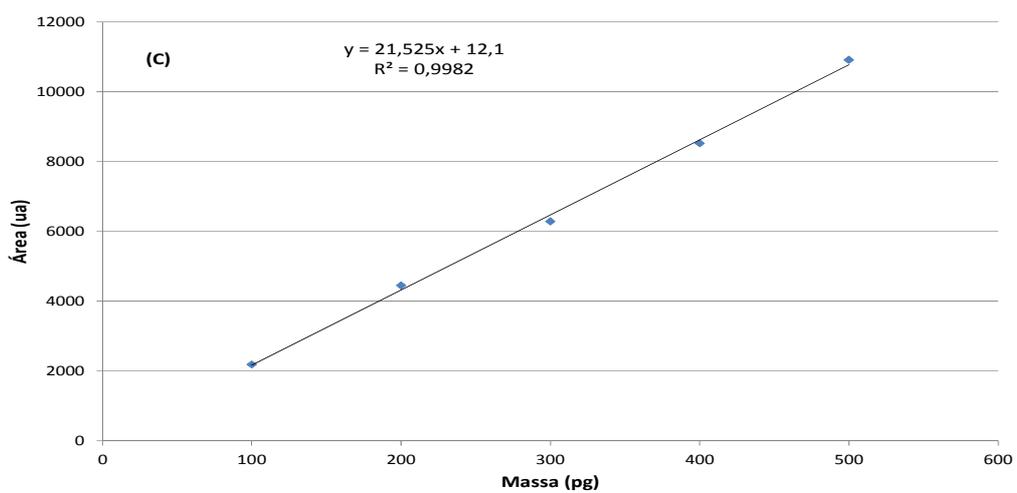
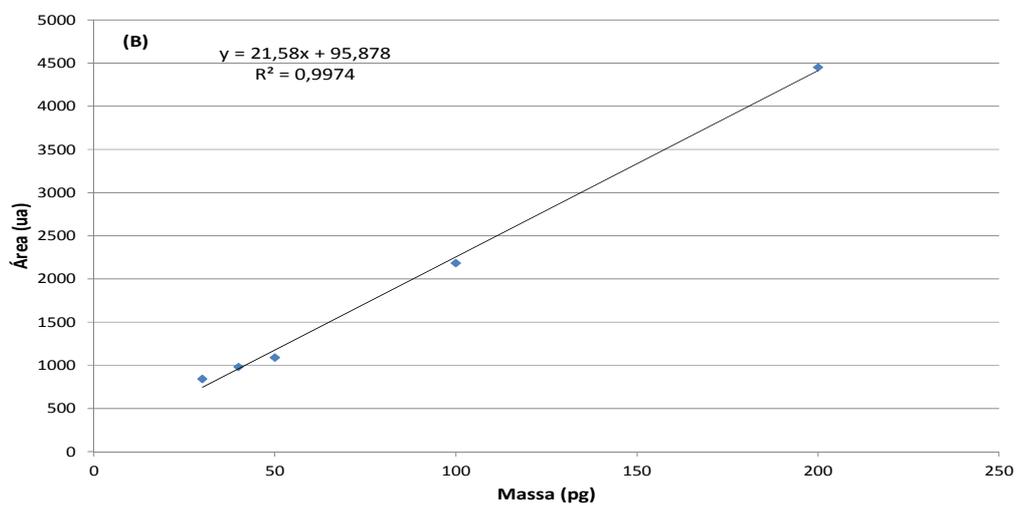
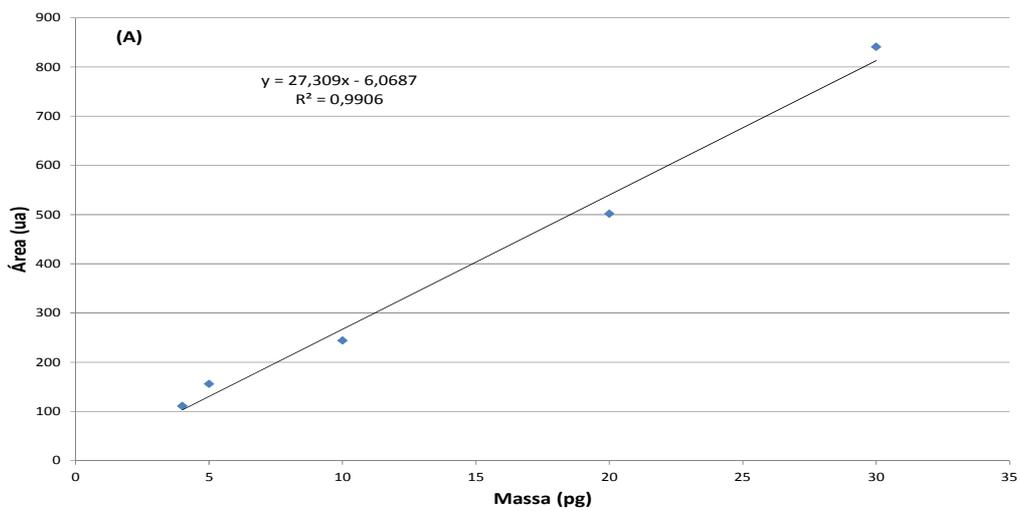


Figura A1 – Curvas analíticas para amoxicilina: (A) 4-30 pg, (B) 30-200 pg e (C) 100-500 pg.

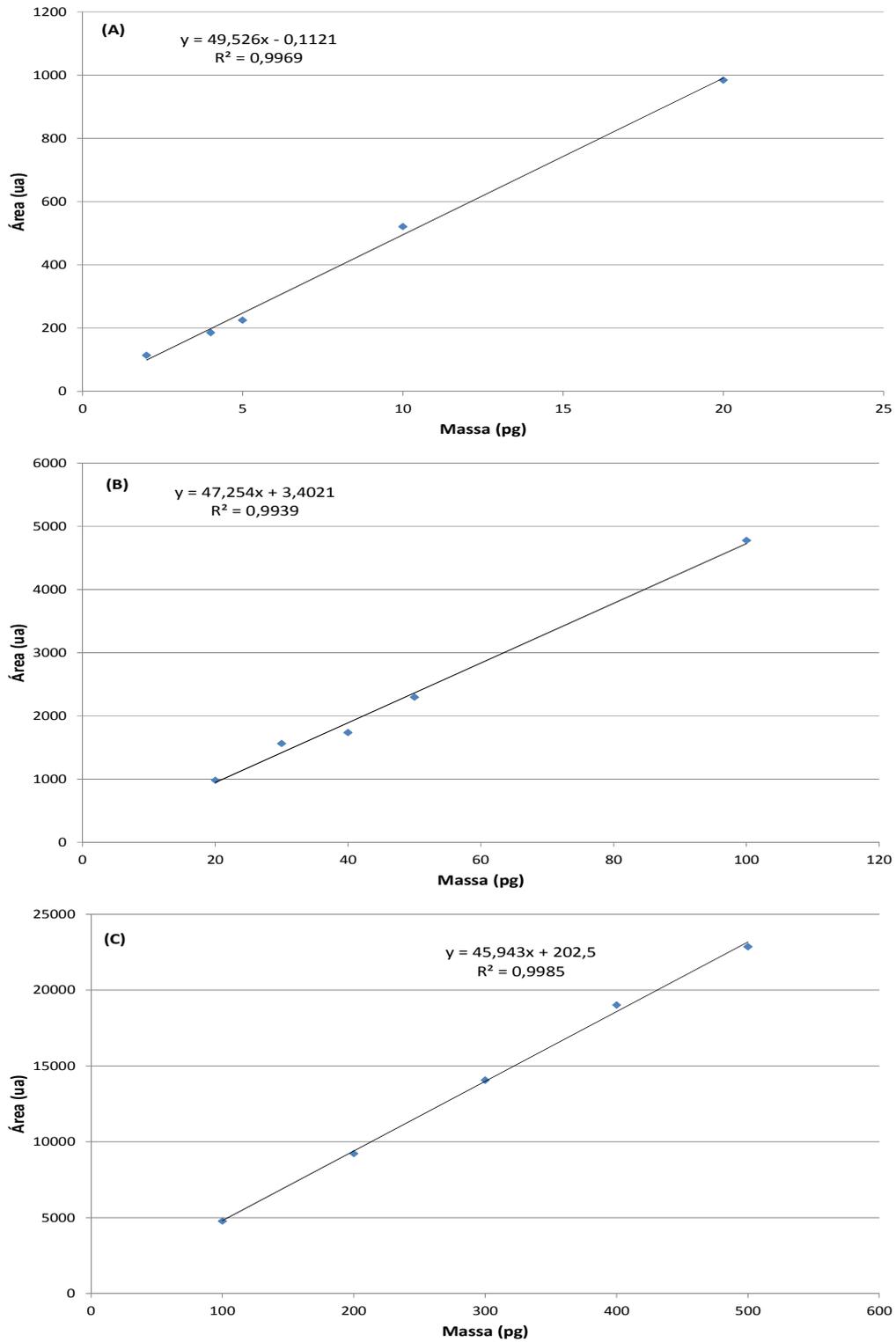


Figura A2 – Curvas analíticas para ampicilina: (A) 2-20 pg, (B) 20-100 pg e (C) 100-500 pg.

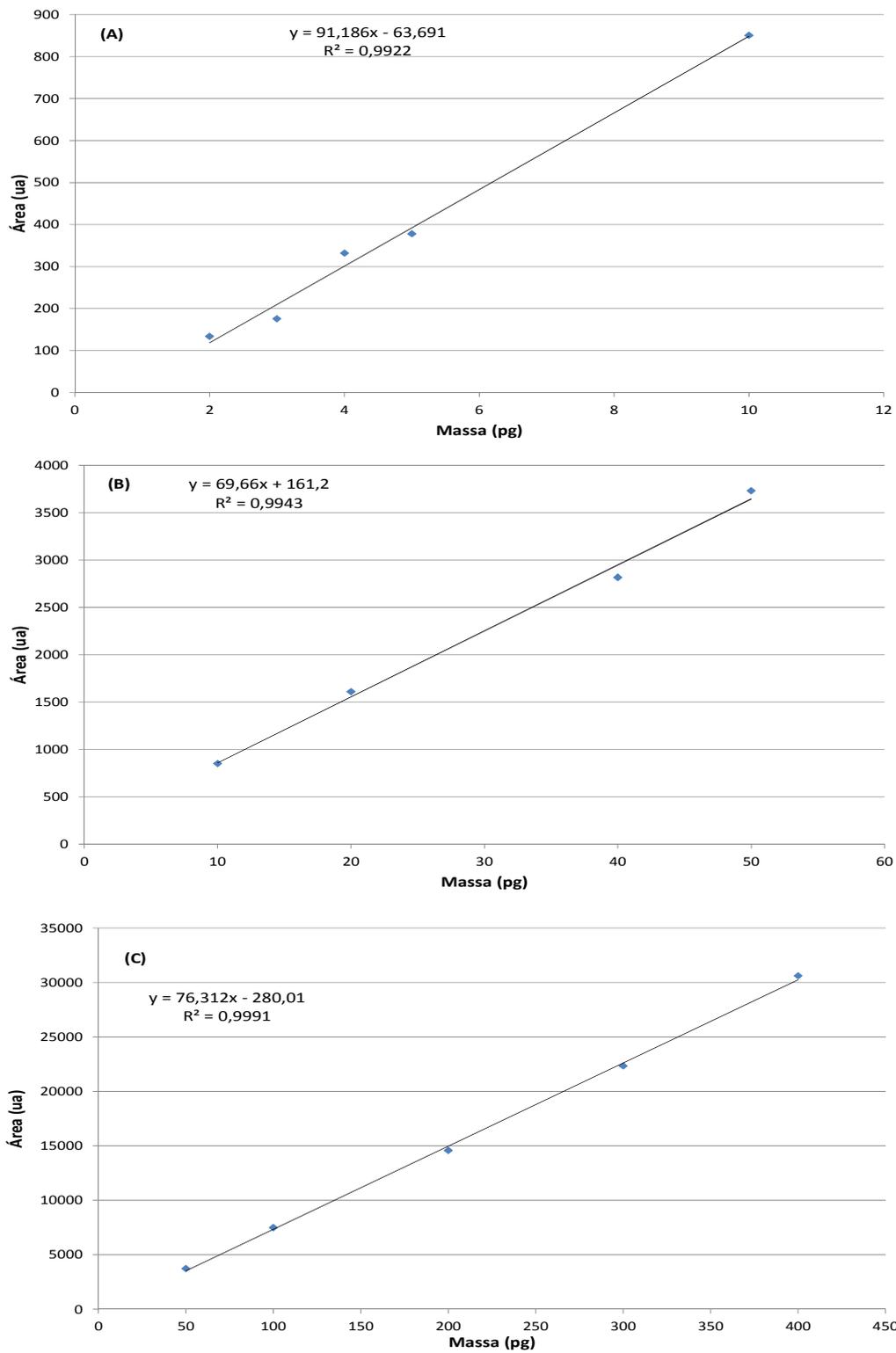


Figura A3 – Curvas analíticas para cefalexina: (A) 2-10 pg, (B) 10-50 pg e (C) 50-400 pg.

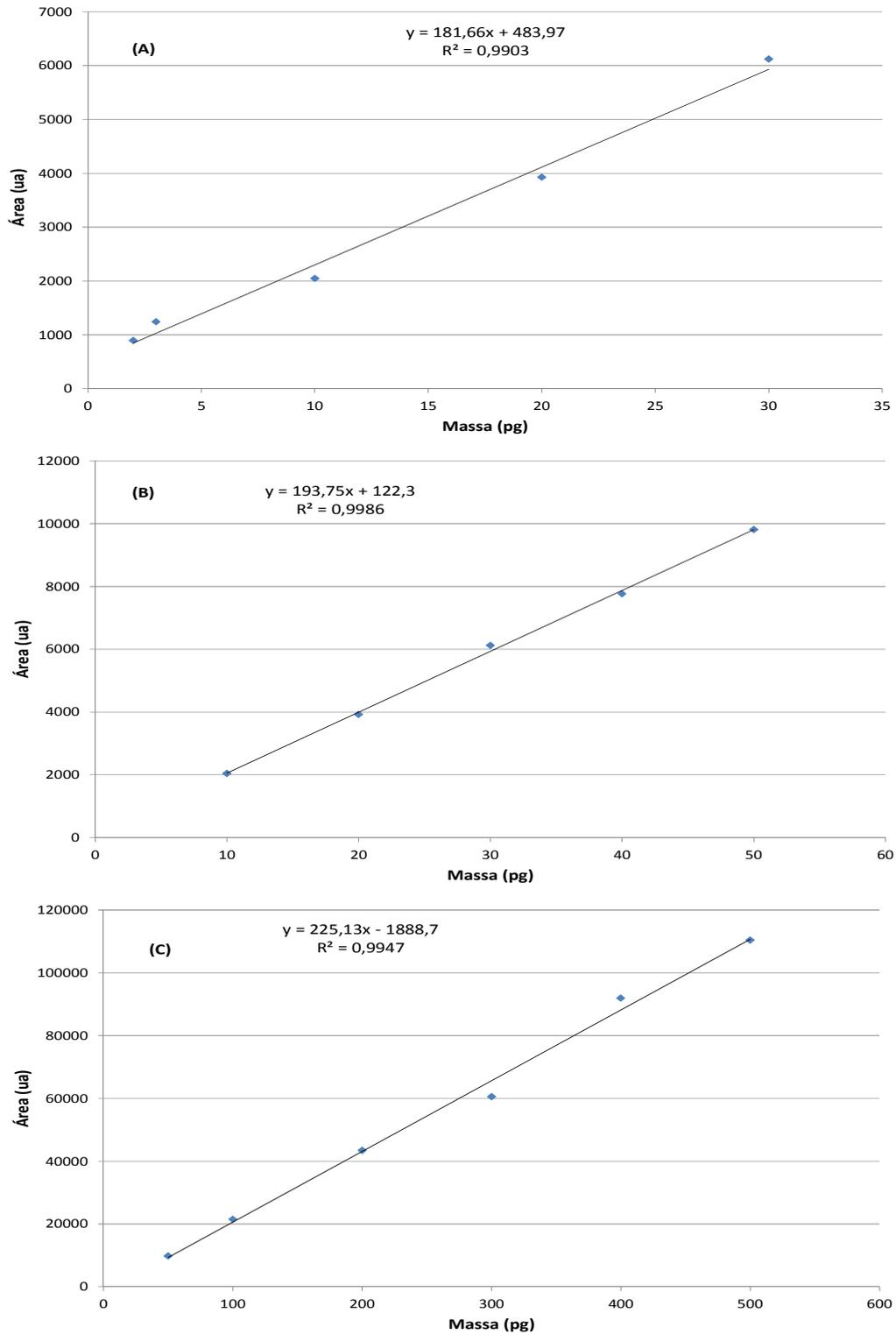


Figura A4 – Curvas analíticas para ciprofloxacino: (A) 2-30 pg, (B) 10-50 pg e (C) 50-500 pg.

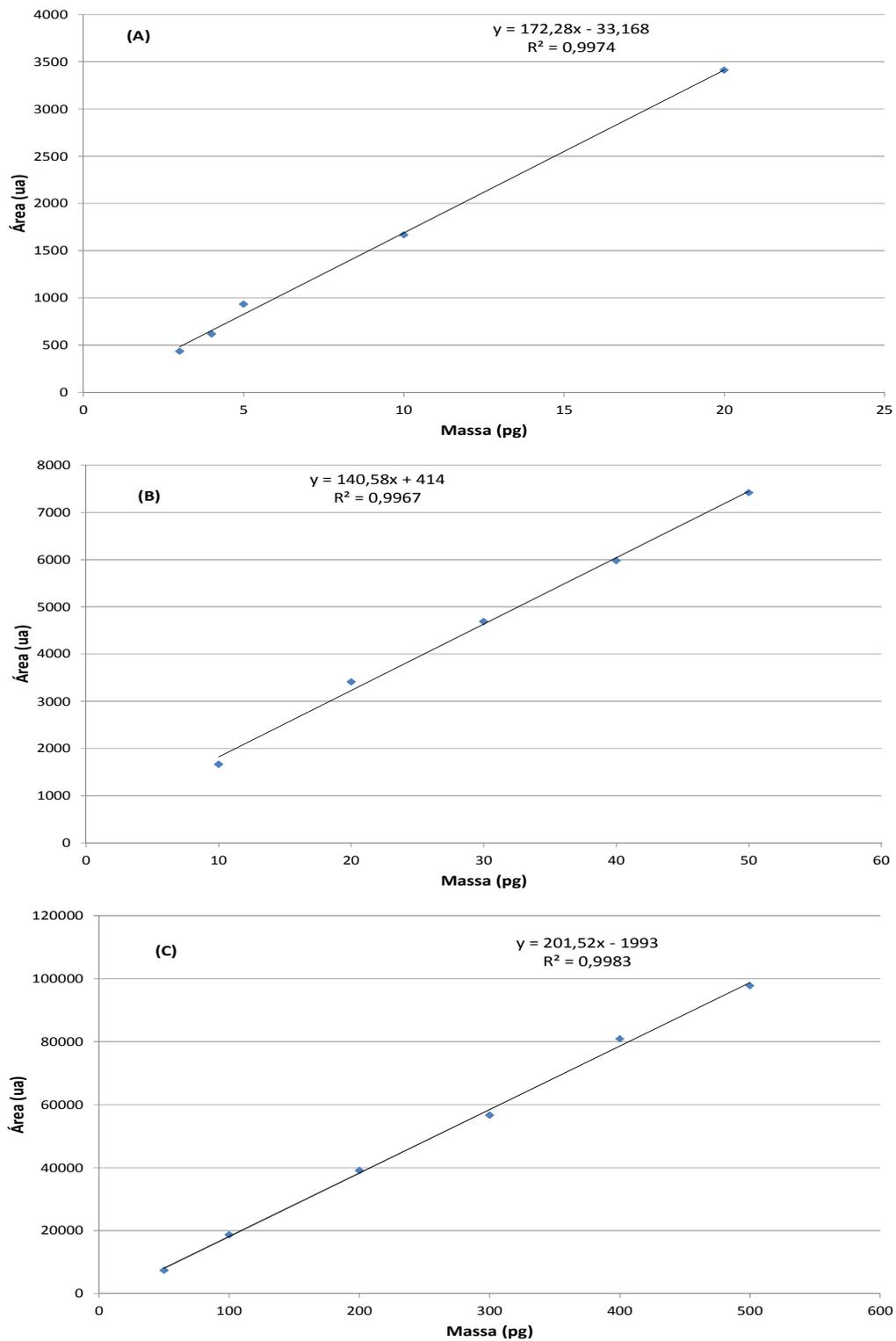


Figura A5 – Curvas analíticas para norfloxacin: (A) 3-20 pg, (B) 10-50 pg e (C) 50-500 pg.

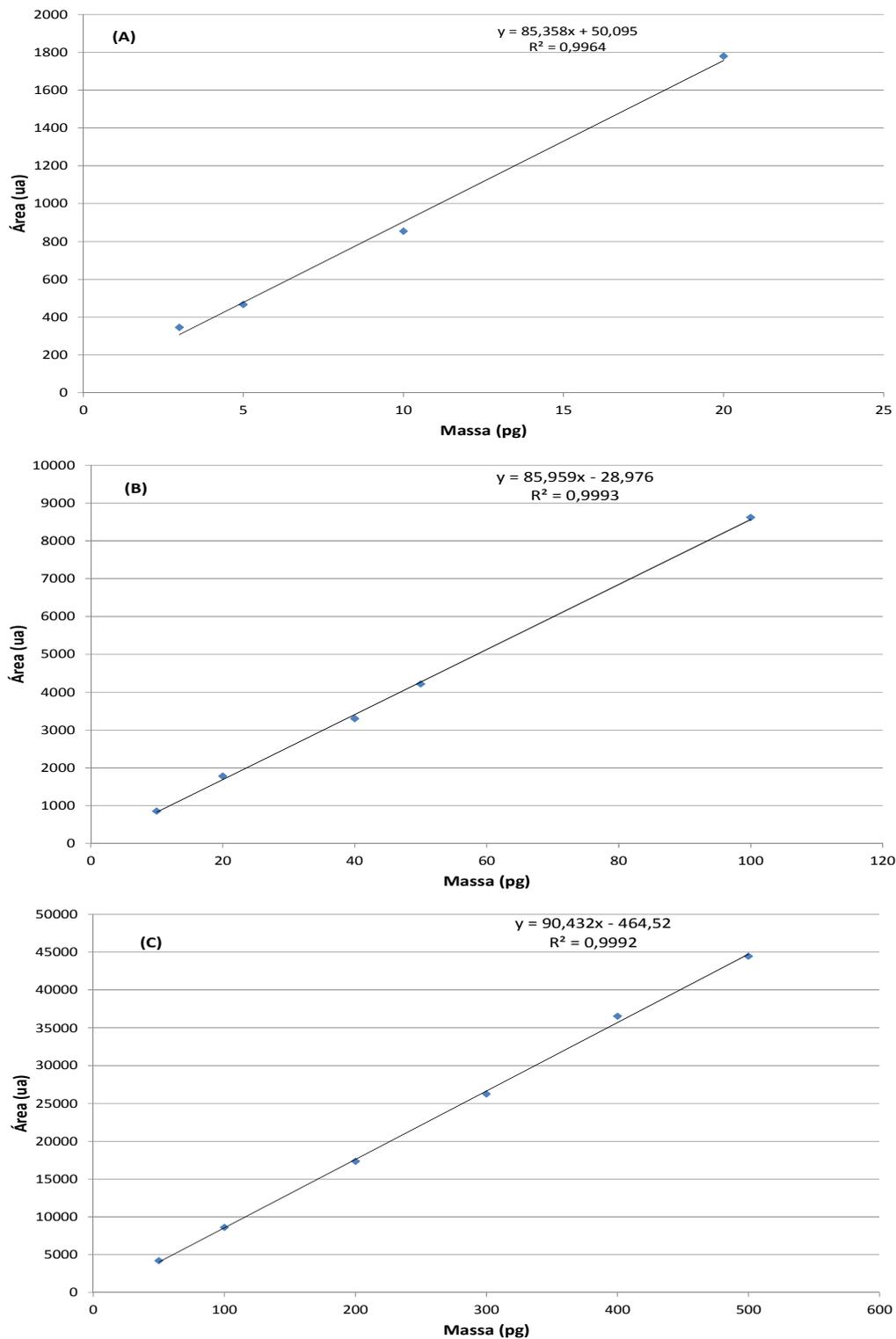


Figura A6 – Curvas analíticas para sulfametoxazol: (A) 3-20 pg, (B) 10-100 pg e (C) 50-500 pg.

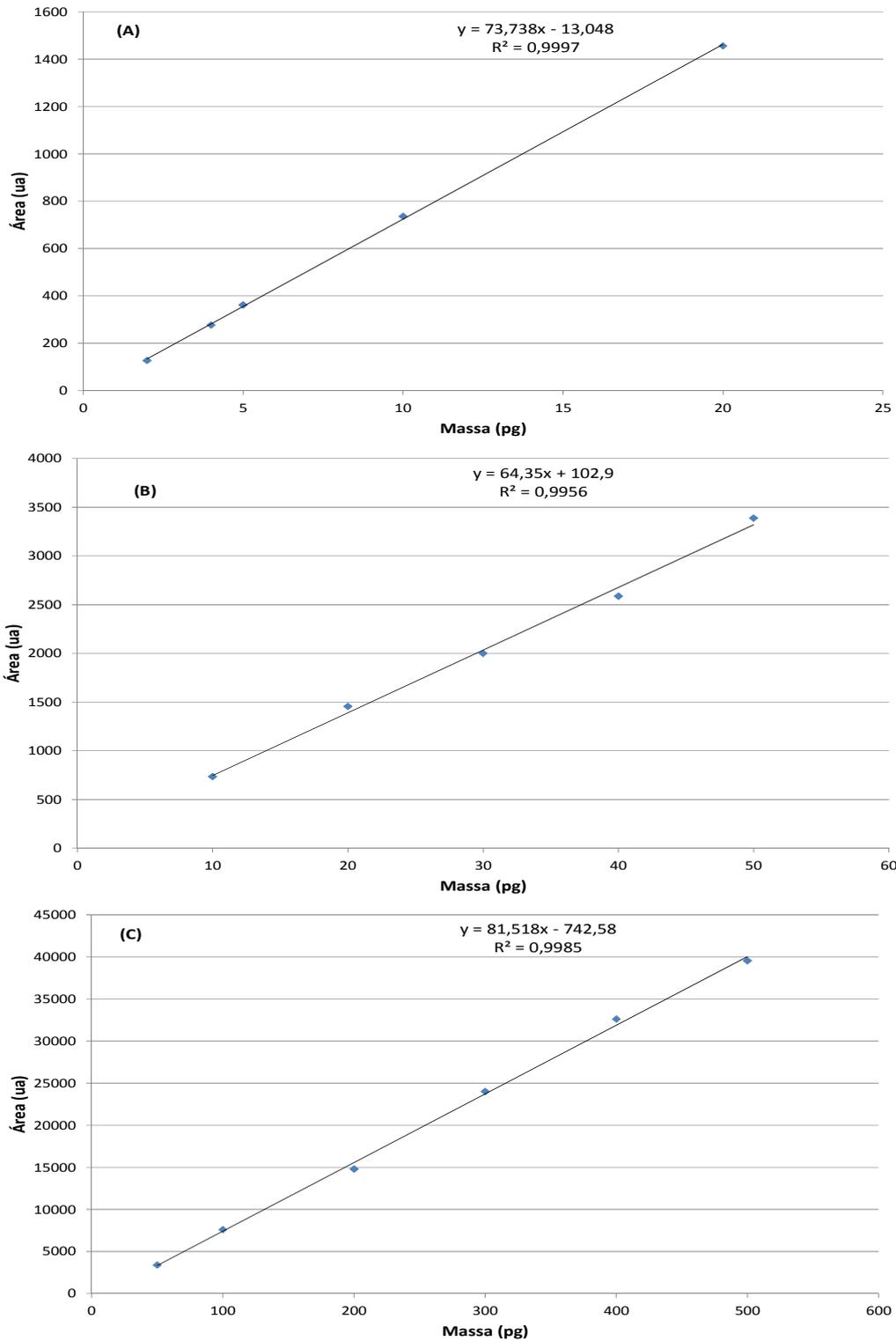


Figura A7 – Curvas analíticas para tetraciclina: (A) 2-20 pg, (B) 10-50 pg e (C) 50-500 pg.

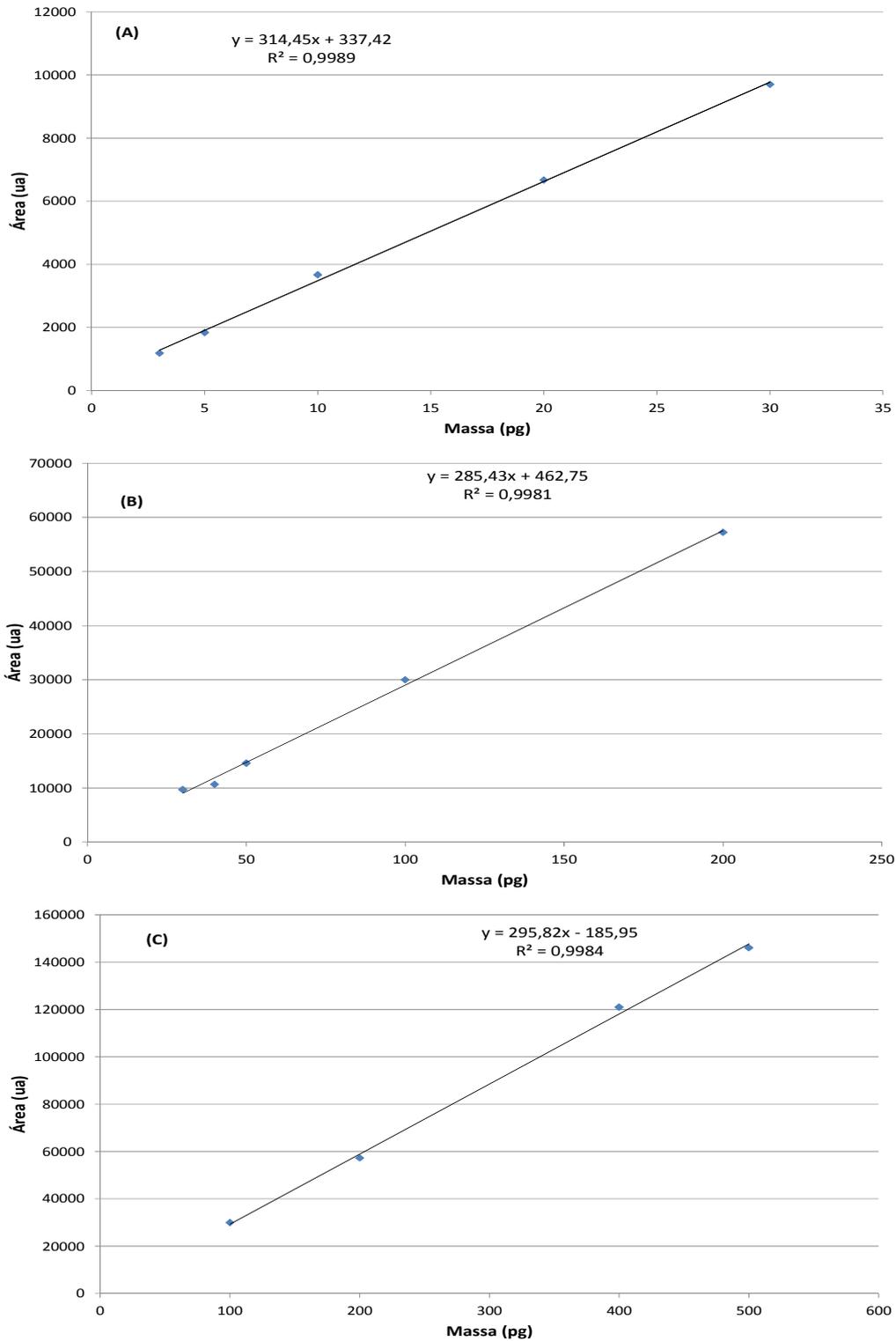


Figura A8 – Curvas analíticas para trimetoprim: (A) 3-30 pg, (B) 30-200 pg e (C) 100-500 pg.