

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena**

**Relatório final de Trabalho de pesquisa, referente ao Edital AGEVAP N°  
11/2015**

**Análise de Diclofenaco, Naproxeno e Cafeína no  
Rio Paraíba do Sul, na região do médio Paraíba**

Proponente: Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

Colaboradora: Paula Kaori Nakano

Lorena

2017

## Sumário

1	Introdução .....	4
2	Objetivo .....	5
3	Materiais e Métodos .....	6
3.1	Área de estudo .....	6
3.2	Plano de amostragem e coleta .....	8
3.3	Análises ecotoxicológicas .....	8
3.3.1	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> .....	8
3.3.2	Teste de toxicidade crônica com <i>Pseudokirchmeriella subcapitata</i> .....	8
3.4	Análises físicas e químicas .....	9
3.5	Filtração, extração e eluição .....	9
3.6	Desenvolvimento de metodologia analítica .....	10
3.6.1	Determinação do íon precursor .....	11
3.6.2	Determinação das energias de colisão e dos íons produto .....	11
3.6.3	Escolha da fase móvel e do melhor aditivo .....	11
3.6.4	Otimização dos parâmetros da fonte de ionização .....	12
3.7	Validação de metodologia analítica .....	13
3.7.1	Linearidade .....	13
3.7.2	Limite de Quantificação e Detecção .....	13
3.7.3	Extração em fase sólida .....	13
4	Resultados .....	14
4.1	Desenvolvimento de metodologia analítica .....	14
4.1.1	Determinação dos íons precursores, das energias de colisão e dos íons produto .....	14
4.1.2	Determinação do melhor aditivo para os compostos analisados ..	15
4.1.3	Hidróxido de Amônio 0,01%: Metanol .....	15
4.1.4	Ácido Acético 0,04%: Acetonitrila .....	16
4.1.5	Formiato de Amônio 5 mM: Metanol .....	18
4.2	Validação da metodologia analítica .....	19
4.2.1	Linearidade .....	19
4.3	Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) .....	22
4.4	Extração em fase sólida .....	22

4.5	Análises das Amostras.....	24
4.6	Análises físicas e químicas .....	25
4.7	Análises ecotoxicológicas .....	26
5	Conclusão .....	26
	Referências .....	27

## 1 Introdução

Os fármacos fazem parte de uma categoria de produtos industriais que apresenta uma das maiores demandas de produção mundial. Embora os dados exatos sejam raramente divulgados, os produtos farmacêuticos têm sido comercializados em grandes quantidades em todas as partes do globo – como exemplo, foi estimado no Reino Unido, que os 25 medicamentos mais vendidos no ano 2000 tiveram um consumo de mais de 10 toneladas cada, sendo que os três que encabeçaram a lista (paracetamol, cloridrato de metilformina e ibuprofeno) tiveram o consumo projetado em mais de 100 toneladas durante o ano (GAFFNEY et al., 2014).

Com o aumento da população, a inversão da pirâmide populacional (pessoas mais velhas na base e mais novas no topo) e o descobrimento de novas moléculas (dentro da União Europeia, por exemplo, são cerca de 3000 fármacos liberados para uso humano), o consumo destas substâncias tem aumentado consideravelmente (PETROVIĆ et al., 2014). Proporcionalmente, tem ocorrido o aumento da descarga de produtos contendo fármacos no meio ambiente, provenientes de excrementos, eliminação de medicamentos não utilizados ou expirados ou diretamente de descargas industriais (STEPNOWSKI et al., 2015). Esta “alimentação” continua, aliada a baixa eficiência dos tratamentos convencionais de esgoto (os processos são considerados lentos), é responsável pela chamada “pseudo” persistência dessas substâncias nos ambientes aquáticos. Desta maneira, pode-se assegurar que hoje, a principal via de entrada dos fármacos em meio ambientes aquáticos são as estações de tratamento de esgoto.

Devido a este contexto, aliado com o desenvolvimento simultâneo de técnicas analíticas mais sensíveis, com capacidade de determinar concentrações na faixa de  $\mu\text{g. L}^{-1}$  (picogramas por litro), os princípios ativos farmacêuticos e seus metabólitos têm sido considerados parte do grupo de contaminantes denominados emergentes (BIAŁK-BIELIŃSKA et al., 2016). Como estes compostos apresentam bioatividade, existe a possibilidade de que, uma exposição contínua e a longo prazo aos mesmos venha causar impactos na fauna (incluindo os humanos) e flora dos ambientes nos quais eles vem sendo descartados (FERRER-AGUIRRE et al., 2016).

No Brasil, os trabalhos pioneiros sobre a presença desses contaminantes em águas superficiais remontam a Ternes et al. (1999), e Stumpf et al (1999). Estes pesquisadores detectaram resíduos de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas residuárias brutas e tratadas e em águas ressudarias no estado do Rio de Janeiro. Os fármacos encontrados em maiores concentrações nas águas superficiais, foram diclofenaco ( $450 \text{ ng L}^{-1}$ ) e bezafibrato ( $200 \text{ ng. L}^{-1}$ ).

Mesmo tendo sua toxicidade conhecida, o potencial de contaminação ambiental e os mecanismos que ocorrem quando estão presentes no meio ambiente são pouco estudados (BORECKA et al., 2015), despertando assim o interesse na determinação desses contaminantes, somando-se a isto, o fato de que eles não estão inseridos em legislações brasileiras que regulamentam a qualidade da água e, portanto, podem ser candidatos para futuras leis, dependendo das pesquisas sobre a sua toxicidade e efeitos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana (AMÉRICO et al, 2012).

## **2 Objetivo**

Os medicamentos escolhidos para análise são da classe dos analgésicos, que são de fácil acesso à população, pois não requerem receita médica para sua compra. Devido a essa facilidade, eles são amplamente consumidos no Brasil. A cafeína não é considerada um princípio ativo farmacológico, entretanto ela está presente na maioria deles como estimulante.

O principal objetivo do trabalho é verificar e quantificar a presença dos fármacos Diclofenaco (princípio ativo do Cataflan) e Naproxeno (princípio ativo do Flanax), e a Cafeína (substância presente em vários medicamentos), na região do médio Paraíba, onde estão situadas as cidades de Resende, Barra Mansa e Volta Redonda – RJ. A identificação e a quantificação dos fármacos mencionados, poderá indicar a situação da eficiência do tratamento de efluente das cidades em estudo.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Área de estudo

A área de estudo deste trabalho envolveu as maiores cidades da região da Bacia Hidrográfica do Médio Paraíba (Resende, Barra Mansa e Volta Redonda). Assim, foram escolhidos pontos de amostragem antes e depois das cidades. Como Barra Mansa e Volta Redonda formam uma conurbação, para essa região, apenas dois pontos de amostragem foram escolhidos (antes de Barra Mansa e depois de Volta Redonda).

A Tabela 1 apresenta a localização geográfica e física de cada um dos 4 pontos de amostragem escolhidos, enquanto as Figuras 1 e 2 representam o mapa dos locais onde foram coletadas as amostras.

Tabela 1 - Pontos de amostragem, suas coordenadas geográficas e sua localização.

Ponto	Localização	Coordenadas	Observação
P1	Resende/Itatiaia	22°28'19.0"S 44°30'30.9"W	1ª ponte da Cidade de Resende
P2	Resende	22°27'56.8"S 44°26'09.4"W	Última Ponte da cidade de Resende
P3	Barra Mansa	22°31'30.1"S 44°11'21.0"W	1º Ponte da cidade de Barra Mansa
P4	Volta Redonda	22°28'42.0"S 44°03'47.0"W	Última ponte da cidade de Volta Redonda

Figura 1 - Representação cartográfica dos pontos de coleta 1 e 2 (P1 e P2).



Fonte: Google Earth.

Figura 2 - Representação cartográfica dos pontos de amostragem 3 e 4 (P3 e P4).



Fonte: Google Earth.

### **3.2 Plano de amostragem e coleta**

As coletas foram feitas no período situado entre setembro de 2016 e junho de 2017, em um total de 5 coletas. Cada ponto foi amostrado com auxílio de um balde de plástico. Foram coletados 4 litros de amostra em cada ponto, que foram transferidos para frasco âmbar e armazenados em gelo até o retorno para o laboratório.

A limpeza das vidrarias utilizadas nas campanhas de amostragem, seguiram as recomendações do guia de coleta e amostragem da CETESB (CETESB, 2011).

### **3.3 Análises ecotoxicológicas**

Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica, com microcrustáceo *Daphnia similis* e alga *Pseudokirchmeriella subcapitata*, respectivamente. Para cada teste foram utilizadas as seguintes metodologias.

#### **3.3.1 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis***

Os testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* foram realizados conforme a NBR 12.713/04. Neonatos com 6 a 24 horas de vida foram expostos às amostras de águas e ao controle de cultivo, por 48 horas. Os testes foram realizados com 20 mL de cada amostra, e foram utilizados 20 organismos em quatro réplicas com 5 organismos cada. Os organismos foram mantidos em câmaras incubadoras por um fotoperíodo, sem alimentação, durante 48 horas, em uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C.

Após do período de exposição, realizou-se a contagem dos organismos imóveis, sendo considerados imóveis àqueles que não conseguiram nadar após a leve agitação do recipiente.

#### **3.3.2 Teste de toxicidade crônica com *Pseudokirchmeriella subcapitata***

Os testes de toxicidade crônica com alga *Pseudokirchmeriella subcapitata* para amostras ambientais foram realizados conforme a metodologia descrita na NBR 12.648/11. Esse método permite avaliar os efeitos tóxicos da amostra sobre o crescimento de uma cultura específica de algas, em fase exponencial de crescimento. A cultura foi exposta às amostras de água coletada, em triplicata,



por 96 horas, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa de  $54 \mu\text{. fóton. m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e agitação de 170 rpm. Erlenmeyers de 250 mL foram utilizados como recipientes-teste, contendo um volume de 100 mL de amostra.

A determinação do crescimento algáceo final foi realizada através do método de contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A densidade algácea foi determinada nos controles no início do ensaio e em todos os recipientes-teste ao final do ensaio. As densidades médias produzidas em 96 horas foram obtidas através da subtração das densidades finais pelas iniciais.

Os resultados foram considerados válidos quando ao término do período de ensaio, o crescimento da densidade algácea média do controle fosse pelo menos 100 vezes superior à densidade inicial, para 96 horas de exposição, e o coeficiente de variação da densidade algácea das replicatas do controle, no término do ensaio, for menor ou igual a 20%.

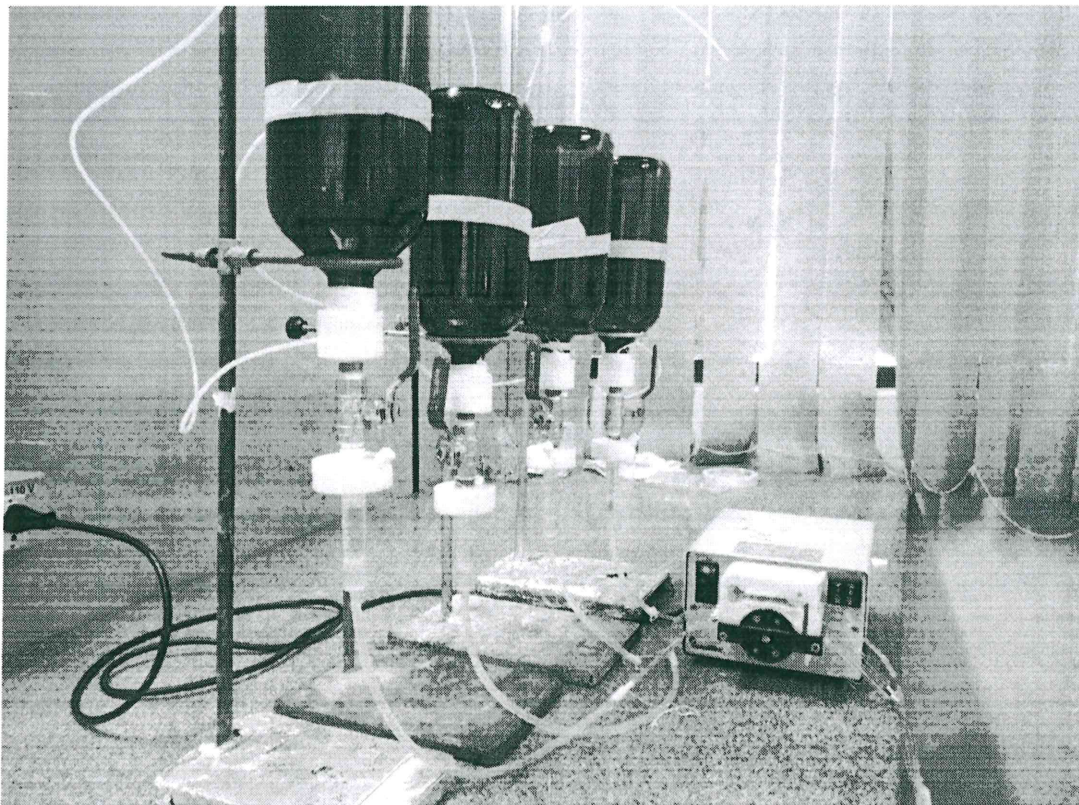
### **3.4 Análises físicas e químicas**

Após cada coleta, foram mensurados pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e temperatura de cada amostra. As determinações foram feitas com o auxílio de uma sonda multiparâmetros.

### **3.5 Filtração, extração e eluição**

As amostras coletadas foram filtradas em membrana de fibra de vidro, de porosidade 1,2  $\mu\text{m}$ , para a retirada de sólidos em suspensão. Em seguida, 500 mL de cada amostra filtrada foram percolados através de cartucho Oasis HLB, com ajuda de bomba peristáltica, em uma vazão de  $7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , para a extração dos analitos de interesse. O sistema para a extração foi o mesmo desenvolvido por Sodré e colaboradores (2010). A Figura 3 mostra uma representação do sistema.

Figura 3 - Sistema para extração dos analitos.



Fonte: Próprio autor.

Os cartuchos foram previamente ativados com 4 mL de metanol e 4 mL de água ultrapura. Após a extração, os cartuchos foram secos com o auxílio de uma bomba de vácuo.

A eluição destes analitos foi realizada com auxílio de um manifold, adicionando-se alíquotas de 4 mL metanol, seguidas de 4 mL de acetonitrila, que foram coletadas em tubos de ensaio. Após o processo de eluição ser concluído, as amostras resultantes foram secadas completamente com nitrogênio e depois ressuspendidas em solução de água:metanol (proporção de 70:30) para posterior análise cromatográfica.

### **3.6 Desenvolvimento de metodologia analítica**

Foi utilizado um cromatógrafo Agilent 1200, acoplado a um espectrômetro de massa com triplo quadrupolo e ionização por eletrospray (ESI) 6410.

Foram preparadas soluções estoques de cada analito na concentração de 1000 ppm, que foram mantidas sob temperatura de -20°C. A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho de 10 ppm, que foram mantidas a temperatura de -20°C por no máximo 2 semanas, e de 1 ppm, que foram preparadas diariamente.

No desenvolvimento da metodologia analítica realizaram-se os seguintes testes:

### **3.6.1 Determinação do íon precursor**

Este teste foi realizado para se determinar qual o íon precursor de cada composto a ser analisado. Utilizou-se formiato de amônio:metanol (50:50) como fase móvel e injetou-se 10 µl da solução de 1 ppm de cada analito separadamente. A coluna de separação cromatográfica não é utilizada nesta etapa. A fonte de ionização foi utilizada em sua condição padrão: Voltagem de 4000 V, temperatura de 350°C, pressão do nebulizador de 40 psi e fluxo do gás de secagem de 9 L.min<sup>-1</sup>.

### **3.6.2 Determinação das energias de colisão e dos íons produto**

Foram determinadas as energias de colisão que irão gerar os fragmentos mais intensos (íons produto) de cada analito. As energias de colisão foram testadas em valores que variaram em um intervalo de 0 até 35 V e os fragmentos com maior intensidade de resposta foram selecionados. Para este experimento, foram injetados separadamente 5 µL da solução padrão 1 ppm de cada composto.

### **3.6.3 Escolha da fase móvel e do melhor aditivo**

O aditivo é adicionado a fase móvel com o objetivo de auxiliar a ionização dos analitos. Esses aditivos devem ser voláteis e presentes em baixas concentrações, com a finalidade de se evitar que haja interferência neste processo de ionização. Para cromatografia líquida acoplada ao detector de massas há um número limitado de combinações de fases móveis. Comumente são utilizados 2 modificadores orgânicos (metanol e acetonitrila) e 5 aditivos - substâncias que ajudam a ionização dos analitos - que são ácido acético, acetato de amônio, ácido fórmico, formiato de amônio e hidróxido de amônio. Os aditivos testados foram hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) 0,01%, formiato de amônio

(NH<sub>4</sub>HCOO) 5 mM e ácido acético (H<sub>3</sub>CCOOH) 0,04%. Os modificadores orgânicos testados foram metanol e acetonitrila.

### 3.6.4 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

No modo negativo, foram testados a tensão do capilar, temperatura e fluxo do gás de secagem (nitrogênio) e a pressão do nebulizador. Foi realizado um planejamento experimental de 2<sup>3</sup>. Cada parâmetro foi testado em seu valor mínimo e máximo. As combinações estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores dos parâmetros em cada condição testada da fonte

Condição	Tensão (Volts)	Temperatura (°C)	Pressão Nebulizador (psi)	Vazão do gás (mL. L <sup>-1</sup> )
1	3000	300	20	6
2	4000	300	20	13
3	3000	350	20	13
4	4000	350	20	6
5	3000	300	50	13
6	4000	300	50	6
7	3000	350	50	6
8	4000	350	50	13

Uma outra condição denominada “condição zero” também foi testada. Esta condição contemplou o ponto médio de cada parâmetro, ou seja: Tensão: 3500 V, Temperatura: 325°C, Pressão do Nebulizador: 35 psi e Vazão do gás: 9 mL. L<sup>-1</sup>.

### **3.7 Validação de metodologia analítica**

Na etapa de validação, foram realizados os seguintes testes.

#### **3.7.1 Linearidade**

Para se verificar se o método responde proporcionalmente as alterações de concentração dos analitos, foram preparadas soluções padrão de naproxeno, diclofenaco e cafeína nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100 e 500 ppb. Os volumes foram injetados em triplicata, equivalendo as massas que variaram em um intervalo de 5 até 1000 picogramas. Após o fim das injeções, plotou-se um gráfico da resposta em função da quantidade da massa do analito injetada e calculou-se o coeficiente de correlação para cada um dos compostos.

#### **3.7.2 Limite de Quantificação e Detecção**

O limite de quantificação é a determinação da concentração mínima que pode ser quantificada com precisão e exatidão, enquanto que o limite de detecção é concentração mínima que pode ser detectada (mas não quantificada) utilizando o método desenvolvido. Ambos foram determinados de acordo com os parâmetros obtidos no teste de linearidade. O limite de quantificação é 10 vezes a relação entre o desvio padrão do valor do intercepto obtido de 3 curvas de calibração, e o coeficiente de linearidade da equação da curva padrão. Enquanto o limite de detecção é igual a 3 vezes o valor da mesma relação.

#### **3.7.3 Extração em fase sólida**

Para a extração em fase sólida, 500 mL de água ultrapura foram fortificados com 100 µL de uma solução padrão contendo 1 ppm de naproxeno, diclofenaco e cafeína. Em seguida, os procedimentos de extração e eluição foram realizados, conforme item 3.5 deste documento. A amostra resultante foi analisada para se verificar o quanto de cada analito foi recuperado.

Em todos os testes foram utilizados uma vazão de 0,3 mL. min<sup>-1</sup> e uma coluna Zorbax SB – C18 com dimensões de 2,1 x 30 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm.

## 4 Resultados

### 4.1 Desenvolvimento de metodologia analítica

#### 4.1.1 Determinação dos íons precursores, das energias de colisão e dos íons produto

Como esperado, a cafeína foi determinada no modo positivo e apresentou a relação massa/carga com uma unidade a mais que a sua massa molar, enquanto que o naproxeno e o diclofenaco foram analisados no modo negativo, e apresentaram relação massa/carga com uma unidade a menos que suas respectivas massas molares. Somente os íons determinados nesta etapa irão sofrer fragmentação, resultando na formação dos íons produtos, que serão essenciais para a quantificação e a confirmação da identidade de cada analito (a energia necessária para a formação destes íons é dependente de cada composto). Os íons produtos de quantificação foram aqueles com resposta de maior intensidade e os íons de confirmação, os fragmentos com a segunda e a terceira resposta de maior intensidade. A tabela 3 sumariza os íons precursores formados e seus respectivos íons produtos (de quantificação e confirmação) de cada um.

Tabela 3 - Íons precursores e íons produtos de cada analito.

Composto	Modo da Fonte de Ionização	Íon Precursor m/z	Íon Produto (Quantificação) m/z	Ion Produto (Confirmação) m/z	Íon Produto (Confirmação) m/z
Cafeína	+	195,2	137,9	42,1	110,3
Diclofenaco	-	294,1	251,1	178,1	34,9
Naproxeno	-	229,1	169,1	185,0	n.e.

n.e: não encontrado.

#### 4.1.2 Determinação do melhor aditivo para os compostos analisados

Foram testadas as seguintes combinações para se determinar qual o melhor aditivo a ser utilizado na geração dos íons produtos e de confirmação: hidróxido de amônio 0,01%:metanol; ácido acético 0,04%:acetonitrila; formiato de amônio 6,5 mM:metanol.

Os parâmetros considerados para a avaliação foram as áreas obtidas de cada composto ao variar-se as condições da fonte de ionização (ver tabela 2). Para cada aditivo, utilizou-se um gradiente específico para a eluição dos componentes durante a realização das análises.

#### 4.1.3 Hidróxido de Amônio 0,01%: Metanol

A composição do gradiente utilizado para este aditivo é descrita na tabela 4.

Tabela 4 - Gradiente utilizado para Hidróxido de Amônio 0,01%: Metanol

Tempo (minutos)	%Hidróxido de Amônio	%Metanol
0	95	5
2	80	20
5	75	25
7	60	40
10	95	5

Realizaram-se injeções de 10 µL de uma mistura de padrões contendo cafeína, diclofenaco e naproxeno na concentração de 1 ppm. Como resposta, foi considerada a área do pico de quantificação de cada analito. A tabela 5 apresenta o valor das áreas obtidas para cada analito, de acordo com a condição empregada.

Tabela 5 - Área do pico de quantificação cada composto em função das condições da fonte da ionização

Condição*	Cafeína**	Diclofenaco	Naproxeno
0	31701	n.d.	40
1	186405	9080	16291
2	318795	21578	11372
3	372899	25069	13172
4	455125	22255	33118
5	218746	32879	11484
6	271687	10607	13632
7	20123	n.d.	n.d.
8	31817	n.d.	n.d.

\*Ver tabela 2. \*\* Cafeína foi testada com a fonte no modo positivo

A cafeína apresentou intensidade bem acima dos demais compostos, sendo o único com resposta nas condições 0, 7 e 8. Como a resposta da cafeína apresenta uma intensidade alta nas condições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, escolheu-se a condição 4 como a melhor condição da fonte de ionização para a combinação hidróxido de amônio 0,01%: metanol, pois a mesma apresentou a maior resposta para os demais compostos.

Analisando-se os cromatogramas, observou-se que o naproxeno é eluído ainda no tempo morto da coluna (0,3 minutos e o diclofenaco apresenta resposta muito baixa.

#### 4.1.4 Ácido Acético 0,04%: Acetonitrila

A composição do gradiente utilizado para este aditivo é mostrada na Tabela 6.



Tabela 6 - Gradiente utilizado para a eluição dos fármacos tendo Ácido Acético 0,04%: Acetonitrila como fase móvel.

Tempo (minutos)	%Ácido Acético	%Acetonitrila
0	95	5
6	70	30
9	70	30
10	95	5

Realizaram-se injeções de 10 µL de uma mistura de padrões contendo cafeína, diclofenaco e naproxeno na concentração de 1 ppm. Como resposta, foi considerada a área do íon de quantificação. A tabela 7 apresenta os valores das áreas obtidas para cada analito, de acordo com a condição empregada.

Tabela 7 - Área de cada composto em função das condições da fonte de ionização.

Condição*	Cafeína**	Diclofenaco	Naproxeno
0	48765	34010	50453
1	21456	7119	23261
2	35765	22917	48686
3	44734	29730	23132
4	32456	23613	47787
5	51347	33667	57366
6	21369	17944	55064
7	20765	22480	39577
8	18764	41331	30133

\*Ver tabela 2. \*\*Cafeína foi testada com a fonte no modo positivo

Nesta condição, a cafeína apresentou intensidade consideravelmente menor que a condição anterior (Hidróxido de amônio:Metanol). Já os outros compostos apresentaram uma resposta de maior intensidade em relação a mesma condição.

#### 4.1.5 Formiato de Amônio 5 mM: Metanol

A composição do gradiente utilizado para este aditivo é descrita na Tabela 8.

Tabela 8 - Gradiente usado para a combinação Formiato de Amônio 5mM: Metanol

Tempo (minutos)	%Formiato de Amônio	%Metanol
0	80	20
3	50	50
9	20	80
10	80	20

Realizaram-se injeções de 10 µL de uma mistura de padrões contendo cafeína, diclofenaco e naproxeno na concentração de 1 ppm. Como resposta, foi considerada a área total de cada pico, aquela gerada pela corrente iônica total (TIC). A Tabela 9 apresenta os valores das áreas obtidas para cada analito, de acordo com a condição empregada.

Tabela 9 - Área de cada composto em função das condições da fonte da ionização

Condição	Cafeina	Diclofenaco	Naproxeno
0	10567	7440	6324
1	72345	5719	18664
2	81545	6020	4511
3	91456	5281	763
4	102345	4502	740
5	87654	10870	31285
6	87675	6290	18476
7	78643	5732	11126
8	104567	5816	1524

Repetiu-se o que aconteceu para os dois aditivos anteriores, com a cafeína tendo uma maior resposta em todas as condições da fonte de ionização testadas.

Porém, analisando-se os cromatogramas, quando se utiliza formiato de amônio 5 mM:metanol, observa-se que o pico cafeína se apresenta próximo de ser eluído no tempo morto da coluna.

Portanto, considerando as 3 combinações testadas, escolheu-se para serem validadas os aditivos hidróxido de amônio 0,01%:metanol e a condição da fonte de ionização de número 4 (350°C, 4000V, 20 psi e 6L.min<sup>-1</sup>) para a análise de cafeína, e ácido acético 0,04%:acetonitrila e condição da fonte de ionização número 5 (300°C, 3000V, 50 psi e 9 L.min<sup>-1</sup>) para análise do diclofenaco e naproxeno. A coluna a ser utilizada será uma Zorbax SB – C18 com dimensões de 2,1 x 30 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm. A vazão da fase móvel será de 0,3 mL/minuto.

## **4.2 Validação da metodologia analítica.**

### **4.2.1 Linearidade**

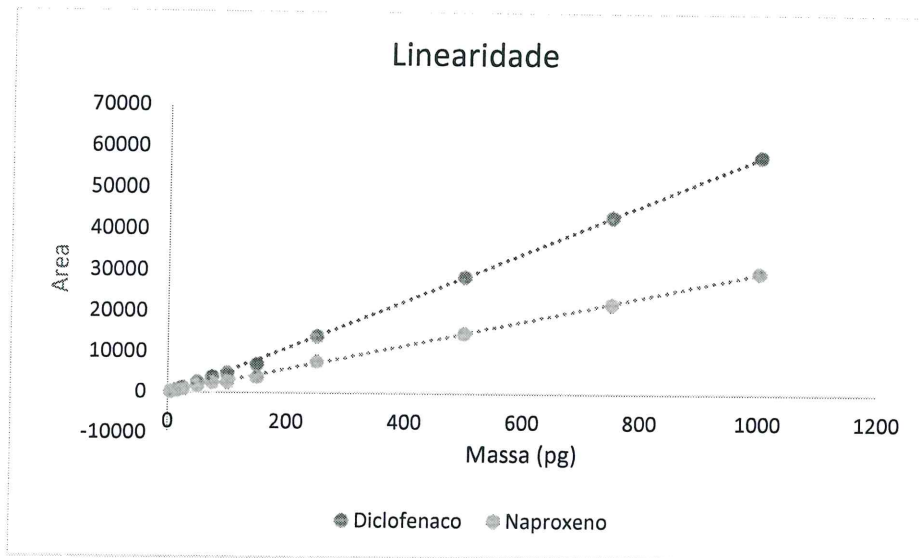
Foram avaliadas se a variação de área dos picos foi proporcional a variação de concentração de cada um dos quatro compostos analisados no modo negativo (diclofenaco e naproxeno). Foram injetados volumes de soluções na concentração de massas dos analitos que variaram de 5 até 1000 picogramas. A tabela 10 mostra os valores das áreas de cada analito em função da massa injetada (média de três injeções).

Tabela 10 - Áreas em função da massa injetada de cafeína, naproxeno, diclofenaco.

Massa (pg)	Diclofenaco	Naproxeno	Cafeína
5	180	140	35741
15	601	423	103456
25	1226	831	173704
50	2576	1591	335847
75	3851	2439	510326
100	4740	2611	653682
150	7009	3807	1002464
250	13991	7654	1807375
500	28672	14873	3544846
750	43217	22151	5373545
1000	58076	29982	6872357

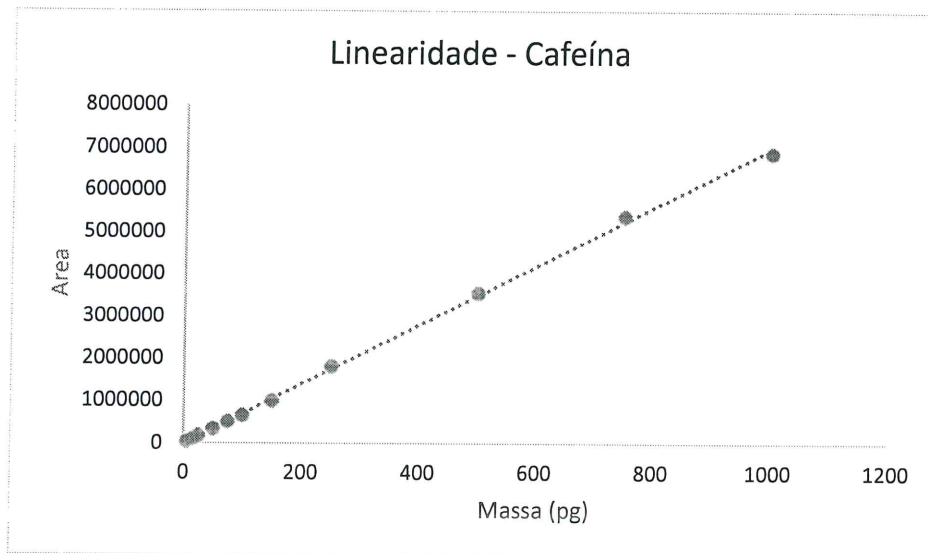
A resposta do detector mostrou-se linear para os 3 compostos em questão. O coeficiente de correlação das retas ajustadas ( $R^2$ ) apresentou valores maiores que 0,99. A figura 4 ilustra as retas obtidas para o naproxeno e o diclofenaco enquanto a figura 5 mostra a reta obtida para a cafeína. A tabela 11 mostra as retas ajustadas e o coeficiente de correlação para cada composto

Figura 4 - Gráfico da variação das áreas em função da massa (pg) injetada.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Gráfico da variação das áreas em função da massa (pg) injetada.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 11 - Retas ajustadas e coeficiente de correlação obtido para cada composto.

Composto	Reta	Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
Cafeína	6995,8x – 1315,5	0,9993
Diclofenaco	58,469x – 599,1	0,9986
Naproxeno	29,881x – 68,1	0,9993

O método apresentou linearidade na faixa de 5 a 1000 picogramas para os três compostos estudados.

#### 4.3 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação e o limite de detecção foram calculados através dos dados da curva de linearidade onde o limite de quantificação é 10 vezes a relação entre o desvio padrão do valor do intercepto obtido de 3 curvas de calibração e o coeficiente de linearidade da equação da curva padrão, enquanto o limite de detecção é igual a 3 vezes o valor da mesma relação. Os limites calculados estão na tabela 12.

Tabela 12 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação de cada um dos compostos

Composto	LD (pg)	LQ (pg)
Cafeína	11,4	37,9
Diclofenaco	9,9	33,0
Naproxeno	11,1	36,9

#### 4.4 Extração em fase sólida

Foi feito um teste de recuperação fortificando-se 500 mL água ultrapura com os analitos para uma concentração final de 200 ng/L de cada um destes,

sem ajuste prévio de pH. Os resultados obtidos apresentaram taxa de recuperação inferior a 50% para diclofenaco e naproxeno, enquanto a cafeína apresentou recuperação em torno de 90%. O cartucho Oasis HLB atua utilizando um mecanismo de retenção baseado em interações dipolo–dipolo, constituído por um polímero que possui grupos hidrofílicos e lipofílicos, podendo reter tanto compostos polares quanto apolares. Como o naproxeno e o diclofenaco apresentam pKas de 4,3 e 4,1 respectivamente, e as amostras de águas superficiais, em sua grande maioria, possuem pH com um valor em torno de 7,0, ambos estarão em suas formas aniônicas, favorecendo o uso de cartucho que utilize o mecanismo de troca aniônica para reter os analitos. Desta maneira, testou-se, o Strata-XA, que é constituído por uma resina de troca aniônica.

O procedimento para o uso do Strata-XA foi o mesmo usado para o OASIS HLB, diferindo somente na eluição, onde foi utilizado ácido fórmico 2% em metanol.

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a recuperação de cada um dos analitos em cada cartucho.

Tabela 13 - Taxa de recuperação (%) dos analitos para os cartuchos Oasis HLB e Strata-XA

Analito	Oasis HLB	Strata-XA
Cafeína	90,3	24,4%
Diclofenaco	<10%	48,5%
Naproxeno	23%	84,2%

Vale ressaltar que em muitos trabalhos, o procedimento de extração tanto para o naproxeno quanto para o diclofenaco é utilizado o cartucho Oasis HLB com procedimento idêntico ao utilizado neste trabalho, (BOLEDA; GALCERAN; VENTURA, 2013; GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011; K'OREJE et al., 2016; VANDERFORD et al., 2003).

Assim utilizou-se dois procedimentos de extração: um para a cafeína, com cartucho HLB Oasis, e outro para o naproxeno e diclofenaco, com o cartucho Strata-XA.

#### **4.5 Análises das Amostras**

As amostras coletadas nos pontos de amostragem foram processadas como descrito no item 3.5 e analisadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um espectrofotômetro de massas, com as seguintes condições do método estabelecidas:

##### **Para a análise de cafeína:**

Condição da fonte de ionização: temperatura de 350°C, voltagem de 4000V, pressão do nebulizador de 20 psi e fluxo do gás de secagem de 6 L. min<sup>-1</sup>.

Fase móvel: hidróxido de amônio 0,01%:metanol.

Gradiente conforme a tabela 4.

##### **Para a análise de naproxeno e diclofenaco:**

Condição da fonte de ionização: temperatura de 300°C, voltagem de 3000V, pressão do nebulizador de 50 psi e fluxo do gás de secagem 9 L. min<sup>-1</sup>.

Fase móvel: ácido acético 0,04%: acetonitrila

Gradiente conforme a tabela 5.

Coluna utilizada: Zorbax SB – C18 com dimensões de 2,1 x 30 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm.

Vazão da fase móvel :0,3 mL. min<sup>-1</sup>.

Os resultados se encontram na tabela 14.



Tabela 14 - Resultados das análises de amostras de águas superficiais do Rio Paraíba do Sul para cafeína, naproxeno e diclofenaco. A unidade de medida dos resultados estão em ng.mL<sup>-1</sup>.

Composto	Data da Coleta	P1	P2	P3	P4
Cafeína	ago/16	45	49	52	51
	set/16	63	62	48	47
	nov/16	53	49	54	62
	jan/17	64	85	67	71
	abr/17	65	51	53	61
Naproxeno	ago/16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	set/16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	nov/16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	jan/17	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	abr/17	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Diclofenaco	ago/16	<LD	<LD	<LD	<LD
	set/16	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	nov/16	<LQ	<LQ	37	<LD
	jan/17	<LD	39	<LD	<LD
	abr/17	<LD	<LD	<LD	34

Como esperado, a cafeína foi o composto presente em maiores quantidades. O naproxeno foi detectado em todas as amostras, apesar de não poder ser quantificado (concentrações abaixo do limite de quantificação). O diclofenaco foi detectado em 40 % das amostras e quantificado em 3 delas. Os valores encontrados de cafeína e diclofenaco para o ponto 2 (P2) na coleta de janeiro de 2017 foram os maiores obtidos para cada composto. A se destacar que neste período, houveram chuvas intensas nos dias que antecederam a coleta, devido a este fato, pode-se ocasionar a movimentação de sedimentos do fundo e da margem do corpo d'água e, conseqüentemente, a liberação destes compostos nas águas superficiais.

#### 4.6 Análises físicas e químicas

O pH das amostras esteve na faixa de 6,6 – 7,1, estando dentro do esperado. A temperatura variou entre 20 – 24 °C, valores sendo compatíveis com o período de coleta das amostras (todas foram coletadas na parte da manhã). A condutividade esteve na faixa de 60 – 90  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , enquanto que os sólidos totais dissolvidos variaram entre 20 – 50 mg L<sup>-1</sup>.

#### **4.7 Análises ecotoxicológicas**

Para se determinar as toxicidades crônicas e aguda foram realizados testes ecotoxicológicos em cada amostra. O resultado obtido foi negativo, ou seja, não tóxicas. Somente o ponto 2 (P2) realizada em setembro de 2016 apresentou toxicidade crônica e aguda. Como apenas esse ponto apresentou toxicidade, é possível que este seja um acontecimento pontual, uma vez que as outras coletas não apresentaram toxicidade. O resultado não tóxico indica que as substâncias presentes na água estão diluídas, a ponto de não influenciar o crescimento dos organismos-teste.

#### **5 Conclusão**

O método para a análise de cafeína, diclofenaco e naproxeno nas águas superficiais do Rio Paraíba do Sul se apresentou satisfatório, embora a etapa de extração em fase sólida para o diclofenaco necessite de melhorias (recuperação de pelo menos 60%).

Na coleta realizada em janeiro de 2017, houve a ocorrência de chuvas nos dias que antecederam a coleta, ocasionando o aumento de sedimentos na superfície do Rio Paraíba do Sul. Verificando os valores obtidos de cafeína e diclofenaco, nesse período, é possível indicar a presença destes compostos no leito e nas margens do corpo d'água.

Quanto aos resultados das amostras, os valores obtidos para diclofenaco e naproxeno encontram-se abaixo dos valores apresentados em outros estudos (CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014; GRACIA-LOR; SANCHO; HERNÁNDEZ, 2011), indicando que o Rio Paraíba do Sul possui um grande efeito depurador. Também é possível confirmar a ineficiência do tratamento de efluentes (tratamento convencional) para a remoção desses compostos. É necessário que seja investido em tratamento melhores, tendo em vista que vários estudos já apontam o acúmulo dessas substâncias na fauna e na flora, além da possibilidade de retorno desses compostos para os humanos através da ingestão dessas águas.

## Referências

AMÉRICO, H. J. P. et al. Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 2010, p. 61–67, 2012.

BIAŁK-BIELIŃSKA, A. et al. Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals in drinking/marine waters and soil/sediment samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 121, p. 271–96, 20 mar. 2016.

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

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Tuna River Basin: From waste to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 484, p. 53–63, 2014.

CETESB. **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**. [s.l: s.n.].

FERRER-AGUIRRE, A. et al. Simple and quick determination of analgesics and other contaminants of emerging concern in environmental waters by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1446, p. 27–33, 4 abr. 2016.

GAFFNEY, V. DE J. et al. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. **Water Research**, v. 72, p. 199–208, 2014.

GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 16, p. 2264–75, 22 abr. 2011.

K'OREJE, K. O. et al. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. **Chemosphere**, v. 149, p. 238–244, abr. 2016.

PETROVIĆ, M. et al. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 415–428, 2014.

SODRÉ; F; ANTONIO, L. M.; FIGUEIREDO, J. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 216–219, 2010.

STEPNOWSKI, P. et al. Contamination of the southern Baltic Sea waters by the residues of selected pharmaceuticals: Method development and field studies. **Marine pollution bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 62–71, 15 maio 2015.

VANDERFORD, B. J. et al. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 22, p. 6265–6274, 2003.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135–141, jan. 1999.

TERNES, T. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 81–90, jan. 1999.