

I-311 - OCORRÊNCIA DOS FÁRMACOS AMOXICILINA E CAFEÍNA EM ESGOTO DOMÉSTICO E ÁGUAS SUPERFICIAIS

Michelle Cristine Wagner⁽¹⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Medianeira, com período sanduíche em Cornell University/NY, nos EUA. Pós-graduanda em Engenharia de Segurança do Trabalho pela Faculdade Assis Gurgacz- Cascavel-PR.

Ismael Laurindo Costa Junior⁽²⁾

Professor Doutor na Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Medianeira.

Juliana Bortoli Rodrigues Mees⁽³⁾

Professora Doutora na Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Medianeira.

Poliana Paula Quitaiski⁽⁴⁾

Engenheira Ambiental e Mestranda em Tecnologias Ambientais pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Medianeira.

Endereço: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, Avenida Brasil, 4232 CEP 85884-000 - Caixa Postal 271 - Medianeira - PR - Brasil. e-mail: mih.cwagner@gmail.com⁽¹⁾, ismael@utfpr.edu.br⁽²⁾, juliana@utfpr.edu.br⁽³⁾, polyquitaiski@hotmail.com⁽⁴⁾.

RESUMO

A presença de fármacos em águas superficiais é uma questão que vem causando preocupação, devido ao fato destes compostos possuírem baixa biodegradabilidade, por geralmente persistirem aos processos de tratamento convencionais e por também serem desconhecidos os efeitos crônicos desta exposição aos organismos aquáticos e aos seres humanos. As Estações de Tratamento de Esgoto são indicadas como as principais fontes de descarga dessas substâncias no ambiente. Nesse contexto, foi desenvolvida uma metodologia para determinação dos fármacos cafeína e amoxicilina, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta (HPLC- UV). O método proposto foi validado nos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com os padrões do INMETRO e ANVISA. Após considerado válido, o método foi então aplicado em amostras de água de rio e de esgoto, do município de Medianeira-PR. Os resultados indicaram presença de ambos os fármacos nas amostras analisadas, sugerindo a baixa eficiência de tratamento da ETE analisada frente a esses micropoluentes. As concentrações encontradas para a cafeína variaram entre não detectado e 0,1187 mg.L⁻¹, com um limite de detecção de 0,08 mg.L⁻¹ e um limite de quantificação de 0,27 mg.L⁻¹. Já para a amoxicilina as concentrações variaram entre 0,0029 a 0,026 mg.L⁻¹, para limite de detecção de 0,05 mg.L⁻¹ e um limite de quantificação de 0,18 mg.L⁻¹. Dessa forma, a metodologia se mostrou adequada e pode ser utilizada em outros estudos de mesma natureza.

PALAVRAS-CHAVE: Poluentes Emergentes, HPLC, Cromatografia, Determinação, Validação.

1. INTRODUÇÃO

Na década de 70, começou-se a atentar para a presença de fármacos em ambientes aquáticos, devido ao fato de muitos destes compostos, tais como antibióticos, hormônios, anti-inflamatórios, anestésicos, dentre outros, serem encontrados em efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) e em águas superficiais e subterrâneas em concentrações na faixa de µg.L⁻¹ e ng.L⁻¹ ao redor do mundo. A presença dessas substâncias no meio ambiente indica que as mesmas são recalcitrantes e que possuem baixa biodegradabilidade, sendo que ainda não se conhece o efeito crônico desta exposição em seres humanos e animais (ANDREOZZI et al., 2004; LOPES, 2014; COSTA JUNIOR et al., 2014; MELO et al., 2009; LONGHIN, 2008).

A principal rota de contaminação de fármacos em águas superficiais é o lançamento de esgoto *in natura*, já que em diversos locais há um grande déficit de infraestrutura em saneamento (MELO et al., 2009). De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, no Brasil, somente 54,87% dos municípios realizam a coleta do esgoto doméstico, dentro desse grupo 70,87% dos municípios que realizam a coleta também efetuam o tratamento do esgoto e em 45,13% dos municípios o esgoto não é coletado, sendo lançado diretamente em águas superficiais (SNIS, 2014).

Outra rota importante é o lançamento de efluentes de estações de tratamento de esgotos domésticos, uma vez que a remoção de fármacos é incompleta frente aos processos de tratamento utilizados. Além disso, a contaminação também pode ocorrer pelo descarte inadequado de medicamentos, derramamentos acidentais durante a fabricação e distribuição e pelo lançamento de efluentes industriais sem o tratamento adequado (ANDREOZZI et al., 2004; SILVA, 2015; MELO et al., 2009).

Os antibióticos constituem uma importante classe de fármacos com grande possibilidade de causar impactos ambientais devido a capacidade de gerar organismos resistentes, apresentarem toxicidade aguda para algumas espécies aquáticas, resistirem ao tratamento de ETEs convencionais e pelo fato de persistirem no ambiente e potencializarem seu efeito no ecossistema (SILVA, 2015; LONGHIN, 2008).

No grupo dos fármacos, também está incluída a cafeína, que além de estar presente na formulação de diversos medicamentos, também se encontra em bebidas, alimentos e condimentos e a sua presença no ambiente aquático é um importante bioindicador ambiental, já que ela não é consumida por animais e nem está presente em fertilizantes, demonstrando contaminação por esgotos domésticos (MAFIOLETI, 2014).

Métodos baseados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou High Performance Liquid Chromatography (HPLC) são adequados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade alta e volatilidade baixa ou elevada instabilidade térmica, que são características de alguns fármacos (SILVA; COLLINS, 2011). Nesse método, a fase móvel, constituída de solventes líquidos, tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos, em escala de tempo de poucos minutos, transportando os analitos através de uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação pelas diferenças de afinidade dos analitos com a fase estacionária (QUEIROZ, 2011; DE SOUZA LOPES et al., 2010).

Dessa forma, considerando a problemática atual, realizou-se um estudo para desenvolver e validar uma metodologia analítica para a detecção de cafeína e amoxicilina, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta (HPLC- UV) para determinação desses micropoluentes. A validação foi avaliada segundo os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com os padrões do INMETRO e ANVISA.

2. METODOLOGIA

2.1 INSTRUMENTAL

As determinações foram realizadas em um sistema HPLC-UV Varian (Figura 7), coluna Varian Microsorb-MV C18 (4,6 × 250 mm), à temperatura ambiente, injeção de 20 µL e com vazão constante de 0,8 mL min⁻¹. Os cromatogramas foram obtidos com o detector UV e foram extraídos no comprimento de onda de 230 nm. Como resposta analítica foi registrada a área do pico cromatográfico correspondente a cada analito.

As fases móveis foram testadas em modo isocrático, compostas por metanol, acetonitrila e água ultra-pura com modificador de pH 3 (ácido fórmico). Após testes, a fase móvel escolhida foi constituída por metanol e água ultra-pura com modificador de pH 3 (ácido fórmico 0,3%) na proporção 90:10, considerando a resolução cromatográfica.

2.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

A linearidade foi verificada mediante ao preparo de curvas de calibração com sete pontos em triplicatas analíticas (n=3) na faixa de 0,05 a 2,8 mg L⁻¹. Para a avaliação da linearidade foi aplicada a análise de regressão com análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste ao nível de 95% de confiança usando software estatístico (Minitab 16.2.2).

Para a exatidão, a metodologia utilizada consistiu em adicionar alíquotas com concentração conhecida dos analitos em três níveis em amostras (2,0, 4,0 e 8,0 µg.L⁻¹) e submeter ao processo de extração e quantificação e avaliar a recuperação obtida.

O fator de recuperação foi calculado através da equação (1).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{med}}}{C_{\text{real}}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo C_{med} a concentração medida na análise e C_{real} a concentração da amostra fortificada.

O estudo da precisão foi realizado verificando-se a repetição dos resultados para a solução de $4,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ no mesmo dia e em dias consecutivos. A avaliação ocorreu a partir do cálculo de desvio padrão relativo (RSD) ou CV (eq. 2).

$$\text{CV} = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo CV o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo, s o desvio padrão e x a média.

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados baseados em parâmetros da curva analítica. Sendo o LD calculado para estimar a menor concentração de detecção do analito, mas não necessariamente quantificado. O Limite de Quantificação, por sua vez, representa a menor concentração medida de um analito. Para que se tenha uma maior precisão estatística, é necessário que haja uma maior concentração para o LQ.

O LD pode ser calculado a partir da equação (3) e o LQ a partir da equação (4).

$$\text{LD} = 3 \times s/S \quad (3)$$

$$\text{LQ} = 10 \times s/S \quad (4)$$

Em que o s é o desvio padrão do intercepto, e o S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

2.3 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS





2.3.1 Localização e caracterização dos pontos de coleta

Foi realizada uma coleta no mês de Abril de 2016 em 4 pontos amostrais (Tabela 3), do Rio Alegria e da Estação de Tratamento de Esgoto do município de Medianeira, localizado no oeste do Paraná. O sistema de tratamento da ETE estudada é constituído por uma unidade de tratamento identificada como Reator Anaeróbio de Lodo Fluidizado – RALF, cuja capacidade de tratamento é de 70 L.s^{-1} . O lançamento é feito no Rio Alegria, que possui uma vazão média de 370 L.s^{-1} , largura aproximada de 5 m e 0,4 m de profundidade em meses secos e 0,9 m em meses chuvosos (LOPES et al., 2016).

As amostras foram coletadas manualmente, seguindo as recomendações especificadas na NBR 9898 (ABNT, 1987), em frascos âmbar de 1 litro previamente limpos com água e detergente neutro, enxágue abundante em água de torneira e com um último enxágue com água destilada. Depois de secos, foi realizado o enxágue com 5 mL de acetona agitando o frasco para contato com as paredes e foram secos até a evaporação e então identificados com etiquetas adesivas.

Durante a coleta foram medidos os parâmetros de oxigênio dissolvido e temperatura utilizando uma sonda multiparâmetros, modelo DO-5519 da marca Lutron. Os frascos foram armazenados em isopor com gelo e encaminhados até o laboratório, onde foi imediatamente medido o pH com um pHômetro. As amostras foram então armazenadas em geladeira por 7 dias e após este prazo foram congeladas até serem iniciadas as análises.

Tabela 1: Descrição dos pontos de coleta

Pontos de coleta	Coordenadas	Descrição	Fotos
Ponto 1 (P1) Esgoto bruto da ETE	S 25°17'10,86" W 54°06'04,19"	Área de entrada do Esgoto bruto na ETE	
Ponto 2 (P2) Efluente final da ETE	S 25°17'10,7" W 54°06'05,03"	Saída do esgoto sanitário tratado na ETE	
Ponto 3 (P3) 100 m à jusante do lançamento	S 25°17'06" W 54°06'07,2"	Área não urbanizada, com mata ciliar	
Ponto 4 (P4) 400 m à jusante do lançamento	S 25°17'01" W 54°06'12,9"	Trecho do rio que passa por uma cachoeira artificial, possui ambiente lótico, com mata ciliar bem conservada	

2.3.2 Preparo das amostras

Foram filtrados em membrana de fibra de vidro 1000 mL de amostra de água e esgoto e o pH ajustado para 7, utilizando HCl e NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

As amostras foram eluídas em cartuchos Waters® C18 previamente ativados com 2 mL de metanol, seguidos de 2 mL de água e metanol 1:1 e por fim 2 mL de água ultrapura. O fluxo de percolação foi de 5 mL min⁻¹ e após secar ao ar os analitos foram eluídos com 2,0 mL de metanol. (Figura 1).

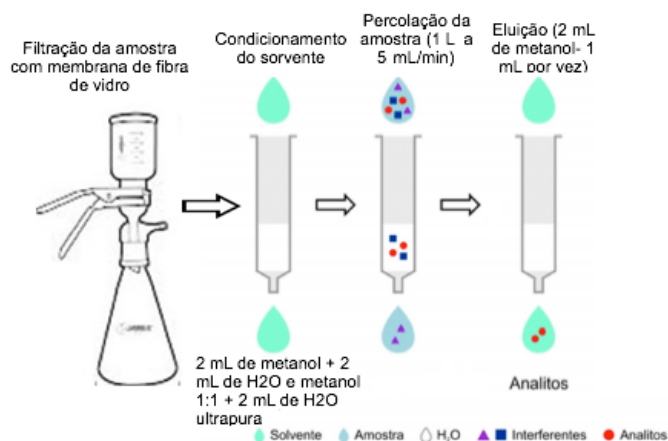


Figura 1: Fluxograma do processo de extração por fase sólida (SPE)

Fonte: Adaptado de: CALDAS, et al. (2011)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Inicialmente foram avaliados os cromatogramas de padrões dos fármacos cafeína (Figura 2) e amoxicilina (Figura 3), a fim de verificar os tempos de detecção de cada composto no comprimento de 230 nm. Pelos cromatogramas apresentados, é possível observar os picos de ambos os compostos. A cafeína foi identificada pelo pico no tempo aproximado de 3,7 min, enquanto que a amoxicilina formou dois picos, sendo detectados nos tempos de 5,7 min e 6,2 min, aproximadamente.

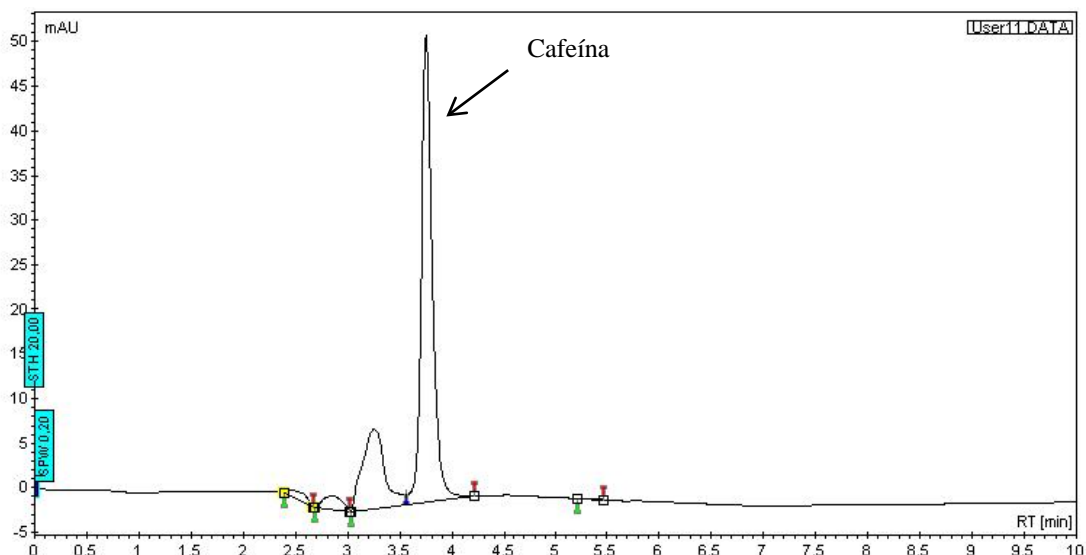


Figura 2: Cromatograma do padrão de cafeína à 5 mg L⁻¹

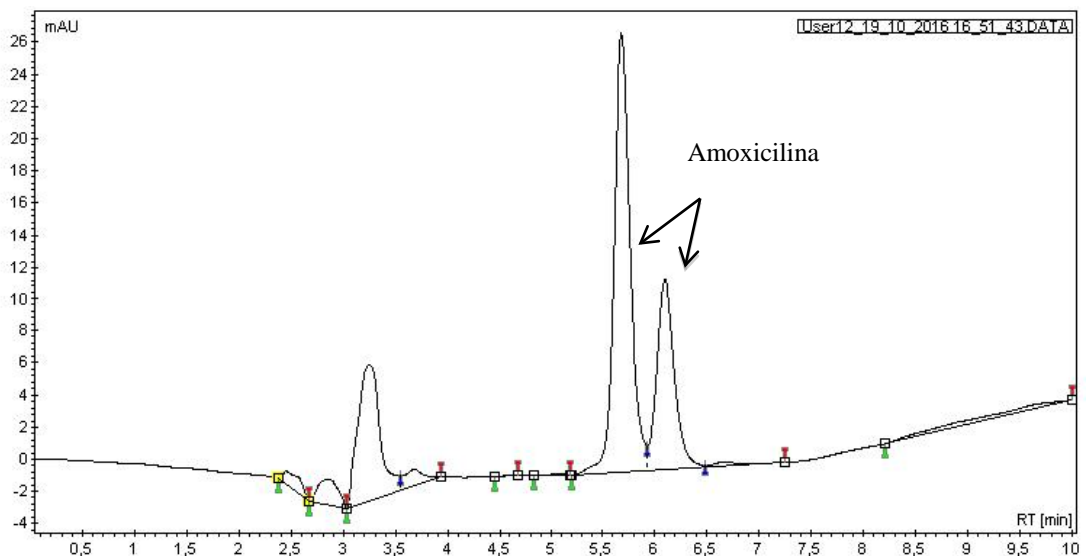


Figura 3: Cromatograma do padrão de amoxicilina à 5 mg L⁻¹

3.2 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

As curvas de calibração utilizadas para a análise da linearidade (Figura 4) foram realizadas em duplicata utilizando concentrações que variaram de 0,05 mg.L⁻¹ a 2,8 mg.L⁻¹, relacionando as áreas dos cromatogramas nos picos específicos e as concentrações. Os ajustes das curvas/linearidade foram avaliados com base ANOVA de regressão e pelo coeficiente de correlação, que segundo o INMETRO, um valor de R² maior que 0,90 é aceitável, já a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior a 0,99. Para ambos os

fármacos os coeficientes R^2 foram maiores que 0,99, indicando uma correlação fortíssima (BRITO et al., 2003). A Tabela 2 apresenta os parâmetros de calibração e análise da linearidade.

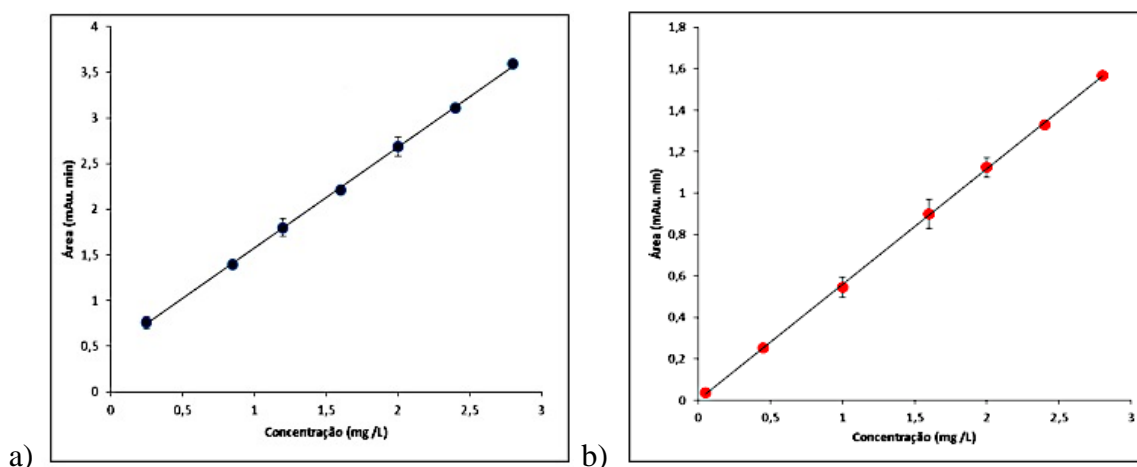


Figura 4: Curvas de calibração para o ensaio de linearidade dos fármacos: a) Cafeína. b) Amoxicilina

Tabela 2: Parâmetros de calibração e análise da linearidade

Parâmetros de Regressão		Validação Linearidade				
Equação		Regressão		Falta de ajuste		
	R^2	$F_{\text{calculado}}$	$p\text{-Valor}$	$F_{\text{calculado}}$	$p\text{-Valor}$	
CAF	$\text{ÁREA}=0,47(\pm 0,03)+1,10(\pm 0,02)[\text{CAF}]$	99,7	4738	0,0	0,23	0,9
AMO	$\text{ÁREA}=0,003(\pm 0,01)+0,56(\pm 0,07)[\text{AMO}]$	99,8	7300	0,0	0,25	0,9

$F_{\text{crítico}}(1;12; 0,05)$ de regressão = 4,75; $F_{\text{crítico}}(5;7; 0,05)$ de falta de ajuste = 3,97

Para a análise da regressão ao modelo linear o $F_{\text{calculado}}$ de cada fármaco (CAF: $F_{\text{calculado}} = 4738$; AMO: : $F_{\text{calculado}} = 7300$) foi comparado com o $F_{\text{crítico}}(1;12; 0,05)$ de regressão = 4,75. Como $F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$ para ambos os fármacos, os modelos foram considerados significativos. Com relação ao estudo da falta de ajuste também verificou-se que o modelo linear se ajusta satisfatoriamente aos dados experimentais, pois o valor de $F_{\text{crítico}}(5;7; 0,05) = 3,97$ foi maior do que o $F_{\text{calculado}}$ para cada analito ($F_{\text{crítico}} > F_{\text{calculado}}$).

Segundo Montgomery e Runger (2009), o valor p se refere ao menor nível de significância que conduz à rejeição da hipótese nula H_0 , com os dados fornecidos. Geralmente, o valor de corte para rejeitar a hipótese nula é de 0,05, o que significa que, quando não há nenhuma diferença, um valor tão extremo para a estatística de teste é esperado em menos de 5% das vezes (FERREIRA; PATINO, 2015). O $p\text{-valor}$ indica, de um ponto de vista prático, a probabilidade do efeito observado entre os tratamentos/categorias ser devido ao acaso, e não aos fatores que estão sendo estudados.

Dessa forma, como o $p\text{-valor}$ para a análise de regressão foi zero, pode-se rejeitar a hipótese nula e não há chance dessa diferença entre as médias ser devido ao acaso (e não um efeito dos tratamentos), sendo considerado altamente significativo, já para a falta de ajuste onde o $p\text{-valor}$ foi de 0,9 não se rejeita a hipótese nula e com isso o método apresenta linearidade na faixa de trabalho avaliada.

A exatidão foi estabelecida mediante a comparação entre os valores quantitativos de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, avaliada pelas curvas de calibração, utilizando três níveis de fortificação. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de recuperação para os ensaios de exatidão em três níveis.

Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação	
		Recup. Média (%) (n=3)	Desvio Padrão
CAF	2	117,0	3,9
	4	103,9	5,9
	8	102,9	6,8
AMO	2	105,7	4,0
	4	112,3	5,6
	8	102,9	3,8

Em todas as situações analisadas as recuperações médias foram consideradas altas e maiores que 100%. Os intervalos aceitáveis de recuperação para validação geralmente estão situados na faixa entre 70 e 120% (LANÇAS, 2004), com precisão de até $\pm 20\%$. No entanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI et al., 2004). Dessa forma, os resultados encontrados, vão de acordo com as faixas consideradas satisfatórias.

As recuperações obtidas nesse trabalho também são similares com alguns valores de recuperação reportados na literatura para análises de fármacos utilizando HPLC. Em um trabalho realizado por Gomes e Souza (2009), as recuperações médias de amoxicilina variaram de 84,0% a 103,74%, já no estudo de Uddin et al. (2016) as recuperações da amoxicilina estavam na faixa de 97-107%. Para a cafeína, o estudo de Dewani et al. (2015) mostrou recuperações variando de 98-102%.

Neste estudo, foram utilizados testes de repetibilidade para verificar a precisão do método. As amostras foram injetadas sob as mesmas condições de análise, no mesmo dia e em dois dias consecutivos. A Tabela 4 apresenta as precisões calculadas pelos coeficientes de variação, intradia e interdia.

Tabela 4: Níveis de precisão intradia e interdia

Analito	CV (%)	
	Intradia	Interdia
CAF	5,678	6,512
AMO	4,972	5,287

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos Coeficientes de Variação de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). Assim, de acordo com os valores analisados, o método utilizado é preciso, pois todos os compostos estudados apresentam coeficientes de variação menores que 7%.

Entretanto, a ANVISA determina valores de precisão inferiores a 5%, que ocorreu apenas na amoxicilina intradia, porém devido a complexidade das amostras podem ser aceitos valores próximos a 5%, como os verificados na Tabela 4. Cabe destacar que a ANVISA propõe parâmetros para a validação de métodos relacionados à fármacos de consumo humano em fórmulas comerciais e, portanto, matrizes simples e de baixa complexidade quando comparadas a amostras ambientais, justificando o maior rigor.

O Limite de Detecção (LD) expressa o menor valor de concentração do analito analisado que pode ser detectado pelo método, enquanto que o Limite de Quantificação (LQ) corresponde na prática ao padrão de calibração de menor concentração (INMETRO, 2011). Os respectivos LD, LQ e os níveis de Repetitividade e Precisão Intermediária estão expressos na Tabela 5.

Para a cafeína o LD foi de $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ e o LQ de $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$. Esses limites foram maiores que os encontrados por Kim et al. (2009) ($\text{LD} = 0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $\text{LQ} = 0,49 \mu\text{g.L}^{-1}$), porém ainda são considerados satisfatórios para o presente estudo, visto que foi utilizado SPE a fim elevar as concentrações dos analitos antes de serem introduzidos no sistema cromatográfico.

Tabela 5: Limites de detecção, quantificação e estimativa da precisão intermediária e da repetitividade

Analitos	Limites		Precisão	
			RP	PI
	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	CV (%) (n=3)	CV (%) (n=3)
CAF	0,08	0,27	5,7	5,0
AMO	0,05	0,18	6,5	5,3

LD= Limite de Detecção; LQ= Limite de Quantificação; CV= Coeficiente de variação; RP=Repetitividade e PI=Precisão Intermediária

Já para a amoxicilina os valores foram menores: o LD estimado foi de 0,05 mg.L⁻¹ e o LQ de 0,18 mg.L⁻¹. Os resultados indicaram que o método é sensível o suficiente para os objetivos deste trabalho tendo em vista a faixa linear de trabalho estabelecida e a pré-concentração empregada. Valores próximos foram obtidos no trabalho de Gomes e Souza (2010) que também utilizaram HPLC-UV para a detecção da amoxicilina e obtiveram valores de 0,133 e 0,442 mg.L⁻¹, para os limites de detecção e quantificação respectivamente. Já no estudo de Uddin et al. (2016) os resultados foram ainda mais similares (0,03 mg.L⁻¹ para LD e 0,10 mg.L⁻¹ para LQ), no entanto foi utilizado um sistema UPLC.

3.3 CARACTERIZAÇÃO, PREPARO DAS AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

3.3.1 Análises físico-químicas

Conforme indicado na Metodologia, os parâmetros temperatura e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos nos pontos de coleta, enquanto que o pH foi avaliado na chegada ao laboratório. Os resultados estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros Temperatura, OD e pH das amostras utilizadas

Ponto de Coleta	Temperatura (°C)	OD (mg/L)	pH
P1	21,3	1,5	6,6
P2	27	1,7	6,46
P3	24,6	7,5	5,7
P4	24,5	8,5	5,55

A temperatura não sofreu grandes variações entre os pontos de coleta analisados, não afetando assim o desenvolvimento dos organismos aquáticos. E de acordo com a Resolução CONAMA 430/2011 o despejo de efluentes em um rio deverá ter a temperatura inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura. A temperatura pode afetar as reações biológicas e as taxas de degradação de fármacos. No estudo de Castiglioni et al. (2006), baseado nos dados de remoção de seis Estações de Tratamento de Esgoto da Itália, as eficiências de remoção para a amoxicilina foram bem maiores no verão do que no inverno (uma média de 75% no inverno e 100% no verão) (CASTIGLIONI et al., 2006 *apud* VERLICCHI; AUKIDY; ZAMBELO, 2012). Dessa forma, como a coleta foi realizada em um dia com altas temperaturas, são esperadas maiores remoções.

Com relação ao parâmetro Oxigênio Dissolvido (OD), a Resolução CONAMA 357/2005 estabelece que ele deve ser inferior a 5 mg.L⁻¹ O₂, para rios Classe 2, que se enquadra o Rio Alegria. Dessa forma, esse valor foi ultrapassado em P3 e P4, podendo indicar contaminação por lançamento de efluentes sem um tratamento eficaz, porém as concentrações de OD também podem variar naturalmente, sendo portanto necessária a avaliação de mais parâmetros para indicar precisamente o grau de poluição.

O pH em todos os pontos indicou ambientes ácidos (pH<7), mas próximos da neutralidade. Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, o pH de corpos hídricos de água doce classe 2, devem estar na faixa situada entre 6,0 a 9,0, portanto em P3 e P4 os valores de pH foram menores que os padrões recomendados pela legislação, podendo afetar a fauna e flora local, além de causar outros impactos já que o pH interfere no grau de solubilidade de diversas substâncias e define o potencial de toxicidade de vários elementos (LIBÂNIO, 2008).

3.3.2 Quantificação da amoxicilina e cafeína nas amostras

Após o desenvolvimento e a validação da metodologia, foi realizada a quantificação de cafeína e amoxicilina nos pontos de coleta da Tabela 1. Todas as amostras após coletadas foram filtradas, extraídas e analisadas conforme procedimento descrito na metodologia. As concentrações do cartucho e das amostras estão indicadas na Tabela 7 e o gráfico das concentrações das amostras está ilustrado na Figura 5.

Tabela 7: Quantificação dos fármacos cafeína e amoxicilina nas amostras

Analitos	Pontos de coleta	Concentração cartucho (mg.L ⁻¹)*	Concentração amostra (µg.L ⁻¹)**
CAF	P1	59,4	118,7
	P2	ND	ND
	P3	20,5	41,0
	P4	14,9	29,9
AMO	P1	11,6	26,0
	P2	2,5	6,3
	P3	2,0	5,0
	P4	1,2	2,9

*Determinação realizada no extrato concentrado

**Concentração real na amostra considerando o fator de pré-concentração (500 vezes)

Os resultados indicam uma maior detecção da cafeína com relação à amoxicilina, o que já era esperado, visto que a cafeína está presente na formulação de diversas bebidas e alimentos frequentemente ingeridos pela população desta área de estudo. Porém o nível de amoxicilina também foi considerado significativo, até mesmo no P2, local da saída da tubulação de esgoto sanitário tratado, o que sugere que o sistema de tratamento da ETE Esgoto do município de Medianeira-PR, constituído principalmente por um Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF), além dos tratamentos preliminares e primários, não remove este antibiótico de forma eficaz.

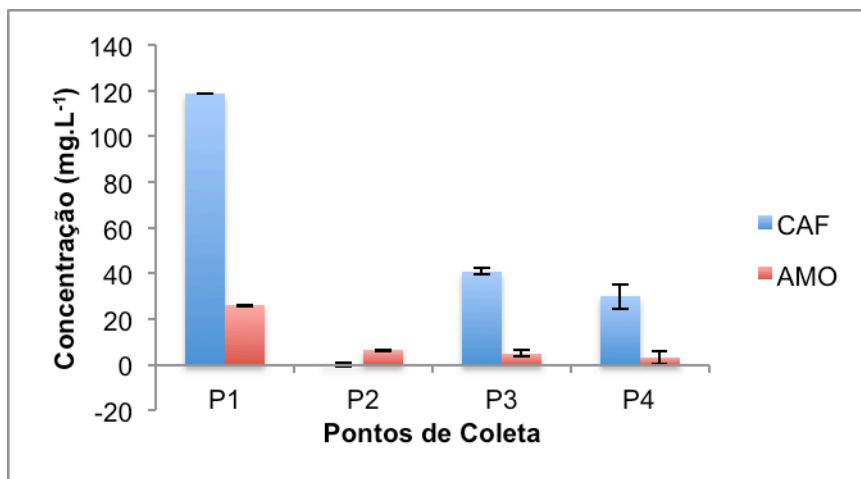


Figura 5: Determinação das concentrações de cafeína e amoxicilina nas amostras de água e esgoto

As maiores concentrações dos analitos foram verificadas em P1, referente ao esgoto bruto, antes do processo de tratamento, já que neste local ainda não houve nenhum tipo de tratamento do efluente.

Quanto maior a distância do lançamento no corpo hídrico, menor a concentração desses micropoluentes, o que pode ser verificado pelas concentrações de P3 (100 m à jusante do lançamento) e P4 (400 m à jusante do lançamento).

As concentrações detectadas dos fármacos analisados foram similares às encontradas alguns outros trabalhos. Santos et al. (2005) obtiveram concentrações de 2,7 e 6,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína em esgoto bruto e 0,56 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em efluente de uma Estação de Tratamento de Esgoto, situada em Seville, na Espanha. Já no estudo de Kim et al. (2009), foi verificada uma concentração de 11 ng.L^{-1} para a cafeína em amostras de efluente secundário de uma Estação de Tratamento de Esgoto localizada no Japão.

Com relação à amoxicilina, o estudo de Hijosa-Valsero et al. (2011) encontrou valores de $30 \pm 12 \mu\text{g.L}^{-1}$ em efluente de uma Estação de Tratamento de Esgoto localizada na Espanha, bem similar ao valor encontrado no P4, que representa o esgoto bruto da ETE analisada neste trabalho. Já Tran et al. (2016) detectou concentrações um pouco inferiores, porém ainda similares (1,855–10,131 $\mu\text{g.L}^{-1}$) para este antibiótico em amostra de efluente bruto.

Os dados obtidos em nossa pesquisa reforçam os resultados apresentados por Lopes et al. (2016) quanto a ocorrência de bactérias resistentes na mesma região de estudo à amoxicilina, indicando a dispersão desses microcontaminantes no ambiente local.

4. CONCLUSÕES

A metodologia analítica desenvolvida foi considerada válida, por atender aos parâmetros estabelecidos pela ANVISA e INMETRO, para linearidade, limite de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, além de ser considerado significativo por meio de análises estatísticas.

Os limites de detecção e de quantificação ficaram na faixa de mg.L^{-1} , devido a pré-concentração empregada, a qual foi fundamental para o estudo. A exatidão foi analisada pela recuperação dos analitos e os resultados foram acima de 100%, valores comumente encontrados em trabalhos similares. A precisão foi analisada por meio do coeficiente de variação e os resultados indicaram valores próximos a 5%.

A aplicação do método nas amostras de água de rio e de esgoto determinaram a ocorrência de cafeína e amoxicilina em todos os pontos de coleta, sugerindo que o sistema de tratamento empregado na ETE analisada não é eficaz frente a esses micropoluentes e que portanto trata-se de uma rota de inserção dessas substâncias no ecossistema local. As concentrações encontradas para a cafeína variaram entre não detectado e 0,1187 mg.L^{-1} , com um limite de detecção de 0,08 mg.L^{-1} e um limite de quantificação de 0,27 mg.L^{-1} . Já para a amoxicilina as concentrações variaram entre 0,0029 a 0,026 mg.L^{-1} , para limite de detecção de 0,05 mg.L^{-1} e um limite de quantificação de 0,18 mg.L^{-1} . Portanto, a metodologia se mostrou adequada e pode ser utilizada em outros estudos de quantificação de cafeína e amoxicilina em matrizes ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; CINIGLIA, C.; CHAMPDORÉ, M.; GIUDICE, R.; MAROTTA, R.; ZUCCATO, E. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 24, p. 6832–6838, 2004.
2. ANVISA, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, in: Resolução 899 de 29 de maio de 2003, p. 1–15, 2003.
3. BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do meio Ambiente. Resolução n. 357. Diário Oficial da União, 17 Mar. 2005.
4. CASTIGLIONI, S., FANELLI, R., CALAMARI, D., BAGNATI, R., Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environmental by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 25–32, 2004.
5. COSTA JUNIOR, Ismael L.; PLETSCH, Adeldo L.; TORRES, Yohandra R. Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente – Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1408–1431, 2014.
6. DE SOUZA LOPES, E., et al. **Métodos Analíticos utilizados para determinação de fármacos contaminantes do meio ambiente.**(2010). Disponível em: < <http://blog.newtonpaiva.br/pos/wp-content/uploads/2013/02/E2-FARM-13.pdf>>.

7. DEWANI, A. P.; DABHADE, S.M.; BAKAL, R.L.; GADEWAR, C.K.; CHANDEWAR, A.V.; PATRA, S. Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n.4, p.591-598, 2015.
8. FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que realmente significa o valor-p?. **J Bras Pneumol.**, v. 41, n. 5, p. 485-485, 2015.
9. GOMES, M. L. P. C.; SOUZA, S. V. C. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilínicos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 4, p. 972-977, 2010.
10. HIJOSA-VALSERO, M.; FINK, G.; SCHLUSENER, M. P.; SIDRACH-CARDONA, R.; MARTÍN-VILLACORTA, J.; TERNES, T.; BÉCARES, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. **Chemosphere**, v. 83, n. 5, p. 713-719, 2011.
11. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 04, 19 p., 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf>.
12. KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 1134-1140, 2009.
13. LANÇAS, F. M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. Ed. Rima, 1 ed., 43 p., 2004.
14. LONGHIN, S. R. **Estudo de degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. 2008. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de química. Universidade de Brasília, Brasília, 2008. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5154/1/2008_SandraRLonghin_completa.pdf>.
15. LOPES, B. C. **Efeitos da fotólise e fotocatalise sobre a dinâmica de fármacos presentes em esgoto sanitário tratado biologicamente**. 2014. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUOS-9UNQM7>>.
16. LOPES, T. R.; COSTA JUNIOR, I. L.; PERIOTTO, F.; PLETSCHE, A. L. Antibiotic Resistance in E. coli Isolated in Effluent From Wastewater Treatment Plant and Sediment in Receiver Body. **International Journal of River Basin Management**, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2016.
17. MAFIOLETI, J. P. **Avaliação da degradação da cafeína em amostras de água usando espectrofotometria após tratamento com processos oxidativos avançados**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)- Curso Superior em Engenharia Ambiental, UNIVATES. Lajeado, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10737/632>>.
18. MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOUGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**. Sociedade Brasileira de Química, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.
19. MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade Para Engenheiros**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC (2009).
20. QUEIROZ, F. B. de. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Mestrado em Engenharia Ambiental, 2011.
21. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
22. SANTOS, J.L.; APARICIO, I; ALONSO, E.; CALLEJÓN, M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. **Analytica Chimica Acta**, v. 550, p. 116-122, 2005.
23. SILVA, V. V. da. Degradação de amoxicilina por Fenton e Foto-fenton. Trabalho de Diplomação (Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Engenharia Química, 2015. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/127758/000970472.pdf?sequence=1>>.
24. SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H.. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quím. Nova**, São Paulo, v.34, n.4, p. 665-676, 2011.
25. SNIS, Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Diagnósticos dos serviços de água e esgoto, 2014. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2014>>.

26. TRAN, N. H.; HONGJIE, C.; VAN DO, T.; REINHARD, M.; NGO, H.H.; HE, Y.; GIN, K.Y. Simultaneous analysis of multiple classes of antimicrobials in environmental water samples using SPE coupled with UHPLC-ESI-MS/MS and isotope dilution. **Talanta**, v. 159, p. 163-173, 2016.
27. UDDIN, M. N.; DAS, S.; KHAN, S. H.; SHILL, S. K.; BHUIYAN, H. R.; KARIM, R. Simultaneous determination of amoxicillin and chloramphenicol and their drug interaction study by the validated UPLC method. **Journal of Talibah University for Science**, v. 10, n. 5, p. 755-765, 2016.
28. VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M. ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. **Science of the total environment**, v. 429, n. 1, p. 123-155, 2012.