

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Darlina Mello Souza**

**DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR:  
MÉTODO, OCORRÊNCIA, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO,  
DEGRADAÇÃO POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO**

**DOUTORADO**

**Santa Maria, RS – Brasil  
2018**



**Darlina Mello Souza**

**DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR:  
MÉTODO, OCORRÊNCIA, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO, DEGRADAÇÃO  
POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de Concentração em Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**

**Orientador: Prof. Emérito Titular Dr. Ayrton Figueiredo Martins**

**Santa Maria, RS – Brasil  
2018**

Souza, Darliana Mello

Drogas anticâncer em efluente hospitalar: Método, ocorrência, avaliação preliminar de risco, degradação por fotólise e ozonização / Darliana Mello Souza - 2018.

169 p.; 30 cm

Orientador: Ayrton Figueiredo Martins

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Drogas anticâncer 2. Efluente hospitalar 3. Cromatografia Líquida 4. Preparo de amostra 5. Processos avançados I. Martins, Ayrton Figueiredo II.Título.

**Darlina Mello Souza**

**DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR:  
MÉTODO, OCORRÊNCIA, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO, DEGRADAÇÃO  
POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**

**Aprovado em 06 de setembro de 2018:**



**Ayrton Figueiredo Martins, Prof. Emérito Tit. Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Carla Sirtori, Dra. (UFRGS)**



**Daniel Ricardo Arsand, Dr. (IFSul)**



**Énio Leandro Machado, Dr. (UNISC)**



**Paola de Azevedo Mello, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria, RS – Brasil**  
**2018**



Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Ivalmir e Vera.  
As minhas irmãs, Luciane e Carliana.  
Ao meu amor, Rudinei.

Por nunca medirem esforços para que vitórias como esta se tornassem possíveis. Obrigada por todo amor, carinho, apoio, compreensão e incentivo incondicionais.





## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, pela formação, infraestrutura e políticas públicas de assistência estudantil para permanência, ao longo destes quase 10 anos. Considero-me privilegiada, pois, num país que não garante a todos os seus cidadãos o acesso aos níveis mais elevados de ensino, tive a honra de frequentar uma universidade pública, gratuita e de qualidade, em um programa de pós-graduação conceito CAPES 7.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** da UFSM e ao **Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER)**, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Ayrton Figueiredo Martins**, por ter aberto as portas do LATER e receber-me como sua aluna de doutorado. Pela orientação, imenso aprendizado e oportunidades ímpares de crescimento durante todos estes anos. Obrigada pela confiança e por ter sido mais que um orientador, um amigo.

Aos **professores e funcionários** do PPGQ, em especial ao Ademir e à Valéria pela atenção e auxílio, principalmente na parte burocrática, sempre com muito zelo e competência; ao Prof. Dr. **Fábio Duarte**, pela sua dedicação e substancial contribuição frente à coordenação do PPGQ e ao Prof. Dr. **José Neri Paniz**, incansável e presente em nos ajudar em todos os momentos.

Aos membros da comissão examinadora de qualificação e defesa de tese, Dra. **Carla Sirtori**, Dr. **Carlos Alberto A. de Almeida**, Dr. **Daniel Arsand**, Dra. **Maria Tereza Friedrich**, Dr. **Ênio Machado**, Dra. **Marta B. Adaime**, Dra. **Paola de A. Mello**, pelas contribuições e sugestões.

Aos **colegas do LATER**, tanto aos que fazem parte do grupo atualmente, como a todos aqueles que por lá passaram ao longo desta jornada, com os quais eu pude conviver e aprender. Em especial, à **Jaqueline Reichert**, pelo convívio, amizade e colaboração direta no desenvolvimento deste projeto e outros desenvolvidos concomitantes e à **Haline Homrich**, **Juliana A. Gonçalves** e **Vanessa R. do Nascimento** pelo auxílio na execução da parte experimental do trabalho.

Ao órgão de fomento **CNPq**, pelo apoio financeiro.



“Se as coisas são inatingíveis... Ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”

(Mario Quintana)



## RESUMO

### **DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR: MÉTODO, OCORRÊNCIA, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE RISCO, DEGRADAÇÃO POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO**

AUTORA: Darliana Mello Souza

ORIENTADOR: Prof. Emérito Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

Na última década, a demanda por drogas anticâncer tem crescido consideravelmente. Estes produtos constituem uma das classes de fármacos com grande potencial para causar danos ao ambiente, mesmo em baixas concentrações, e podem ter efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Fatores como a destinação incorreta, a ineficiência dos sistemas de tratamento de esgoto e o consumo crescente de fármacos, têm contribuído para a contaminação ambiental com estes contaminantes emergentes. Tais aspectos motivaram esta pesquisa, dedicada ao estudo da ocorrência e da degradação química de quatro drogas anticâncer, sendo estas doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina e irinotecano. Para tanto, a primeira etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento de método cromatográfico empregando extração em fase sólida e microextração líquido-líquido dispersiva para a quantificação destas quatro drogas anticâncer. O método desenvolvido foi empregado na quantificação destes antineoplásicos no efluente do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria. As concentrações determinadas foram, então, preliminarmente, avaliadas quanto ao risco ecotoxicológico. Os processos de fotólise e ozonização, foram escolhidos como 'processos avançados' para investigar a degradação das drogas anticâncer, como pós-tratamento ao sistema microbiológico de tanques sépticos. Os resultados da validação do método desenvolvido mostram coeficientes de determinação superiores a 0,99 e valores de recuperação entre 74% e 105%, com uma precisão intradiária <15%. O limite de quantificação foi de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e o efeitos de matriz foi negligenciável. Dessa forma, os parâmetros necessários para avaliar a confiabilidade analítica dos resultados e garantir a qualidade dos experimentos foram obtidos com sucesso, de acordo com o guia de controle de qualidade analítica e procedimento de validação de métodos SANTE e em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Isto torna possível o emprego do método proposto para a determinação das drogas anticâncer em questão, em amostras de efluente hospitalar. No estudo do efluente gerado pelo Hospital Universitário, no período de sete dias, os quatro antineoplásicos foram quantificados na faixa de  $\text{LOQ} \leq 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $6,22 \mu\text{g L}^{-1}$ . Uma avaliação preliminar das concentrações de ocorrência dos anticânceres revelou que constituem alto risco ecotoxicológico. Os experimentos em escala de bancada, empregando-se processos avançados de degradação dos quatro antineoplásicos, tanto via fotólise quanto via ozonização, apresentam-se como complemento aos processos microbiológicos de tratamento de efluentes. Por fim, a ozonização mostrou-se, como esperado, mais eficiente na degradação das moléculas de anticâncer comparado à fotólise.

**Palavras-chave:** Drogas anticâncer. Efluente hospitalar. Cromatografia Líquida. Extração em fase sólida. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva. Ozonização. Fotólise.



## ABSTRACT

### ANTI-CANCER DRUGS IN HOSPITAL EFFLUENT: METHOD, OCCURRENCE, PRELIMINARY RISK ASSESSMENT, DEGRADATION BY PHOTOLYSIS AND OZONIZATION

AUTHOR: Darliana Mello Souza

ADVISOR: Prof. Emeritus Tit. Dr. Ayrton Figueiredo Martins

In the last decade, the demand for anti-cancer drugs has grown considerably. These products are one of the drug classes with great potential to cause harm to the environment, even in low concentrations, and may have cytotoxic, genotoxic, mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects. Factors such as misallocation, inefficiency of sewage treatment systems and increasing drug consumption have contributed to environmental contamination with these emerging contaminants. These aspects motivated this research, dedicated to the study of the occurrence and chemical degradation of four anticancer drugs, such as doxorubicin, daunorubicin, epirubicin and irinotecan. The first stage of the study consisted of the development of a chromatographic method using solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction to quantify these four anti-cancer drugs. The method developed was used in the quantification of these antineoplastics in the hospital effluent of the Federal University of Santa Maria. The determined concentrations were then preliminarily evaluated for ecotoxicological risk. Photolysis and ozonation processes were chosen as 'advanced processes' to examine the degradation of anti-cancer drugs, as post-treatment to the microbiological system of septic tanks. The results of the validation of the method developed show coefficients of determination superior to 0,99 and values of recovery between 74% and 105%, with intraday precision <15%. The quantification limit was  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  and the matrix effects were negligible. Thus, the parameters necessary to evaluate the analytical reliability of the results and to guarantee the quality of the experiments were obtained successfully, according to the guide of analytical quality control and method validation procedure SANTE and in accordance with the guidelines established by ABNT NBR ISO / IEC 17025. This makes it possible to use the proposed method for the determination of the anti-cancer drugs in concern, in hospital effluent samples. In the study of the effluent generated by the University Hospital, in the period of seven days, the four antineoplastics were quantified in the range of  $\text{LOQ} \leq 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $6.22 \mu\text{g L}^{-1}$ . A preliminary assessment of the concentrations of anti-cancer occurrences revealed that they constitute a high ecotoxicological risk. The in-bench scale experiments using advanced degradation processes of the four antineoplastics, both via photolysis and via ozonation, complement the microbiological processes of effluent treatment. Finally, ozonation showed, as expected, more efficient degradation of anti-cancer molecules compared to photolysis.

**Keywords:** Anti-cancer drugs. Hospital Effluent . Liquid Chromatography. Solid phase extraction. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. Ozonation. Photolysis.





# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1	<i>Introdução.....</i>	27
1.2	<i>Objetivos.....</i>	29
1.2.1	<i>Objetivos Específicos.....</i>	29
1.3	<i>Organização da tese.....</i>	30
<b>2</b>	<b>ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR: REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
2.1	<i>DROGAS Anticâncer: Caracterização geral.....</i>	35
2.2	<i>Propriedades de Interesse Ambiental.....</i>	41
2.3	<i>Hospitais como fontes de entrada de resíduos de drogas anticâncer no meio ambiente.....</i>	45
2.4	<i>Hospital Universitário de Santa Maria.....</i>	48
2.5	<i>Determinação de drogas anticâncer no meio ambiente.....</i>	52
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO HPLC-FLD E EXTRAÇÃO POR SPE E DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR.....</b>	<b>57</b>
3.1	<i>Introdução.....</i>	59
3.2	<i>Materiais e Métodos.....</i>	61
3.2.1	<i>Instrumentação.....</i>	61
3.2.2	<i>Solventes, reagentes e gases.....</i>	62
3.2.3	<i>Padrões e soluções analíticas.....</i>	62
3.2.4	<i>Condições cromatográficas.....</i>	63
3.2.5	<i>Otimização da extração em fase sólida.....</i>	63
3.2.6	<i>Otimização da microextração líquido-líquido dispersiva.....</i>	67
3.2.7	<i>Procedimento de validação.....</i>	69
3.3	<i>Resultados e discussão.....</i>	70
3.3.1	<i>Condições cromatográficas.....</i>	70
3.3.2	<i>Extração em fase sólida.....</i>	73
3.3.3	<i>Microextração líquido-líquido dispersiva.....</i>	81
3.3.4	<i>Validação do método.....</i>	88
3.4	<i>Conclusão.....</i>	91

<b>4</b>	<b>OCORRÊNCIA DE DOXORRUBICINA, EPIRRUBICINA, DAUNORRUBICINA E IRINOTECANO EM EFLUENTE HOSPITALAR .....</b>	<b>93</b>
4.1	<i>Introdução</i> .....	95
4.2	<i>Materiais e Métodos</i> .....	96
4.3	<i>Resultados e Discussão</i> .....	98
4.3.1	Avaliação do perfil da ocorrência de anticânceres ao longo de um dia .....	98
4.3.2	Ocorrência de drogas anticâncer em efluente hospitalar .....	100
4.3.3	Avaliação preliminar de riscos ambientais .....	103
4.4	<i>Conclusões</i> .....	105
<b>5</b>	<b>ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ANTICÂNCER POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO.....</b>	<b>107</b>
5.1	<i>Introdução</i> .....	109
5.2	<i>Materiais e métodos</i> .....	112
5.2.1	Processos de degradação por ozonização e fotólise .....	113
5.3	<i>Resultados e discussão</i> .....	116
5.3.1	Degradação via fotólise .....	116
5.3.2	Degradação via ozonização .....	121
5.4	<i>Conclusões</i> .....	123
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>167</b>

## FIGURAS

Figura 2.1 – Distribuição das espécies de doxorubicina, epirubicina; Daunorubicina e Irinotecano em função do pH.....	44
Figura 2.2 – Imagem de satélite da região de localização do Hospital Universitário de Santa Maria. ....	49
Figura 2.3 – Localização do Hospital Universitário de Santa Maria. ....	50
Figura 2.4 – Representação esquemática do sistema de tratamento de efluente adotado pelo HUSM.....	51
Figura 3.1 – Esquema do procedimento geral de SPE efetuado para escolha do cartucho adequado .....	65
Figura 3.2 – Solventes utilizados para os testes de condicionamento do sorvente e eluição dos analitos do procedimento de extração SPE.....	65
Figura 3.3 – Esquema do procedimento geral de DLLME efetuado para escolha da mistura de solventes extrator:dispersor adequada. ....	67
Figura 3.4 – Cromatograma obtido para separação dos analitos em estudo por HPLD-FLD em solução analítica preparada em metanol na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ com eluição no modo gradiente.....	71
Figura 3.5 – Cromatograma obtido para separação obtida por HPLD-FLD de um extrato de matriz obtido por SPE com eluição no modo gradiente. ....	73
Figura 3.6 – Influências do material de fase sólida (pH 7 e metanol como solvente de eluição e fortificação da amostra em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), nas recuperações de extração de SPE.....	74
Figura 3.7 – Seleção de solventes para: (A) condicionamento e equilíbrio do cartucho SPE; (B) eluição dos analitos (Cartucho SPE Chromabond C18 ec e pH da amostra 7).....	75

- Figura 3.8 – Diagrama de Pareto para os efeitos para a extração em fase sólida. Linha vertical no diagrama define o nível de 95% de confiança. .... 76
- Figura 3.9 – Superfície de resposta obtida por Planejamento Composto Central para: (A) Porcentagem de Ácido fórmico adicionado ao solvente de eluição vs pH da amostra, para daunorrubicina; (B) pH da amostra vs volume de metanol para eluição, para irinotecano; (C) pH da amostra vs porcentagem de ácido fórmico adicionado ao solvente de eluição; para doxorrubicina (D) pH da amostra vs volume de metanol para eluição, para epirubicina. .... 78
- Figura 3.10 – Perfil das variáveis independentes relacionadas à desejabilidade de recuperação dos anticânceres em estudo por SPE. .... 79
- Figura 3.11 – Etapas do procedimento de extração em fase sólida, e variáveis otimizadas utilizando experimentos univariados e planejamento multivariado. .... 80
- Figura 3.12 – Efeito de diferentes misturas de solventes testados como extrator/dispersor na eficiência de extração por DLLME. Volume do solvente extrator 300  $\mu$ L; volume de solvente dispersor 700  $\mu$ L..... 81
- Figura 3.13 – Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança ..... 83
- Figura 3.14 – Perfil das variáveis independentes relacionadas à desejabilidade de recuperação dos anticânceres em estudo por DLLME..... 84
- Figura 3.15 - Superfície de resposta obtida por Planejamento Composto Central para: (A) Força iônica vs pH da amostra, para Irinotecano; (B) pH da amostra vs Força iônica, para doxorrubicina; (C) pH da amostra vs força iônica para daunorrubicina; (D) pH da amostra vs força iônica, para epirubicina..... 86
- Figura 3.16 – Etapas do procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva otimizadas e variáveis otimizadas utilizando experimentos univariados e planejamento multivariado. .... 87

Figura 4.1 - Representação esquemática do sistema de esgotos e sistema de tratamento de efluentes do HUSM.....	97
Figura 4.2 – Perfil temporal da ocorrência de drogas anticâncer no efluente do HUSM durante um dia, em dois pontos de coleta. Barras de erro representam o desvio padrão das réplicas (n=3) .....	99
Figura 5.1 – Representação esquemática do fotorreator empregado para os experimentos de fotólise.....	114
Figura 5.2 - Representação esquemática do reator empregado para os experimentos de ozonização.....	115
Figura 5.3 – Gráficos de degradação por fotólise dos compostos anticâncer com amostra em pH 5, 7 e 9. ....	117
Figura 5.4 – Cinética de reação para degradação de anticâncer por fotólise em efluente hospitalar .....	120
Figura 5.5 – Gráficos de degradação por ozonização dos compostos anticâncer com amostra em pH 5, 7 e 9. ....	121
Figura 5.6 - Cinética de reação para degradação de anticâncer por ozonização em efluente hospitalar .....	122



## TABELAS

Tabela 2.1 – Classificação Anatômico Terapêutica e Química de drogas anticâncer (drogas citotóxicas, citostáticas e terapia hormonal).....	37
Tabela 2.2 – Propriedades físico-químicas de compostos em estudo ordenados por classificação Anatômico Terapêutica e Química (ATC).....	42
Tabela 2.3 – Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos em efluentes hospitalares e esgotos urbanos.....	47
Tabela 2.4 – Estudos reportados na literatura com relação a ocorrência de doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina e irinotecano em amostras ambientais .....	54
Tabela 3.1 – Especificações cartuchos SPE testados como sorbentes.....	64
Tabela 3.2 – Planejamento experimental para identificação das variáveis que exercem maior influência na extração por SPE dos anticânceres em estudo.....	66
Tabela 3.3 – Planejamento experimental para identificação das variáveis que exercem maior influência na extração por DLLME dos anticânceres em estudo.....	68
Tabela 3.4 – Condições instrumentais de detecção para determinação de drogas anticâncer, empregando HPLC-FLD em efluente hospitalar.....	72
Tabela 3.5 – Planejamento experimental para a otimização das variáveis da SPE empregando planejamento composto central.....	77
Tabela 3.6 – Planejamento experimental para a otimização das variáveis da DLLME empregando planejamento composto central.....	83
Tabela 3.7 – Resultados obtidos para validação de SPE e DLLME em termos de R <sup>2</sup> , precisão ( <i>intraday</i> e <i>interday</i> ), exatidão (recuperação) e efeito matriz (%)...	89

Tabela 4.1 – Concentração de anticâncer $\pm$ SD (in $\mu\text{g L}^{-1}$ ), determinadas no efluente hospitalar do HUSM, no período de 7 dias, empregando DLLME-HPLC-FLD. ....	101
Tabela 4.2 - Quociente de Risco e índice PBT para cada anticâncer em estudo..	104
Tabela 5.1 – Dados obtidos pelo processo de degradação via fotólise quanto a ordem de reação, constante cinética observada (K), tempo de meia vida e ajuste ao modelo (R <sup>2</sup> ). ....	119
Tabela 5.2 – Dados obtidos pelo processo de degradação via ozonização para reação de pseudo-primeira ordem, constante cinética observada (K), tempo de meia vida e ajuste ao modelo (R <sup>2</sup> ). ....	122



# **1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO**

---



## 1.1 INTRODUÇÃO

Os produtos farmacêuticos são uma classe diversificada de produtos químicos bioativos com larga utilização doméstica, veterinária e hospitalar (TERNES, 1998; NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; BALAKRISHNA et al., 2017; GOGOI et al., 2018). Após administração, os fármacos são excretados, em grande parte, inalterados ou metabolizados e, assim, podem entrar no ciclo da água (BARCELÓ, 2007; HERNANDEZ et al., 2007; KÜMMERER, 2009).

Conseqüentemente, os resíduos destes produtos e seus metabólitos têm sido detectados em diferentes compartimentos ambientais, com destaque para os ecossistemas aquáticos, bem como em efluentes provenientes de estações de tratamento de águas residuárias (MOMPELAT; BOT; THOMAS, 2009; FRÉDÉRIC; YVES, 2014; LUO et al., 2014; AUS DER BEEK et al., 2016). Os primeiros estudos sobre este tema datam da década de 70, em que produtos farmacêuticos no ambiente foram objeto de interesse científico e consciência pública (TABAK; BRUNCH, 1970; NORPOTH et al., 1973; RICHARDSON; BOWRON, 1985; AHERNE; BRIGGS, 1989).

A contaminação ambiental por fármacos residuais constitui uma preocupação mundial, com crescente número de trabalhos nos últimos anos (KÜMMERER, 2001a; BRACK; DULIO; SLOBODNIK, 2012; QUADRA et al., 2017; BOTERO-COY et al., 2018). Especial atenção é dada para algumas classes de substâncias, como é o caso dos antibióticos, relacionados com o desenvolvimento de bactérias multirresistentes (REINTHALER et al., 2003; AUERBACH; SEYFRIED; MCMAHON, 2007; BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008), também dos hormônios, associados às alterações endócrinas (HALLDIN et al., 1999; HALLDIN, 2005; KAMATA et al., 2006) e, mais recentemente, o caso das drogas anticâncer, pelos potenciais efeitos mutagênicos, teratogênicos, citotóxicos e genotóxicos (KÜMMERER; AL-AHMAD, 2010; FERRANDO-CLIMENT et al., 2015; NEGREIRA et al., 2015).

As drogas farmacêuticas têm sido majoritariamente detectadas em nanogramas e microgramas por litro (YANG et al., 2017; BEN et al., 2018), podendo, no entanto, essas concentrações serem suficientes para induzir efeitos tóxicos (PINO-OTÍN et al., 2017; SAARI; SCOTT; BROOKS, 2017). A maioria destes produtos é lançada no ambiente em uma base contínua (DAUGHTON; TERNES, 1999), o que compensa possíveis taxas de transformação/remoção (BARCELÓ, 2003). Em suma,

o contínuo processo de liberação de fármacos para o ambiente resulta na sua presença sistemática, principalmente no ambiente aquático (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Os fármacos são detentores de diversas propriedades que os tornam propensos a permanecer no ambiente. Geralmente, possuem tempos de meia-vida longos, o que permite que se acumulem ao longo da cadeia alimentar, atingindo quantidades significativas e biologicamente ativas (ZUCCATO et al., 2000). São maioritariamente lipofílicos, o que lhes permite atravessar membranas biológicas e, assim, serem mais facilmente absorvidos. A sua lipofilia é a principal razão porque estes são considerados potencialmente perigosos para a saúde pública e para o ambiente (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; DAUGHTON; TERNES, 1999).

As drogas de utilização farmacêutica são desenvolvidas para serem resistentes à biodegradação. A estabilidade metabólica geralmente melhora a ação farmacológica desejada, no entanto, contribui para a sua persistência no meio ambiente tendo em vista que tais fármacos são projetados para evitar serem inativados antes de fornecer o seu efeito terapêutico. Portanto, isso implica a sua permanência no ambiente por um período de tempo significativo (DAUGHTON; TERNES, 1999; SANDERSON et al., 2004; FATTA-KASSINOS; MERIC; NIKOLAOU, 2011). Uma vez no meio ambiente, a mobilidade dos fármacos pode ser comparada com a dos pesticidas, por apresentarem características físico-químicas semelhantes (HALLING-SØRENSEN et al., 1998).

Com relação a sua eficácia, os fármacos possuem elevada biodisponibilidade e também ampla potência farmacológica, considerando-se que pequenas quantidades podem exercer efeitos assinaláveis. Todas estas considerações assumem particular importância, visto estas características justificarem o exercício de efeitos tóxicos, tanto em humanos como em organismos não alvo que estão expostos por via ambiental.

É ainda importante ter em consideração que é pouco provável que os fármacos exerçam atividade no ambiente, isoladamente. Ou seja, muitos deles poderão ter atividade aditiva ou até mesmo sinérgica com outros fármacos também presentes no ambiente, o que acarreta um risco acrescido de efeitos de toxicidade ambiental (CLEUVERS, 2003). Contudo, a complexidade da mistura química presente no ambiente aquático e a falta de conhecimento do modo de ação dos diversos compostos nos organismos, constituem um obstáculo para a definição de

concentrações seguras destes contaminantes que podem ser liberadas para o ambiente (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

A avaliação precisa do impacto dos produtos farmacêuticos sobre o meio ambiente é difícil. Isto se deve à multiplicidade de fontes de entrada no ambiente, além da indisponibilidade de dados quantitativos sobre a distribuição relativa desses produtos em todas as fontes de emissão (MOMPELAT; BOT; THOMAS, 2009).

## 1.2 OBJETIVOS

A necessidade de aprimoramento constante de informação considerando a diversidade de compostos destinados para tratamento do câncer, assim como a falta de informações sobre a ocorrência dessas drogas no ambiente aquático, sua toxicidade inerente e sua presumível persistência mesmo após tratamento microbiológico motivaram a realização de uma pesquisa dedicada a aspectos como: desenvolvimento de método analítico para determinação de quadro drogas anticâncer em efluente hospitalar, avaliação da ocorrência e quantificação, avaliação preliminar da ecotoxicidade e estudo da degradação dos fármacos em estudo no efluente por meio de processos avançados, a fim de garantir uma descarga segura de efluentes contaminados por tais drogas ao meio ambiente. Desta forma, têm-se como objetivos específicos:

### 1.2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar *in house* (intralaboratorial) um método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC–FLD), extração em fase sólida (SPE) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), para a determinação e quantificação simultânea de resíduos das drogas anticâncer doxorubicina, daunorribicina, epirrubicina e irinotecano;

- Empregar o método proposto para quantificar os quatro medicamentos anticâncer selecionados, no efluente gerado pelo Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- Conduzir avaliação preliminar do risco ecotoxicológico gerado pelo descarte no ambiente do efluente hospitalar com relação às concentrações das drogas anticâncer estudadas;
- Estudar o uso da ozonização e da fotólise como tratamento terciário para degradação dos anticânceres no efluente hospitalar após o tratamento microbiológico.

### 1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Com base nos objetivos, organizou-se a presente tese de doutorado em capítulos, cada um com um tópico específico.

Uma introdução geral sobre os fármacos anticâncer e a problemática destes como contaminantes emergente, principalmente no efluente hospitalar, foi abordada no primeiro e segundo capítulos. Tais ponderações foram breves, levando em consideração que os demais capítulos, em especial a partir do terceiro, contêm uma introdução a cerca do tema abordado, seguida de materiais e métodos, resultados e discussão, e bibliográfica utilizada.

O Capítulo 3 compreende o desenvolvimento do método analítico empregado para a quantificação de drogas anticâncer no efluente hospitalar. Os diferentes estágios de um método analítico para quantificação de fármacos são abordados, incluindo a otimização das condições cromatográficas, desenvolvimento e otimização multivariada das etapas de extração, assim como a descrição de cada parâmetro da validação.

Ao longo do Capítulo 4, é descrita a determinação das drogas anticâncer no efluente gerado pelo HUSM, empregando-se o método analítico cromatográfico desenvolvido. Além disso, com base nos dados de ocorrência obtidos nesses estudos, bem como em dados ecotoxicológicos gerados em outros estudos, também foi realizada uma avaliação do risco potencial desses medicamentos para o meio ambiente.

No Capítulo 5, são descritos dois processos avançados para a degradação dos fármacos em estudo em amostras de efluente. Especial atenção é dada aos processos de fotólise e à ozonização, sendo que a variável pH também foi estudada.

Na sequência, são feitas considerações finais a respeito da tese e são listadas as referências de literatura utilizadas neste estudo.





## **2 ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR: REVISÃO DE LITERATURA**

---



## 2.1 DROGAS ANTICÂNCER: CARACTERIZAÇÃO GERAL

O câncer é um problema de saúde pública, inquestionável, especialmente entre os países em desenvolvimento (INCA, 2018). Dados da Organização Mundial da Saúde, indicam que em todo o planeta, o câncer é responsável por 8,2 milhões de mortes todos os anos (STEWART; WILD, 2014). O crescimento e o envelhecimento da população devem contribuir para 21,7 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes por câncer, até o ano de 2030 (IARC, 2018). Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano (INCA, 2018). A explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. A redefinição dos padrões de vida, a partir da uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo desencadeada pelo processo global de industrialização, tem reflexos importantes no perfil epidemiológico das populações (INCA, 2018). Além disso, fatores hereditários também contribuem para esse aumento (HUANG et al., 2018).

A maior incidência de doenças cancerígenas na população tem levado a um aumento no consumo de drogas de uso farmacêutico para o tratamento. Como as tendências de consumo influenciam diretamente as quantidades que entram no ambiente, pode-se prever uma descarga ainda maior desse tipo de substância no meio ambiente, nos próximos anos. Durante os últimos anos, o uso crescente de fármacos na terapia do câncer tem sido um problema emergente em pesquisa ambiental (MAHNIK et al., 2007).

As drogas farmacêuticas utilizadas no tratamento do câncer (denominadas anticâncer ou antineoplásicos) pertencem a um amplo grupo de compostos orgânicos, que possuem uma grande variedade de características físico-químicas. São usados em menores quantidades, em comparação com outras substâncias farmacêuticas, tais como anti-inflamatórios. Dada a toxicidade desses compostos, mesmo em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), eles podem oferecer risco à saúde humana e animal (TOOLARAM; KÜMMERER; SCHNEIDER, 2014).

Muitas dessas drogas são genotóxicas e podem causar efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos. Consequentemente, se tem a necessidade de obter dados para a compreensão do risco desses contaminantes no meio ambiente (SANTANA-VIERA et al., 2016). São uma das classes de produtos farmacêuticos com maior

potencial para causar efeitos negativos no ambiente. No entanto, o número de estudos em relação a esses compostos é limitado, apesar do crescente interesse científico na ocorrência de drogas anticâncer em amostras ambientais (MARTÍN et al., 2011; BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012; NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013; PARRELLA et al., 2014; LEDER; RASTOGI; KÜMMERER, 2015; ISIDORI et al., 2016; FRANQUET-GRIELL et al., 2017a; BOTTONI; CAROLI, 2018).

Atualmente, dois grupos principais de drogas anticâncer são usadas, conforme mostrado na Tabela 2.1: Os agentes antineoplásicos (citotóxicos e citostáticos) e as de terapia endócrina (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012). A classificação Anatómico Terapêutica e Química (ATC) categoriza os citostáticos na classe L – antineoplásicos e imunomoduladores, de acordo com suas estruturas químicas e propriedades terapêuticas (WHO, 2011).

Em estudos conduzidos sobre a ocorrência e efeitos de drogas anticâncer no ambiente, os termos citotóxico ou citostático têm sido usados sem discriminação para explicar as drogas anticâncer em geral. No entanto, agentes citotóxicos e citostáticos podem diferir grandemente em seu mecanismo de ação. As drogas citotóxicas são compostos que interagem com o DNA, levando à morte celular. Enquanto os agentes citostáticos exibem mecanismos de ação um pouco diferentes, levando a uma diminuição na proliferação de células tumorais sem interagirem com o DNA (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012)

As drogas citotóxicas são empregadas no tratamento do câncer, danificando o DNA, inibindo a sua síntese e interrompendo a replicação celular. Tais medicamentos possuem ação não-seletiva, atingindo todas as células em replicação (LENZ et al., 2005; YIN et al., 2010a; NOVAK et al., 2017). Devido a esse mecanismo, representam perigo para a saúde, pois podem ter efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos em organismos não-alvo (JOHNSON et al., 2008; KÜMMERER; AL-AHMAD, 2010; BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012; NEGREIRA et al., 2015; LUTTERBECK et al., 2016). A terapia endócrina também requer especial atenção, devido a suas propriedades hormonais ou anti-hormonais, podem ter ação como disruptores endócrinos com consequentes danos à vida humana e selvagem em baixas doses (MULLOT et al., 2009; BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012).

Tabela 2.1 – Classificação Anatômico Terapêutica e Química de drogas anticâncer (drogas citotóxicas, citostáticas e terapia hormonal).

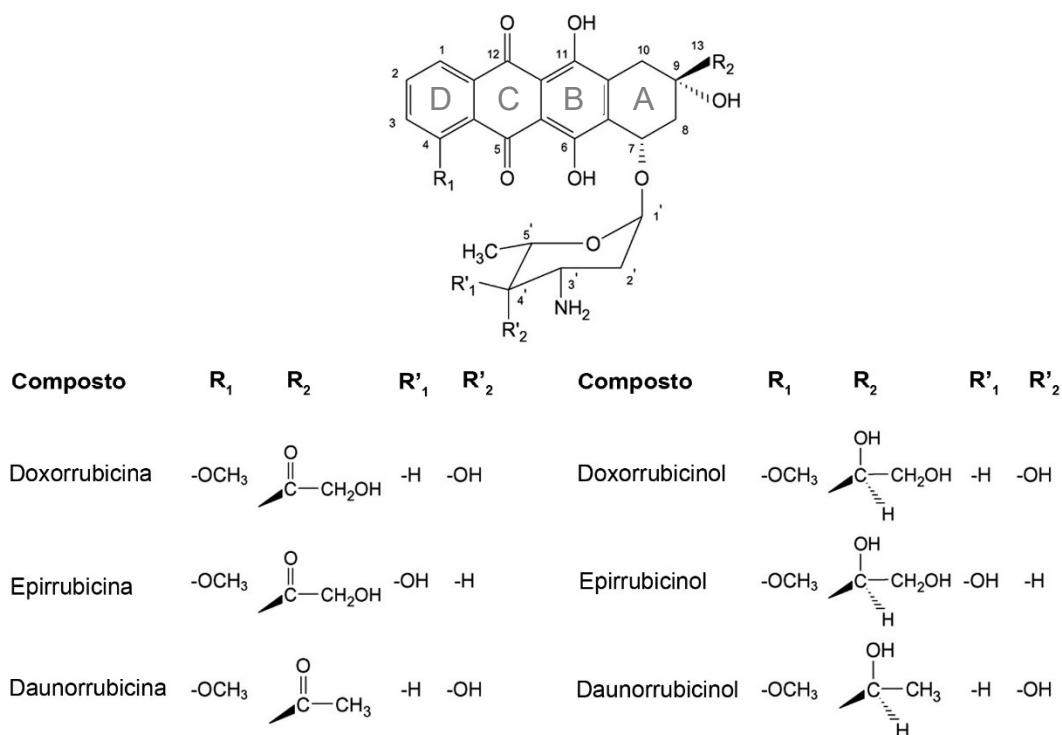
Classe ATC	Categoria	Mecanismo de ação	Detalhes do mecanismo	
Agentes antineoplásicos (ATC L01)	Citotóxicos que interagem diretamente com o DNA	Agentes alquilantes	Adicionam um ou mais grupos nucleófilos ao DNA e inibem ou alteram sua transcrição	
		Complexos de platina	Inibem a replicação do DNA ligando-se a ele	
		Agentes intercalantes	Rompem a fita simples de DNA	
	Citotóxicos que interagem indiretamente com o DNA	Antimetabólitos	Análogos estruturais da purina, pirimidina ou ácido fólico, atuam bloqueando a atividade das enzimas e interrompendo a síntese de DNA	
		Antibióticos citotóxicos	Intercalam entre pares de bases de DNA e assim perturbam a síntese e/ou função de ácidos nucléicos.	
		Inibidores do fuso mitótico	Interrompem a segregação dos cromossomos inibindo a formação de fusos mitóticos.	
		Inibidores da Topoisomerase	Induzem ou estabilizam danos no DNA, bloqueando a religação de quebras de DNA de cadeia dupla.	
	Citostáticos	Inibidores da proteína quinase	Interagem com proteínas quinases, envolvidas na regulação de muitos processos biológicos (crescimento, migração, sobrevivência celular). A maioria dos compostos utilizados são inibidores da tirosina quinase.	
		Anticorpos monoclonais	Bloqueiam receptores extracelulares de células tumorais.	
	Terapias Endócrinas (ATC L02)	Hormônios e agentes relacionados	Análogos de GnRH e LhRH	Interferem na liberação de gonadotrofinas.
		Antagonistas hormonais e agentes relacionados	Antiestrogênios	Antagonismo direto do receptor de estrogênio.
			Antiandrogênios	Inibem a ligação da testosterona ao receptor
Antiaromatase			Inibe a biossíntese de estrogênio	

Fonte: (WHO, 2011; BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012)

Para este estudo, foram selecionadas quatro drogas anticâncer, sendo 3 pertencentes ao grupo dos antibióticos citotóxicos (doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina) e um ao grupo dos outros agentes antineoplásicos (irinotecano).

As antraciclinas têm sido usadas há mais de 30 anos e podem ser consideradas entre os agentes anticancerígenos mais úteis já desenvolvidos: a maioria dos pacientes tratados com quimioterapia sistêmica recebe uma antraciclina em algum momento durante o tratamento (ZAGOTTO et al., 2001). As principais são a epirrubicina, doxorrubicina e daunorrubicina. Compartilham uma estrutura planar rígida de quatro anéis, complementada por uma substituição glicosídica no anel D e grupos laterais variáveis nos anéis A e D (CHABNER, 2014). São substâncias polares e bases fracas (BADEA et al., 2005).

Figura 2.1 – Estrutura química das antraciclinas estudadas e de seus principais metabólitos.



Fonte: (MAUDENS et al., 2009)

A daunorrubicina foi a primeira antraciclina a ser isolada (1963). Verificou-se ser ativa contra uma variedade de linhagens de células tumorais. A doxorrubicina e a epirubicina foram descobertas em 1968 e 1975, respectivamente. Idarubicina, um análogo sintético da daunorrubicina, foi isolada em 1976, mas raramente é utilizada em quimioterapia (YANG, 2007).

A doxorrubicina tem indicações no tratamento de uma ampla variedade de tumores em adultos (mama, ovário, câncer gástrico, ...), bem como no tratamento de pacientes pediátricos e malignidades hematológicas. A epirubicina é utilizada principalmente no tratamento de tumores sólidos, especialmente em adultos (câncer da mama), enquanto que a daunorrubicina é utilizada principalmente para o tratamento de leucemia (adulto e pediátrico) (MAUDENS; STOVE; LAMBERT, 2011).

Da dose administrada, parte das antraciclinas é excretada na sua forma inalterada (não metabolizada), enquanto que outra parte é metabolizada e seus metabólitos são eliminados. A excreção urinária de metabólitos das antraciclinas corresponde a 0,7-4,3% de doxorrubicinol, 0,35-1,76% de epirubicinol 0,4% de glicoronídeos de epirubicinol e 3,3% de glicoronídeos de epirubicina. Uma vez que o principal metabólito, doxorrubicinol, possui até 10 vezes maior potencial terapêutico do que a doxorrubicina, ele é suspeito de causar cardiotoxicidade (MAHNIK et al., 2006).

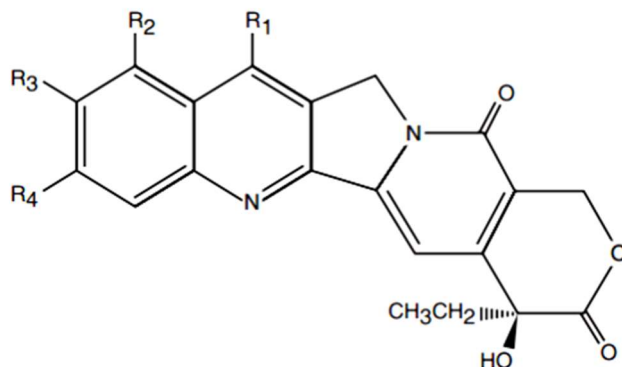
A agência internacional para pesquisa sobre o câncer (IARC - do idioma inglês, *International Agency for Research on Cancer*) classifica a doxorrubicina e a daunorrubicina como categoria 2 (A e B), em que 2A significa, provavelmente, cancerígeno e 2B significa, possivelmente, cancerígeno para humanos (IARC, 1990).

O irinotecano, outro composto alvo deste estudo, é um derivado semi-sintético pentacíclico do alcaloide de ocorrência natural, a camptotecina, que foi isolado a partir da casca de uma árvore chamada *Camptotheca acuminata* em 1966 (GOLDWIRT et al., 2012; BASU et al., 2016). As camptotecinas têm uma estrutura com base em cinco anéis, em que um componente quinolona está ligado a um anel de  $\alpha$ -hidróxi- $\delta$ -lactona terminal (Figura 2.2).

Desde a sua introdução, irinotecano tornou-se um fármaco importante no tratamento do câncer colorretal metastático não operável. Em parte, como resultado do desenvolvimento deste agente, a expectativa de vida dos pacientes que sofrem de câncer colorretal incurável duplicou na última década. As respostas ao irinotecano

também são observados em vários outros tipos de cancer, incluindo malignidades do pulmão e gástrico (DE JONG et al., 2006)

Figura 2.2 – Estrutura química das camptotecinas.



Composto	Peso molecular	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Camptotecina	348,36	-H	-H	-H	-H
Topotecano	421,46	-H	-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-H
Irinotecano	586,69	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H		-H
SN-38	392,42	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H

Fonte: (CHABNER, 2014)

A eliminação do irinotecano, ocorre principalmente pelo fígado, por meio de dois mecanismos clinicamente relevantes. No primeiro caso, o irinotecano é um substrato do sistema citocromo p450. No segundo, através da ação das esterases ubíquas, é convertido no seu metabólito ativo SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), possui 100-1000 vezes maior potencial terapêutico que o irinotecano (DE JONG et al., 2006; CHEN et al., 2012; PARK et al., 2014).



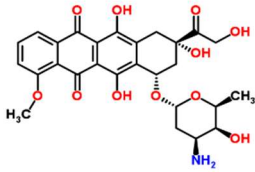
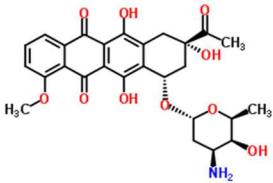
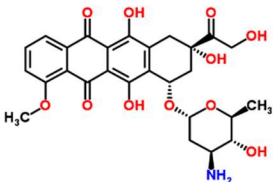
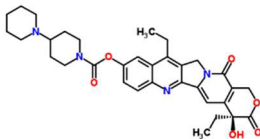
## 2.2 PROPRIEDADES DE INTERESSE AMBIENTAL

Os compostos citotóxicos são tipicamente compostos orgânicos polares que possuem uma ampla gama de diferentes propriedades físico-químicas. Em relação aos parâmetros que afetam o destino e a distribuição desses compostos no ambiente, estes incluem propriedades como solubilidade em água, coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ), pressão de vapor, entre outras que podem ser empregadas para prever aspectos relacionados ao transporte, persistência e destino de substâncias químicas no ambiente. Informações desse tipo sobre drogas farmacêuticas ainda são escassas, principalmente no que tange às propriedades relevantes à compreensão dos riscos associados à exposição ambiental de humanos e outros seres vivos a tais substâncias (KOSJEK; HEATH, 2011). Algumas dessas propriedades podem ser observadas na Tabela 2.2 e são exploradas na sequência do texto.

Em estudos ambientais, a distribuição de uma substância em equilíbrio entre a água e o octanol relaciona-se com o grau de hidrofobicidade da substância. Valores elevados de  $\log K_{ow}$  indicam tendência do composto em acumular-se em meios hidrofóbicos, como solos, sedimentos, material particulado e biota. Por essa razão, esse parâmetro é, frequentemente, utilizado para estimar o fator de bioconcentração (FBC) de substâncias químicas, prevendo o acúmulo de uma dada substância no tecido adiposo de peixes, quando o mecanismo de difusão é a única via de exposição.

O octanol é tomado como solvente de referência, uma vez que é apolar e imita carbono orgânico em solos e sedimentos ou em tecidos lipídicos. Doxorrubicina, daunorrubicina e epirubicina, apresentam valores de  $\log K_{ow}$  inferiores a 1,85 o que indicam sua alta hidrofiliabilidade. No entanto, irinotecano apresenta valor de 4,37 indicando potencial de bioacumulação (KÜMMERER; STEGER-HARTMANN; MEYER, 1997). Ressalta-se que substâncias com  $\log K_{ow}$  acima de 4,5 devem ser avaliadas quanto a sua persistência, bioacumulação e toxicidade (TGD, 2003).

Tabela 2.2 – Propriedades físico-químicas de compostos em estudo ordenados por classificação Anatômico Terapêutica e Química (ATC).

Composto e Código ATC	Fórmula e Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Estrutura Molecular	pK <sub>a</sub>	Log K <sub>OW</sub>	Log K <sub>OC</sub>	Pressão de Vapor (mmHg, 25 °C)	Constante da Lei de Henry (atm x m <sup>3</sup> /mol)	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )	Excreção (%)
Doxorrubicina L01DB01	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>11</sub> 543,5		pK <sub>a1</sub> = 7.34 (fenol); pK <sub>a2</sub> = 8.46 (amina); pK <sub>a3</sub> = 9.46 (estimado)	1,27	1	8,99 x 10 <sup>-25</sup>	2,23 x 10 <sup>-23</sup>	92,7	3-10 (urina) 40-50 (fezes)
Daunorrubicina L01DB02	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub> 527,5		pK <sub>a</sub> = 7.85 (amina); pK <sub>a2</sub> = 8.46 (amina); pK <sub>a</sub> = 9,68	1,83	n.d.	3,46 x 10 <sup>-22</sup>	1,43 x 10 <sup>-25</sup>	39,2	14-25 (urina) 40 (fezes)
Epirubicina L01DB03	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>11</sub> 543,5		pK <sub>a1</sub> = 9.17 (fenol); pK <sub>a2</sub> = 9.93 (amina); pK <sub>a3</sub> = 12.67 (Hidroxil)	1,85	1	2,50 x 10 <sup>-23</sup>	2,20 x 10 <sup>-23</sup>	93	9-10 (urina) 40 (fezes)
Irinotecano L01XX19	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 586,6		pK <sub>a1</sub> = 9,47 pK <sub>a2</sub> = 11,71	4,37	2	n.d.	n.d.	107	11-20 (urina) 63,7 (fezes)

n.d.: não disponível

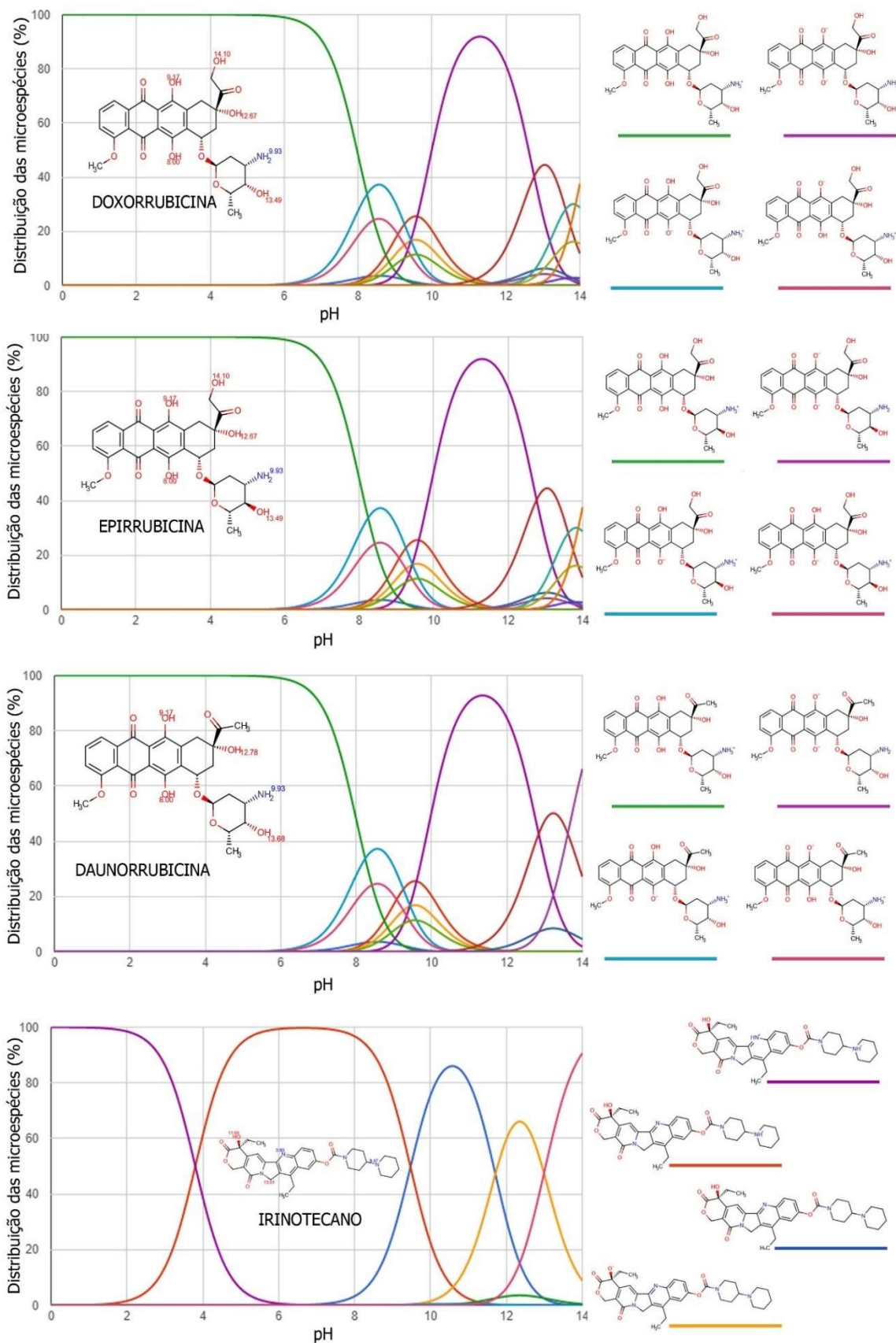
Fonte: (KOSJEK; HEATH, 2011; FRÉDÉRIC; YVES, 2014; GÓMEZ-CANELA et al., 2014; RABII et al., 2014) adaptado

O coeficiente de adsorção normalizado para o carbono orgânico ( $K_{oc}$ ), também conhecido como coeficiente de partição solo/água ou coeficiente de adsorção, é uma medida da tendência de um composto orgânico para ser adsorvido por solos ou sedimentos. Os coeficientes  $K_{oc}$  e  $K_{ow}$  são semelhantes, uma vez que o  $K_{oc}$  expressa a razão entre a concentração do contaminante adsorvido no carbono orgânico no solo e a concentração do composto em solução na fase aquosa. Compostos com altos valores desse coeficiente são menos móveis no solo e se acumulam. Como esperado pelos baixos valores de  $\log K_{ow}$  dos compostos citotóxicos, estes também têm valores relativamente baixos de  $K_{oc}$  devido à sua forte hidrofiliçidade (Tabela 2.2).

A constante de dissociação ácida ( $pK_a$ ) expressa o estado de ionização dos compostos, uma vez que eles tendem a estar desprotonados se  $pH > pK_a$  ou protonados de outro modo. O estado de protonação regula as interações eletrostáticas com a matéria orgânica carregada tipicamente negativa e outros sólidos na matriz aquosa, promovendo ou impedindo a adsorção. Em particular, se  $pH > pK_a$  o composto tende a dissociar-se e é mais móvel na fase aquosa. Os 4 compostos selecionados neste estudo são bases fracas, com  $pK_a > 7$ , ou seja, protonadas em pH nos quais geralmente se encontram as amostras ambientais aquosas ( $pH \sim 7$ ) e moderadamente hidrofílicos. A distribuição das espécies em função do pH, assim como o  $pK_a$ , são mostradas na Figura 2.3.

A volatilidade de uma substância também é importante na compreensão do seu comportamento no ambiente. No entanto, a volatilização de substâncias químicas da superfície da água para a atmosfera é mais bem avaliada a partir das constantes da Lei de Henry ( $K_H$ ) (BUERGE et al., 2006). O  $K_H$  é um coeficiente de partição que descreve a distribuição do composto entre o ar e a água (compostos neutros). Com relação aos compostos alvo deste estudo, os valores de  $K_H$  (Figura 2.3) são considerados baixos enquanto apresentam altos valores de solubilidade. Consequentemente, a remoção por volatilização ou precipitação são insignificantes.

Figura 2.3 – Distribuição das espécies de doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina e irinotecano em função do pH.



FONTE: Calculator Plugin foi usado para a predição e cálculo da distribuição das microespécies em função do pH (CHEMICALIZE, 2018).

## 2.3 HOSPITAIS COMO FONTES DE ENTRADA DE RESÍDUOS DE DROGAS ANTICÂNCER NO MEIO AMBIENTE

Nos últimos anos, os efluentes hospitalares têm sido objeto de pesquisas em vários países (MAYER, 2013). São constituídos por uma variedade de substâncias químicas de caráter persistente e representados por misturas complexas de matéria orgânica, detergentes, surfactantes, antibióticos, anti-sépticos, solventes, medicamentos e substâncias radioativas (KÜMMERER, 2001b; GAUTAM; KUMAR; SABUMON, 2007; VERLICCHI et al., 2010; STIEBER; PUTSCHEW; JEKEL, 2011; KOVALOVA et al., 2013). Geralmente, essas águas não são tratadas na fonte, mas são descarregadas diretamente no sistema de esgoto doméstico, chegando, finalmente, a uma estação de tratamento de efluentes (VERLICCHI et al., 2012a; ZHANG et al., 2013; ISIDORI et al., 2016).

Entre os principais setores envolvidos na geração de efluentes em hospitais, destacam-se os serviços de análises clínicas, setores de rádio e quimioterapia, lavanderias, unidades de tratamento intensivo e leitos de diversas classes de acomodação. As inúmeras atividades realizadas levam ao consumo de grandes quantidades de compostos farmacêuticos em um único ponto (FRÉDÉRIC; YVES, 2014).

Os efluentes gerados pelos serviços hospitalares correspondem a uma fração considerável dentre os diversos tipos de águas residuárias causadoras de impacto ambiental (KÜMMERER et al., 1998; BOILLOT et al., 2008; VERLICCHI et al., 2010), sendo uma importante fonte de drogas anticâncer. Além disso, os efluentes urbanos também recebem uma contribuição substancial de drogas anticâncer excretadas como resultado do tratamento ambulatorial (FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2013). Pacientes ambulatoriais consomem somente até 20% da medicação no hospital e conseqüentemente somente esta porcentagem é eliminada em nos efluentes hospitalares, enquanto o restante (pelo menos 80%) é administrado pelo paciente em casa, e, portanto, são descarregados no sistema de esgoto doméstico (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012).

A partir dos dados físico-químicos (Tabela 2.2, e conforme descrito no item 2.2), os compostos anticânceres apresentam propriedades de persistência no meio ambiente com alta mobilidade aquosa. Relatos sobre a ocorrência de compostos

anticâncer no ambiente são recentes e as concentrações reportadas em águas residuais e amostras naturais é muito baixa, em comparação com outros produtos farmacêuticos de uso comum (FRÉDÉRIC; YVES, 2014; OLALLA et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Nos últimos anos, os efluentes hospitalares têm sido objeto de pesquisas em vários países (MAYER, 2013). As drogas anticâncer são toxicologicamente relevantes, em termos gerais, consideradas como compostos muito perigosos, uma vez que são projetados para matar ou provocar danos severos nas células. Esses processos podem causar transtornos agudos como efeitos colaterais e alterações nas funções normais dos organismos expostos a eles (sistema endócrino, sistema imunológico, etc) (ZOUNKOVÁ et al., 2007). Essas substâncias podem provocar modificações no meio ambiente, mesmo quando presentes em concentrações mínimas (KÜMMERER, 2001b).

Além da composição, outra relevância dessa problemática está diretamente relacionada ao consumo de água, que pode chegar a valores que variam de 400 para 1200 L dia<sup>-1</sup> leito<sup>-1</sup> (EMMANUEL et al., 2005; GAUTAM; KUMAR; SABUMON, 2007), gerando, como consequência, um volume considerável de efluentes. A quantidade de efluente hospitalar produzido em um único hospital depende de diferentes fatores: número de leitos, tempo de construção da estrutura, acessibilidade à água, serviços gerais presentes no interior da estrutura (cozinha, lavanderia e ar condicionado), número e tipo de unidade sanitária, políticas de gestão da instituição e conscientização na gestão da estrutura e na proteção do ambiente, clima e fatores culturais e geográficos (VERLICCHI et al., 2010).

Em muitos casos, efluentes hospitalares são equiparados ao efluente urbano, sendo que, em muitos países, são lançados no esgoto municipal e recolhidos a uma estação de tratamento de águas residuais, onde são co-tratados com efluentes urbanos (KÜMMERER; STEGER-HARTMANN; MEYER, 1997; EMMANUEL et al., 2005; EKHAISE; OMAVWOYA, 2008; VERLICCHI et al., 2010; ÁNGEL; ZAVALA; REYNOSO-CUEVAS, 2015). A descarga direta destes efluentes em sistemas de esgotos urbanos sem tratamento preliminar pode constituir um risco potencial para o ambiente, uma vez que as estações de tratamento de esgotos convencionais não foram essencialmente concebidas para esse fim específico (SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009).

Os efluentes hospitalares apresentam pouca diferença em relação aos efluentes domésticos, em se tratando de concentração de matéria orgânica, ou seja, DQO ou DBO, metais ou pH e ambos são, geralmente, enviados para a mesma estação de tratamentos. Contudo, a presença de substâncias como drogas, desinfetantes e químicos se dá em elevadas concentrações nas águas residuárias hospitalares (KÜMMERER, 2009). Verlicchi et al. (2012b) revisaram a variabilidade quantitativa de alguns parâmetros físicos, químicos e microbiológicos em efluentes hospitalares e esgotos urbanos, Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos em efluentes hospitalares e esgotos urbanos.

Parâmetro	Efluente Hospitalar		Esgoto Urbano
	Intervalo	Média	
pH	6,3 – 9,2	8	7,5 – 8,5
Condutividade, $\mu\text{S cm}^{-1}$	297 – 1000	850	420 – 1340
Sólidos Suspensos (SS), $\text{mg L}^{-1}$	120 – 400	160	120 – 350
Sólidos Totais Voláteis / SS	0,45 – 0,75	0,58	0,65 – 0,80
DQO, $\text{mg L}^{-1}$	450 – 2300	650	500 – 600
DBO <sub>5</sub> , $\text{mg L}^{-1}$	150 – 603	200	100 – 400
NTK, $\text{mg L}^{-1}$	30 – 100	45	20 – 70
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , $\text{mg L}^{-1}$	10 – 68	30	12 – 45
P total, $\text{mg L}^{-1}$	0,2 – 8	5	4 – 10
Cloretos, $\text{mg L}^{-1}$	80 – 400	220	30 – 100
Óleos e Graxas, $\text{mg L}^{-1}$	13 – 60	25	50 – 150
Detergente Total*, $\text{mg L}^{-1}$	3 – 7,2	4,5	4 – 8
Desinfetantes, $\text{mg L}^{-1}$	2 – 200	-	-
DQO/DBO <sub>5</sub>	1,4 – 6,6	2,5	1,7 – 2,4
Coliformes Totais	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup> – 10 <sup>8</sup>
Coliformes Fecais	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>
Escherichia Coli, NMP. $\text{mg L}^{-1}$	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>
Streptococcus, NMP. $\text{mg L}^{-1}$	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup>

\*Iônicos e não-iônicos

Fonte: (VERLICCHI et al., 2012b)

No Brasil, segundo as legislações do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (CONAMA, 2005, 2011), os efluentes hospitalares devem ser submetidos a algum tratamento específico ou, então, expurgados na rede coletora de esgotos,

onde, certamente, serão submetidos aos sistemas convencionais de tratamento de efluentes, descritos como ineficientes para estes contaminantes (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; HIRSCH et al., 1999).

## 2.4 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Desde sua fundação em 1970, o HUSM é referência em saúde para a região central do Rio Grande do Sul. É um órgão integrante da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, a Instituição atua como hospital-escola, com sua atenção voltada para o desenvolvimento do ensino, da pesquisa e da assistência em saúde, tendo por objetivo a prestação de assistência à saúde de qualidade à população do município e da região de Santa Maria, com abrangência de 42 municípios que totalizam uma população de 1,2 milhões de habitantes. Atualmente, o HUSM apresenta uma estrutura 403 leitos hospitalares (HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, 2018). Diariamente, circulam pelo hospital cerca de 6 mil pessoas entre pacientes, acompanhantes, alunos, funcionários, residentes e docentes.

O Hospital Universitário da UFSM é referência no atendimento de hematologia/oncologia no Rio Grande do Sul, dispondo de atendimento ambulatorial, unidades de internação adulta e pediátrica, Centro de Transplante de Medula Óssea e Setor de radioterapia. Na Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) são atendidos 24.852 pacientes por mês (EBSERH, 2013).

Fazendo parte desta rede de assistência, encontra-se a Central de Quimioterapia Antineoplásica do Serviço de Farmácia, onde são manipulados os medicamentos antineoplásicos, fundamentais no tratamento hemato-oncológico (HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, 2018).

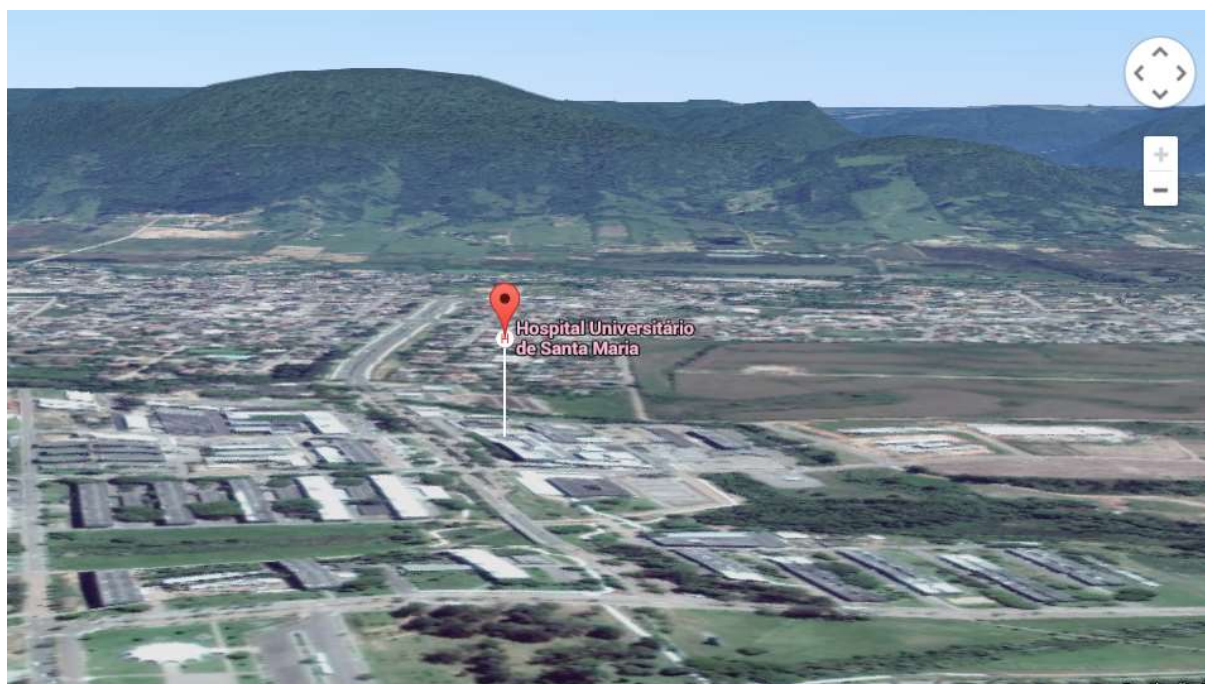
Atualmente, na Central de Quimioterapia Antineoplásica são atendidos, mensalmente, em torno de 430 pacientes e são manipuladas mais de 1700 terapias antineoplásicas. Esse número vem aumentando gradativamente bem como o número de pacientes atendidos. No ano de 2011, por exemplo, foram produzidos 18421 medicamentos, seguidos de 19057 manipulações em 2012, e 21347 em 2013. A quantidade de pacientes atendidos nos anos de 2011, 2012 e 2013 foi, respectivamente, 4565, 4944 e 5680 (GOULART et al., 2014).



O HUSM está localizado na Cidade de Santa Maria, situada no Centro Geográfico do Rio Grande do Sul (latitude de 29° 43' 02" S e longitude de 53° 43' 4,2" O). A região localiza-se na porção intermediária de uma bacia hidrográfica que constitui uma das nascentes do Rio Vacacaí-Mirim. No total, são dez quilômetros quadrados que compõem a área da bacia, sendo que 65% dela são ocupados pelo *campus* universitário (Figura 2.1 e Figura 2.5).

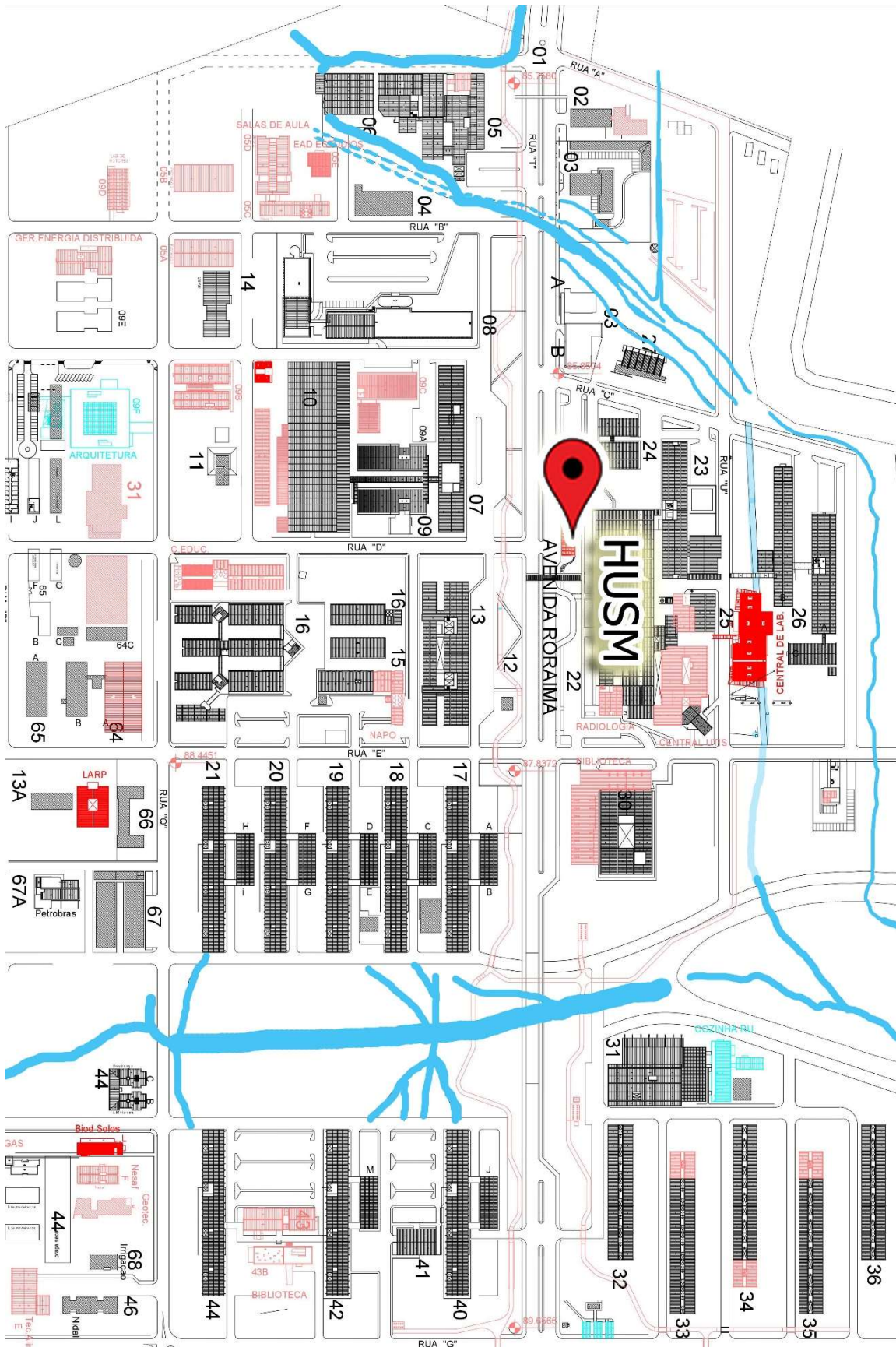
As águas da bacia hidrográfica fazem parte do ambiente natural da Universidade e – tal como qualquer outro elemento da natureza – causam impacto no espaço em que estão inseridas e também são impactadas por esse ambiente (SILVA et al., 2002; UFSM, 2011). Exemplo disso são os efluentes gerados pelo HUSM, os quais são escoados em córregos da UFSM pertencentes a essa bacia, passando, anteriormente, por um sistema de tratamento dotado de um tanque séptico e de um filtro anaeróbio (Figura 2.6). Após passagem pelo sistema de tratamento, o efluente do HUSM é lançado em um dos córregos que atravessam a universidade.

Figura 2.4 – Imagem de satélite da região de localização do Hospital Universitário de Santa Maria.



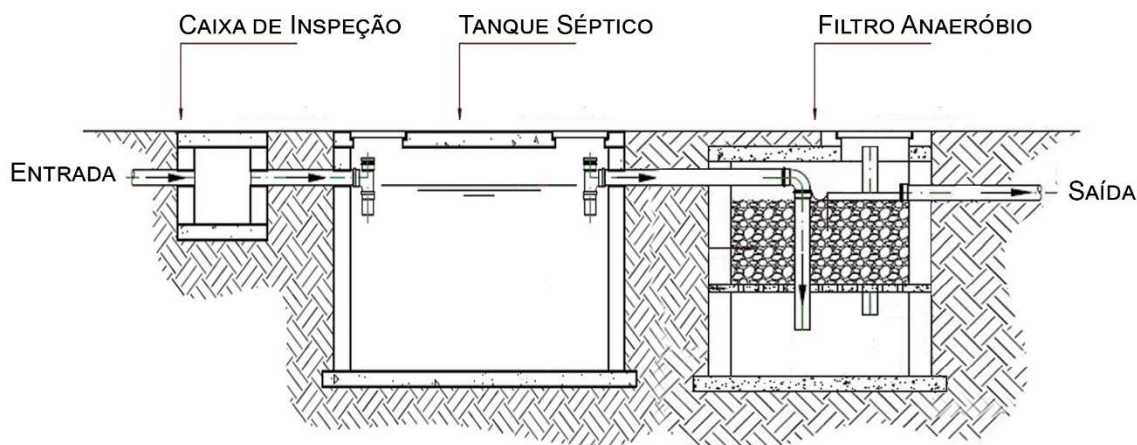
Fonte: Google Earth (<https://www.google.com/intl/pt-BR/earth/>)

Figura 2.5 – Localização do Hospital Universitário de Santa Maria.



Fonte: (UFSM, 2011) adaptado.

Figura 2.6 – Representação esquemática do sistema de tratamento de efluente adotado pelo HUSM.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os hospitais são grandes consumidores de água e geradores de efluentes. No ano de 2015, a média de consumo de água no HUSM foi de  $1,18 \text{ m}^3 \text{ leito}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . O lançamento de esgoto possui um fluxo médio de aproximadamente  $475 \text{ m}^3 \text{ dia}^{-1}$ .

O efluente gerado pelo HUSM tem sido investigado pelo Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER) quanto aos contaminantes que não são degradados pelo sistema de tratamento adotado e que, conseqüentemente, são liberados no corpo hídrico. Diversas pesquisas já foram desenvolvidas quanto à ocorrência e degradação de contaminantes emergentes, dos quais citam-se: amoxicilina (FRANK, 2008), ciprofloxacina (MARTINS et al., 2008), cefalosporinas e surfactantes não-iônicos (HENRIQUES, 2009), antimicrobianos (BRENNER et al., 2011), diclofenaco (MINETTO et al., 2012), dexametasona (ARSAND; KÜMMERER; MARTINS, 2013), benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (DA SILVA et al., 2013), parabenos (MAYER, 2013), antiandrogêneos (BRENNER, 2013), antibióticos macrolídeos (MINETTO, 2013), ansiolíticos e antiepiléticos (ALMEIDA et al., 2013), beta-bloqueadores (WILDE; MONTIPÓ; MARTINS, 2014), estatinas (ALTISSIMO, 2015; MARTINS et al., 2017b), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SILVA, 2016) e drogas ilícitas como cocaína (MARTINS et al., 2017a). Além desses, foram desenvolvidos trabalhos englobando a determinação de

psicodrogas (REICHERT et al., 2017), e, por fim, os medicamentos anticâncer, que são os analitos alvo deste estudo.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DE DROGAS ANTICÂNCER NO MEIO AMBIENTE

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) tem sido uma das principais técnicas de extração de espécies químicas presentes nos mais diversos tipos de amostras líquidas, incluindo a análise de drogas anticâncer em amostras aquosas (MAHUGO-SANTANA et al., 2011). A alta capacidade de concentrar os solutos nos extratos, a facilidade de automação e a redução do consumo de solventes orgânicos são algumas das vantagens conhecidas da SPE frente a outras técnicas de extração (NOVAIS et al., 2014; SANTANA-VIERA et al., 2016). Com relação a outras técnicas de extração, principalmente técnicas miniaturizadas, foi efetuada ampla revisão de literatura, sendo que nenhum reporte empregando técnicas de micro-extração foi encontrado.

O emprego da SPE em fase reversa (C18) tem sido amplamente utilizada para extração de compostos polares não dissociados em amostras aquosas, como é o caso da maioria dos compostos anticâncer (STEGER-HARTMANN; KÜMMERER; SCHECKER, 1996). O cartucho Oasis HLB (fabricado pela Waters) e o Strata X (fabricado pela Phenomenex), ambos com a mesma composição polimérica, têm sido amplamente utilizados para a extração de drogas farmacêuticas em amostras aquosas, visto que o mesmo tem mecanismo de equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico, o qual tem sido satisfatório para extração destes compostos (YU; BOUWER; COELHAN, 2006; GARCIA-AC et al., 2011; LLEWELLYN et al., 2011; MARTÍN et al., 2011; GÓMEZ-CANELA et al., 2014)

Diferentes técnicas têm sido aplicadas para determinação de anticânceres, tais como espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HANN et al., 2005) e eletroforese capilar (MAHNIK et al., 2004). No entanto, a maior parte das aplicações em amostras ambientais, têm empregado as técnicas cromatográficas, sendo estas, as mais importantes utilizadas para a análise destes compostos (BUCHBERGER, 2007).

As drogas antineoplásicas, em geral, são compostos com características moderadamente polar a compostos polares, geralmente têm um alto peso molecular. Tais características limitam o emprego da cromatografia gasosa, uma vez que se faz necessário aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica dos analitos, incluindo uma etapa de derivação. Já a cromatografia líquida é uma técnica consolidada e amplamente utilizada na separação destes fármacos, sendo o principal método para esta finalidade, selecionada em mais de 75% das aplicações (SANTANA-VIERA et al., 2016).

Estudos sobre a ocorrência de compostos anticâncer em águas residuais foram realizados pela primeira vez na década de 1990. No primeiro desses relatos, ifosfamida e ciclofosfamida foram determinados nas concentrações de 24 ng L<sup>-1</sup> e 146 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente, empregando cromatografia gasosa (STEGER-HARTMANN; KÜMMERER; SCHECKER, 1996).

Kümmerer et al. (KÜMMERER; STEGER-HARTMANN; MEYER, 1997) empregando a mesma metodologia analítica do trabalho supracitado, determinaram ifosfamida em concentrações de 109 ng L<sup>-1</sup> em efluentes hospitalares e concentrações entre 6,2 ng L<sup>-1</sup> e 9,3 ng L<sup>-1</sup> nas águas residuárias. Posteriormente, Ternes (TERNES, 1998) e Ternes et al. (TERNES et al., 1998) também estudaram a ocorrência de ciclofosfamida e ifosfamida em efluentes líquidos, água de rio e água potável.

Com relação aos quatro compostos anticâncer investigados neste estudo, efetuou-se uma revisão de literatura e os reportes sobre estes analitos estão sumarizados na Tabela 2.4. De forma geral, é possível notar uma preocupação recente e crescente com relação a estes compostos em matrizes ambientais.

A primeira publicação a que se tem conhecimento com relação a ocorrência das drogas anticâncer alvo deste estudo, foi publicada em Viena, na Austria, pelo grupo de pesquisa Mahnik (MAHNIK et al., 2006, 2007; LENZ et al., 2007). Os autores investigaram a ocorrência de antraciclinas, em efluente hospitalar, e para isso desenvolveram método cromatográfico com detecção por fluorescência. As concentrações determinadas foram de 0,1 µg L<sup>-1</sup> a 1,4 µg L<sup>-1</sup> para epirrubicina e na faixa de concentração de 0,1 µg L<sup>-1</sup> a 0,5 µg L<sup>-1</sup> para doxorubicina.

Tabela 2.4 – Estudos reportados na literatura com relação a ocorrência de doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina e irinotecano em amostras ambientais

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Concentração (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Referência</b>
<b>Doxorrubicina</b>	Efluente hospitalar	100 – 500	Extração: SPE (C8) HPLC - FLD	(MAHNIK et al., 2006)
	Efluente hospitalar	260 – 1350	Extração: SPE (C8) HPLC - FLD	(LENZ et al., 2007; MAHNIK et al., 2007)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 10	Extração: SPE (Oasis) UPLC – MS/MS	(YIN et al., 2010a)
	Influente e efluente, água de rio	<4,3 – 4,5	Extração: SPE (Oasis) HPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2011)
	Águas subterrâneas e de superfície, influente e efluente	n.d. - LOD: 3,0	Extração: SPE <i>on line</i> (cartucho polimérico) LC – MS/MS	(NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013)
	Influente e efluente	<4,2– 42,4	Extração: SPE (Oasis) HPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2014)
	Efluente urbano e hospitalar	2,5 – 2,7	Extração: SPE <i>on line</i> (cartucho polimérico) LC – MS/MS	(NEGREIRA; DE ALDA; BARCELÓ, 2014)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 54	Extração: SPE (Oasis) LC– Orbitrap-MS	(GÓMEZ-CANELA et al., 2014)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 2,4	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(FERRE-ARACIL et al., 2016)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 0,7	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(ISIDORI et al., 2016)
Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 0,1	Extração: SPE <i>on line</i> HPLC – MS/MS	(OLALLA et al., 2018)	
<b>Daunorrubicina</b>	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 60	Extração: SPE (C8) HPLC - FLD	(MAHNIK et al., 2006, 2007; LENZ et al., 2007)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 61	Extração: SPE (Oasis) LC– Orbitrap-MS	(GÓMEZ-CANELA et al., 2014)

<b>Irinotecano</b>	Influente e efluente, água de rio	n.d. - LOD: 0,9	Extração: SPE (Oasis) UPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2011)
	Efluente hospitalar	<4 – 730	Extração: SPE (Oasis) LC– Orbitrap-MS	(GÓMEZ-CANELA et al., 2014)
	Águas subterrâneas e de superfície, influente e efluente	n.d. - LOD 0,1	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013)
	Efluente e Influyente	n.d. - LOD 0,1	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(RABII et al., 2014)
	Influente e efluente	n.d. - LOD: 1,04	Extração: SPE <i>on line</i> HPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2014)
	Efluente hospitalar	9,2 – 49	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(ISIDORI et al., 2016)
	Efluente hospitalar	25 – 273	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(FERRE-ARACIL et al., 2016)
	Efluente hospitalar	25 – 273	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(OLALLA et al., 2018)
<b>Epirrubicina</b>	Efluente hospitalar	100 – 1400	Extração: SPE (C8) HPLC - FLD	(MAHNIK et al., 2006)
	Efluente hospitalar	n.d. - LOD: 260	Extração: SPE (C8) HPLC - FLD	(LENZ et al., 2007; MAHNIK et al., 2007)
	Influente e efluente, água de rio	n.d. - LOD 4,2	Extração: SPE (Oasis) UPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2011)
	Efluentes	<2,77 – 24800	Extração SPE e Injeção dir eta LC– Orbitrap-MS	(GÓMEZ-CANELA et al., 2012)
	Efluente urbano e hospitalar	8,8 – 21,3	Extração: SPE <i>on line</i> (cartucho polimérico) LC – MS/MS	(NEGREIRA; DE ALDA; BARCELÓ, 2014)
	Efluente hospitalar	<45 – 60	Extração: SPE (Oasis) LC– Orbitrap-MS	(GÓMEZ-CANELA et al., 2014)
	Efluente e Influyente	n.d. - LOD 18	Extração: SPE <i>on line</i> LC – MS/MS	(RABII et al., 2014)
	Influente e efluente	n.d. – LOD 0,70	Extração: SPE (Oasis) HPLC – MS/MS	(MARTÍN et al., 2014)

n.d. não detectado; LOD: limite de detecção do método empregado (em ng L<sup>-1</sup>)

Negreira et al. (NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013; NEGREIRA; DE ALDA; BARCELÓ, 2014; NEGREIRA et al., 2015) publicaram vários trabalhos sobre a determinação de drogas anticâncer e seus metabólitos usando como procedimento de extração SPE *on line* e posterior determinação por LC-MS/MS. No primeiro trabalho reportado, foram determinados 13 compostos, incluindo doxorubicina e irinotecano, além da presença de quatro metabólitos. Foram analisadas amostras de águas superficiais, subterrâneas e residuais, sendo as concentrações determinadas entre 2,1 ng L<sup>-1</sup> e 29,7 ng L<sup>-1</sup>. No ano seguinte, utilizando a mesma metodologia, os autores avaliaram amostras de efluente urbano e hospitalar, e as concentrações reportadas para as concentrações de drogas anticâncer variaram entre 2 ng L<sup>-1</sup> e 180 ng L<sup>-1</sup>.

Em 2014, ciclofosfamida, gencitabina, metotrexato, irinotecano e epirrubicina foram determinados em águas residuais por Rabii et al. (RABII et al., 2014) utilizando cromatografia líquida e extração por SPE. Gomez-Canela et al. (GÓMEZ-CANELA et al., 2012) identificaram e quantificaram ciclofosfamida e epirrubicina, usando LC-Orbitrap-MS, revelando sua presença em efluentes hospitalares e urbanos em níveis de concentração variando de 5,73 µg L<sup>-1</sup> a 24,8 µg L<sup>-1</sup>. Esses níveis de concentração são maiores que aqueles obtidos por outros autores em águas residuárias. Os mesmos autores (GÓMEZ-CANELA et al., 2014) no ano de 2014, estudaram a ocorrência de 26 compostos anticâncer em efluentes de hospitais e efluentes urbanos e determinação concentrações de até 86 µg L<sup>-1</sup>.

Martin et al. (MARTÍN et al., 2014) investigaram 14 drogas citostáticas, dentre elas irinotecano, epirrubicina e doxorubicina, em águas residuais e fluviais usando LC-MS/MS e mediram concentrações na faixa de 1,2 a 15 ng L<sup>-1</sup>. Mais recentemente, Olalla *et al.* (OLALLA et al., 2018), avaliaram a ocorrência de 17 drogas anticâncer em efluente hospitalar e os resultados indicaram a presença de 7 dos compostos investigados, em concentrações de 25 ng L<sup>-1</sup> e 4761 ng L<sup>-1</sup>. As concentrações mais elevadas corresponderam a ifosfamida (58 ng L<sup>-1</sup> a 4761 ng L<sup>-1</sup>), metotrexato (394 ng L<sup>-1</sup> a 4756 ng L<sup>-1</sup>) e ciclofosfamida (46-3000 ng L<sup>-1</sup>). Além do mais, a avaliação do risco ambiental mostrou que o composto irinotecano exibiu valores que representam alto quociente de risco indicando potencial particularmente elevado para prejudicar o ambiente, merecendo atenção especial.



**3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO HPLC-FLD E EXTRAÇÃO POR SPE E DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE DROGAS ANTICÂNCER EM EFLUENTE HOSPITALAR**

---



### 3.1 INTRODUÇÃO

Apesar do crescente interesse científico na ocorrência de drogas anticâncer em amostras ambientais (ISIDORI et al., 2016; FRANQUET-GRIELL et al., 2017a; BOTTONI; CAROLI, 2018), destaca-se que há uma quantidade limitada de dados experimentais sobre ocorrência e ecotoxicidade de tais substâncias no meio ambiente. A escassez de informações sobre os níveis ambientais desses compostos é parcialmente explicada pela falta de métodos analíticos adaptados às aplicações ambientais, visto que a maioria dos métodos reportados é designado a formulações farmacêuticas e amostras biológicas (YIN et al., 2010a; NUSSBAUMER et al., 2011).

Parte dos métodos analíticos publicados para amostras ambientais são limitados a um pequeno número de compostos ou ainda a determinações individuais das drogas anticâncer, como por exemplo a ciclofosfamida e ifosfamida, que são os anticânceres mais consumidos (STEGER-HARTMANN; KÜMMERER; SCHECKER, 1996; KÜMMERER; AL-AHMAD, 2010; GÓMEZ-CANELA et al., 2012).

Como consequência, um dos desafios no campo da química analítica é o desenvolvimento de procedimentos rápidos e eficientes para a análise desses compostos emergentes. O desenvolvimento de métodos para compostos farmacêuticos em efluente hospitalar enfrenta três desafios principais: 1) os analitos são muito polares; 2) as concentrações ambientais estimadas são muito baixas; e 3) a matriz é complexa (GARCIA-AC et al., 2009).

Além disso, os medicamentos anticâncer pertencem a diferentes famílias químicas, portanto, desenvolver um método multirresíduo para todos eles, é inviável frente às diferentes propriedades químicas. Adicionalmente, o alto custo dos padrões analíticos de referência dos compostos anticâncer, os riscos específicos à saúde e segurança, as condições de segurança especiais e dispendiosas exigidas para seu manuseio (treinamento de analistas para manipulação de compostos citotóxicos, equipamentos de proteção individual, segurança biológica ao se trabalhar com efluente hospitalar, recipientes específicos para resíduos, etc.) são desafios que se encontram neste tipo de pesquisa (FERRANDO-CLIMENT et al., 2016).

Na maioria das análises químicas, sobretudo nas análises de resíduos, nas quais os analitos se encontram em nível de traço ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), devido às concentrações serem muito baixas, os analitos apresentarem propriedades químicas

distintas e devido à matriz ser complexa, faz-se necessária a realização de uma etapa prévia de preparo de amostra. Os principais objetivos do preparo de amostra são promover a extração e, muitas vezes, a concentração dos analitos e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo cerca de 80% do tempo total de análise, podendo introduzir erros, principalmente devido à perda do analito e à contaminação da amostra (JARDIM, 2010).

A extração em fase sólida tem sido utilizada no preparo de amostras de efluente para as mais distintas classes de fármacos, incluindo os relatos para drogas anticâncer. É a técnica mais popular atualmente disponível para a preparação da amostra rápida e seletiva. A versatilidade da SPE permite o uso dessa técnica para muitas finalidades, tais como a remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos (ŽWIR-FERENC; BIZIUK, 2006).

Embora a SPE ofereça vantagens consideráveis, os métodos convencionais, vêm sendo aprimorados na busca de métodos mais baratos, mais rápidos e que consumam menor quantidade de solvente. Neste contexto, a DLLME pode representar uma alternativa interessante. O princípio básico da técnica, desenvolvida em 2006 por Rezaee *et al.*, é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (REZAEI *et al.*, 2006). Do ponto de vista comercial, econômico e ambiental, as vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração com solvente são simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação, alto fator de enriquecimento e compatibilidade com os métodos analíticos cromatográficos. A DLLME tem sido aplicada na extração de compostos orgânicos como plastificantes, fármacos, agrotóxicos e compostos inorgânicos (CALDAS *et al.*, 2011).

Porém, conforme pesquisa realizada na literatura, não se encontraram registros de publicação para a extração de fármacos anticâncer, sendo este o primeiro trabalho sobre o assunto. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar método analítico empregando SPE e DLLME para a determinação simultânea de quatro drogas anticâncer em efluentes hospitalares, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência (HPLC-FLD). Quatro fármacos empregados no tratamento do câncer foram selecionados para este estudo,

nomeadamente, irinotecano, doxorrubicina, epirubicina e daunorrubicina. Essas drogas anticâncer estão entre as mais utilizadas nos protocolos de quimioterapia do HUSM.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Efluentes e Resíduos (LATER). O desenvolvimento de todos os procedimentos analíticos foi realizado com controle de qualidade interno baseado na norma NBR ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025, 2017), requisito geral para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

### 3.2.1 Instrumentação

- Equipamento Shimadzu Prominence (Kyoto, Japão) constituído por bomba quaternária (LC-20AT), desgaseificador (DGU-20A5), amostrador automático (SIL-20A), detector de fluorescência (RF-10AXL), módulo comunicador (CBM-20A) e Software LC Solution (Sinc do Brasil, São Paulo, Brasil);
- Coluna Alltima C18 - 5 mm; 3,2 x150 mm (Alltech, Deerfield, IL, USA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q®- resistividade 18,2 MΩ cm (MilliPore®, EUA);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Pipetadores semiautomáticos (Eppendorf, Alemanha);
- Sistema a vácuo Manifold SPE (Alltech - Deerfield, IL, USA);
- pHmetro modelo PHS-3B (PHTECK, Paraná, Brasil);
- Filtro de fibra de vidro  $\phi$  47 mm, porosidade 0,45  $\mu$ m Sartorius.

### 3.2.2 Solventes, reagentes e gases

Acetonitrila, metanol, cloreto de sódio e ácido fórmico foram adquiridos com J.T. Baker, (Xalostoc, México), enquanto clorofórmio, 1-decanol, acetona e tetracloreto de carbono foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha); hidróxido de sódio (Mallinkrodt, México), formiato de amônio e clorobenzeno foram obtidos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm), foi obtida por sistema de purificação de água Milli-Q®, Merck Millipore (Billerica, MA, USA). Gás nitrogênio P.A. (Air Products, Brasil) foi utilizado.

Cartuchos SPE Chromabond® C18 EC e C18 (3 mL/500 mg), adquiridos da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha); Strata® X, XC e C18-E, obtidos da Phenomenex (Torrance, USA); e Supelcosil® C8 (6 mL/500 mg), da Supelco (Milford, EUA) foram avaliados.

### 3.2.3 Padrões e soluções analíticas

Os padrões analíticos das drogas anticâncer doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina e irinotecano (European Pharmacopoeia Reference Standard) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha), todos com pureza superior a 98%.

Soluções estoque individuais de cada um dos antineoplásicos foram preparadas em metanol a uma concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. O grau de pureza especificado pelo fabricante foi empregado para a preparação da solução estoque. Após o preparo das soluções estoque individuais, preparou-se uma solução mistura contendo todos os compostos a serem analisados, em metanol, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e armazenadas em frascos âmbar, na ausência de luz, a -20 °C. Uma solução padrão de trabalho foi preparada através de uma diluição apropriada. Como esses compostos são altamente tóxicos, todas as precauções de segurança necessárias foram tomadas ao manipulá-los.

### 3.2.4 Condições cromatográficas

Para a separação analítica, inicialmente, baseou-se em trabalhos anteriores para a separação de compostos antineoplásicos em amostras biológicas. As condições cromatográficas otimizadas foram: escolha da coluna cromatográfica, composição da fase móvel, vazão, modo de eluição, comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) e emissão ( $\lambda_{em}$ ) e temperatura da coluna. A separação analítica objetivou um menor tempo de análise cromatográfica, aliada a melhor seletividade e resolução dos picos cromatográficos dos analitos em estudo.

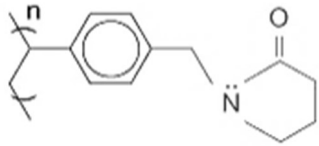
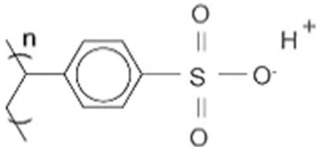
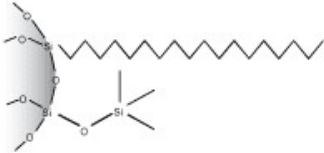
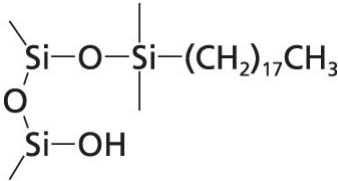
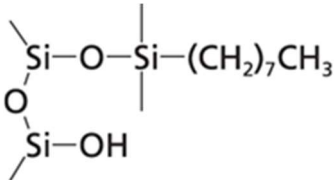
### 3.2.5 Otimização da extração em fase sólida

O procedimento de SPE foi otimizado em termos de cartucho de extração, pH da amostra, tipo e volume de solvente condicionamento e pré-equilíbrio, lavagem e eluição. Empregou-se sistema de *manifold* com capacidade para 12 cartuchos (Phenomenex, EUA) e uma bomba a vácuo.

A primeira etapa consistiu na seleção do sorbente adequado. Para isto, diferentes cartuchos SPE foram testados, sendo eles: Chromabond® C18-EC e C18; Strata® X, XC e C18-E; e Supelcosil® C8, cujas especificações estão detalhadas na Tabela 3.1. Cada cartucho foi testado utilizando-se 100 mL da amostra de efluente hospitalar, fortificado na concentração de 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada analito e percolado através dos cartuchos. Seguiu-se o protocolo geral de recomendação do fabricante para as etapas de condicionamento e pré-equilíbrio, lavagem e eluição (Figura 3.1).

O cartucho que apresentou as melhores recuperações, foi selecionado, e em uma etapa posterior, selecionaram-se, os solventes para o condicionamento e pré-equilíbrio do cartucho e solvente para a etapa de eluição analitos (Figura 3.2). Metanol e acetonitrila foram testados como solventes de condicionamento/ativação do sorbente, água e solução de formiato de amônio, 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , ajustada em pH 4,5, para pré-equilíbrio do cartucho. Finalmente, acetonitrila, metanol e uma mistura do diclorometano-metanol (1:1) foram comparados como solventes de eluição. Para todas estas variáveis qualitativas foram fixados os volumes de 5 mL (2x) para cada solvente de condicionamento/pré-equilíbrio e 3 mL de solvente de eluição.

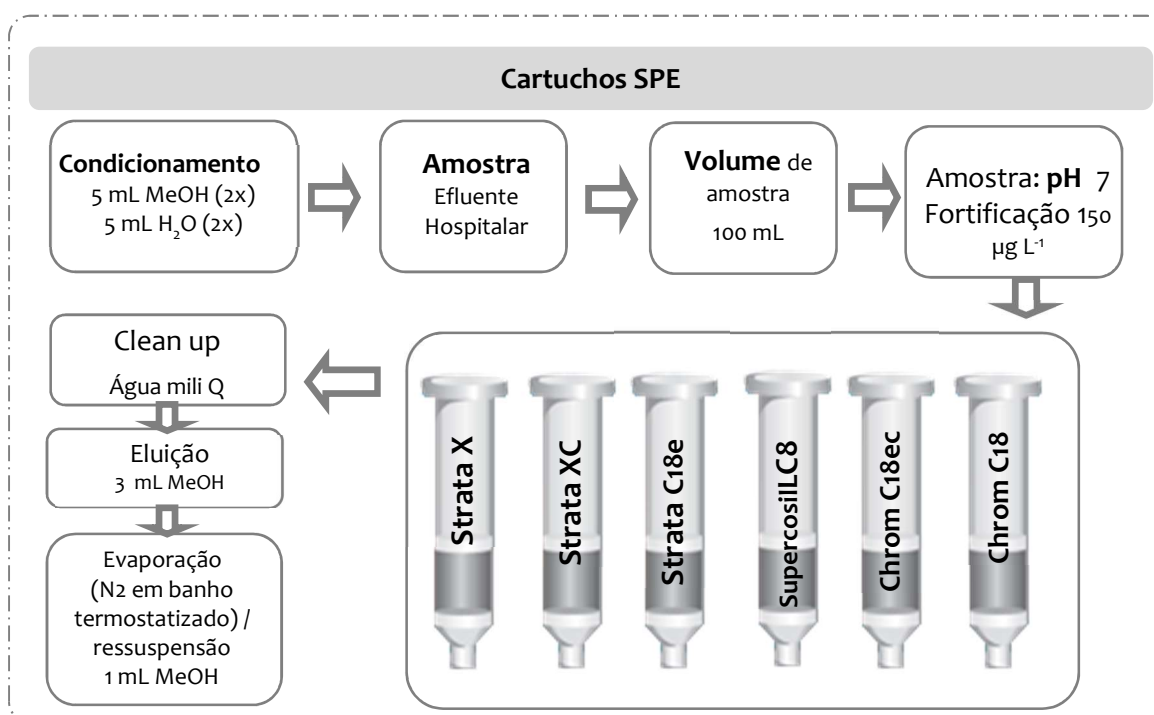
Tabela 3.1 – Especificações cartuchos SPE testados como sorbentes.

Fase	Estrutura Química	Especificações
✓ Strata X		<p><b>Sorbente:</b> Material polimérico à base de estireno – divinilbenzeno</p> <p><b>Mecanismo:</b> Ligações do tipo <math>\pi - \pi</math> e também ligação de hidrogênio, resultando em seletividade para compostos polares e aromáticos.</p>
✓ Strata X-C		<p><b>Sorbente:</b> Base Polimérica ácido benzeno sulfônico</p> <p><b>Mecanismo:</b> Sorbente polimérico funcionalizado de forte troca catiônica que permite a retenção de compostos básicos com um <math>pK_a</math> inferior a 10,5.</p>
✓ Strata C18-e ✓ Chromabond C18-ec		<p><b>Sorbente:</b> Octadecilsilano com grupos silanóis residuais desativados/protegidos (end-capped).</p> <p><b>Mecanismo:</b> Forte retenção hidrofóbica, devido às interações entre as ligações C-H do grupo C18 e CH do analito. As interações polares secundárias dos grupos silanol ativos são desprezíveis.</p>
✓ Chromabond C18		<p><b>Sorbente:</b> Octadecilsilano</p> <p><b>Mecanismo:</b> Semelhante a C18 ec, porém possui mais silanóis livres, que permitem interações secundárias com grupos polares dos analitos.</p>
✓ Supelcosil C8		<p><b>Sorbente:</b> Grupo octil ligado à sílica</p> <p><b>Mecanismo:</b> O C8 é muito semelhante em propriedade ao C18, mas não é tão retentivo para compostos não polares devido a sua cadeia de hidrocarbonetos mais curta.</p>

Fonte: Adaptado (MACHEREY NAGEL, 2018; PHENOMENEX, 2018a, 2018b; SUPELCO, 2018)

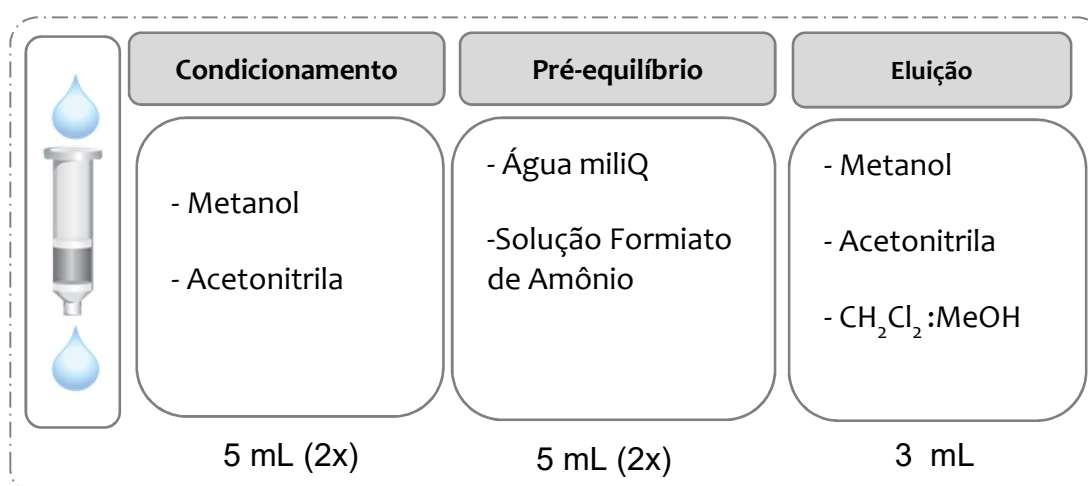


Figura 3.1 – Esquema do procedimento geral de SPE efetuado para escolha do cartucho adequado



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 3.2 – Solventes utilizados para os testes de condicionamento do sorvente e eluição dos analitos do procedimento de extração SPE.



Fonte: Elaborado pela autora

As variáveis qualitativas foram definidas através dos experimentos anteriores (Tipo de cartucho SPE e solventes para condicionamento, pré-equilíbrio e eluição adequados), as quais foram fixadas e então foram investigadas as variáveis quantitativas. Neste procedimento. Os fatores quantitativos suspeitos de provocar influência na recuperação dos analitos foram examinados simultaneamente, ao invés de forma univariada. Dessa maneira, foi possível detectar interações entre os fatores. O método consistiu em duas etapas: triagem e otimização das variáveis significativas para obter as condições ótimas de extração.

O planejamento Plackett-Burman (PBD), composto por 15 experimentos (Tabela 3.2), foi utilizado para avaliar a influência dos seguintes parâmetros: *i*) pH da amostra, *ii*) volume do solvente de condicionamento, *iii*) volume do solvente para pré-equilíbrio, *iv*) pH da amostra, *v*) volume utilizado para a etapa de lavagem, *vi*) volume de solvente de eluição e *vii*) adição de ácido fórmico ao solvente de eluição (devido a relatos na literatura de maior estabilidade dos analitos com acidificação).

Tabela 3.2 – Planejamento experimental para identificação das variáveis que exercem maior influência na extração por SPE dos anticânceres em estudo.

Variáveis ↓	Níveis →						
	Baixo(-1)	Central(0)	Alto (+)				
pH da amostra	X <sub>1</sub>	5	7	9			
Solvente para condicionamento (mL)	X <sub>2</sub>	5	7,5	10			
Solvente para pré-equilíbrio (mL)	X <sub>3</sub>	5	7,5	10			
pH da água de lavagem	X <sub>4</sub>	5	7	9			
Água de lavagem (mL)	X <sub>5</sub>	1	3,5	6			
Ácido fórmico (%)	X <sub>6</sub>	0	0,05	0,1			
Solvente de eluição (mL)	X <sub>7</sub>	1	2,5	4			
Exp.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

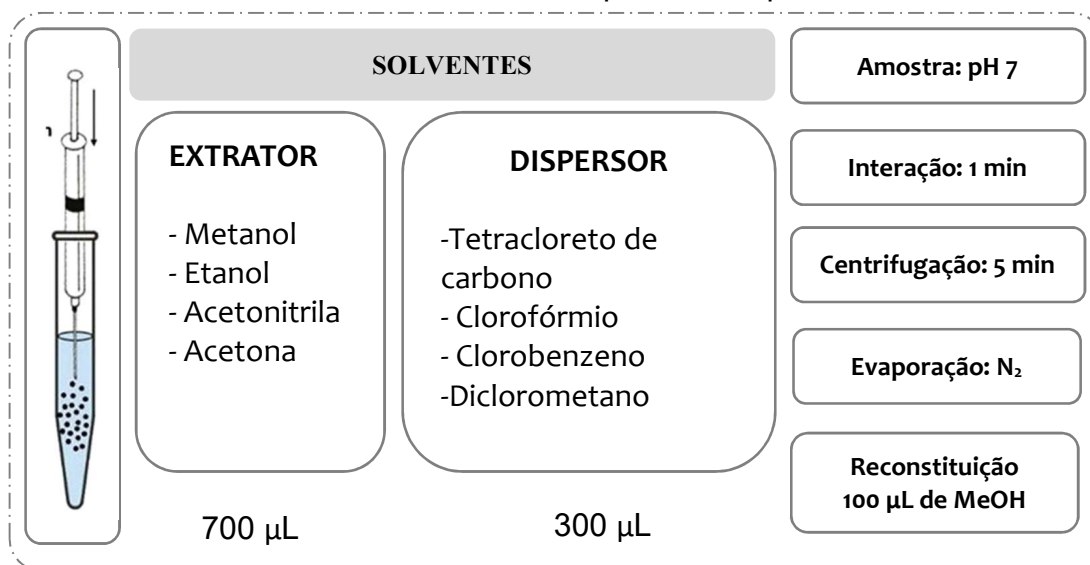
Fonte: Elaborado a partir do programa Statistica - StatSoft

### 3.2.6 Otimização da microextração líquido-líquido dispersiva

A primeira etapa consistiu na escolha dos solventes extrator e dispersor adequados. Tetracloreto de carbono, diclorometano, clorofórmio e clorobenzeno foram avaliados como solventes de extração, com base em sua maior densidade e baixa miscibilidade em água. Acetona, metanol, etanol e acetonitrila foram testados como solventes dispersores. Na escolha do solvente dispersor, considerou-se a sua miscibilidade com o solvente de extração e a solução aquosa (amostra).

As 16 combinações de solventes extrator e dispersor foram avaliadas pelo seguinte procedimento geral: com o auxílio de uma seringa de vidro de 1,0 mL, uma mistura de 700  $\mu\text{L}$  de solvente dispersor e 300  $\mu\text{L}$  de solvente extrator foi rapidamente injetada em 10 mL de uma amostra de efluente hospitalar (pH 7), fortificada na concentração de 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada um dos analitos em estudo. O tempo de interação foi fixado em 1 min e uma etapa posterior de centrifugação com tempo de 5 min a 4000 rpm. A fase sedimentada foi recolhida do fundo do frasco cônico e evaporada sob fluxo de nitrogênio, em banho, termostaticado a 40 °C. Subsequentemente, foi ressuspensa em 100  $\mu\text{L}$  de metanol e analisado por HPLC-FLD (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Esquema do procedimento geral de DLLME efetuado para escolha da mistura de solventes extrator:dispersor adequada.



Fonte: Elaborado pela autora

Um delineamento experimental multivariado foi empregado para avaliar a influência dos seguintes fatores: *i)* volumes de solvente extrator, *ii)* volume de solvente dispersor, *iii)* adição de sal, *iv)* pH da amostra, *v)* tempo de interação, *vi)* tempo de centrifugação e *vii)* velocidade de centrifugação utilizando um PBD. A matriz experimental pode ser visualizada na Tabela 3.3.

A partir da avaliação dos resultados obtidos pelo PBD, as variáveis cujos efeitos foram significativos na recuperação dos analitos empregando a DLLME, a um nível de confiança de 95%, foram otimizadas empregando um planejamento completo, no caso CCD.

Tabela 3.3 – Planejamento experimental para identificação das variáveis que exercem maior influência na extração por DLLME dos anticânceres em estudo.

Variáveis ↓		Níveis →					
		Baixo (-1)	Central	Alto (+1)			
Solvente dispersor (μL)	X <sub>1</sub>	250	500	750			
Solvente extrator (μL)	X <sub>2</sub>	100	175	250			
pH da amostra	X <sub>3</sub>	5	7	9			
Força iônica (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub>	0	0,5	1			
Tempo de extração (min)	X <sub>5</sub>	1	3	5			
Velocidade de centrifugação (rpm)	X <sub>6</sub>	2000	3000	4000			
Tempo de centrifugação (min)	X <sub>7</sub>	3	4.5	6			
Exp.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Elaborado a partir do programa Statistica - StatSoft

### 3.2.7 Procedimento de validação

Após a definição das condições experimentais, o método analítico proposto foi validado de acordo com o guia de controle de qualidade analítica e procedimento de validação de métodos (SANTE, 2017) e em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005(ISO/IEC 17025, 2017). Devido à falta de diretrizes específicas para a validação dos métodos analíticos empregados para a determinação de drogas farmacêuticas em amostras ambientais, essas normas foram adotadas, visto que são diretrizes com critérios rígidos para a determinação de pesticidas e assim como nas amostras ambientais, se trata de contaminantes em níveis de traços em amostras complexas.

Os métodos tanto SPE quanto DLLME foram validados em termos de linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão (*intraday*) e reprodutibilidade (*interday*), exatidão e limite de quantificação (LOQ).

A seletividade do método foi verificada pela injeção do extrato de amostra de efluente hospitalar. A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas de calibração preparadas em solvente orgânico (metanol) e em extrato de matriz, em sete níveis de concentração, de 0,08 a 10 mg L<sup>-1</sup>, o que corresponde a 0,8 a 100 µg L<sup>-1</sup> na amostra, dado ao fator de preconcentração de 100 vezes, obtido em ambos os métodos de extração. A linearidade foi expressa com R<sup>2</sup>, sendo avaliada, também, estatisticamente quanto à normalidade da distribuição dos resíduos, homocedasticidade e autocorrelação de primeira ordem, ou independência dos resíduos.

A avaliação da magnitude do efeito da matriz no sinal analítico de cada analito foi verificada pela comparação entre as inclinações, obtida nas curvas analíticas preparadas em solvente orgânico (metanol) e em extrato da matriz. Deste modo, é possível verificar se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (diminuição de sinal) sobre o resultado da análise.

Exatidão e precisão foram estudadas através dos ensaios de fortificação e recuperação. Para isso, amostras “branco” de efluente hospitalar foram fortificadas com a solução dos anticânceres em três concentrações (1,0; 2,5 e 100 µg L<sup>-1</sup>), com sete repetições cada. A precisão foi expressa como RSD (%) das análises, sendo a repetibilidade avaliada entre o procedimento executado em um mesmo dia e a reprodutibilidade pela comparação dos resultados obtidos executando-se o

procedimento em dias distintos. Os dados foram estatisticamente avaliados utilizando Teste T pareado, sendo considerados resultados significativamente iguais aos valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

O limite de quantificação do método (LOQ) foi definido com base nos resultados obtidos no estudo de fortificação e recuperação, sendo estabelecido como a menor concentração quantificável para um grau aceitável de exatidão e precisão, de acordo com o documento SANTE/11945/2015 (SANTE, 2016).

A estabilidade da solução padrão foi estudada pela comparação da resposta instrumental gerada por uma solução padrão armazenada com a resposta instrumental gerada por uma solução padrão recém preparada. Foram avaliadas as condições e período de armazenamento nos quais a solução padrão foi armazenada no laboratório, a cada mês, pelo período de um ano.

A pureza dos reagentes utilizados foi verificada empregando o método de extração validado, porém a amostra foi substituída pela água ultra-pura. A finalidade dessa etapa foi garantir a qualidade dos experimentos e evitar possíveis contaminações cruzadas e interferências. Além disso, pelo menos um “branco” foi analisado em conjunto com cada lote de amostras, para verificar a contaminação durante o pré-tratamento. No início da sequência analítica, os brancos foram examinados para quaisquer picos falsos positivos durante a análise instrumental. Cada lote de amostras continha vial para controle de qualidade (amostra fortificada de concentração conhecida), que foi analisado em paralelo.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

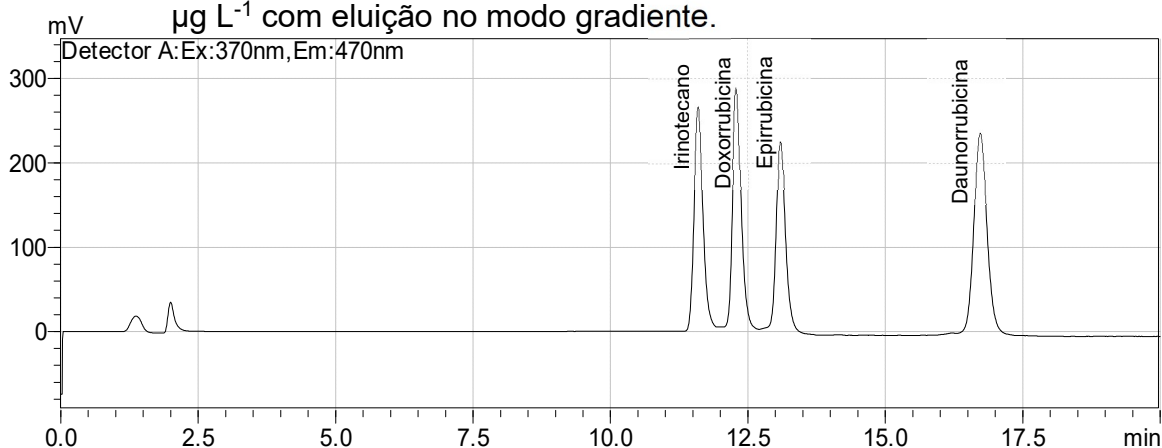
#### 3.3.1 Condições cromatográficas

A separação dos medicamentos antineoplásicos investigados foi realizada por cromatografia líquida de fase reversa, sendo que a coluna utilizada foi C18 Alltima. A cromatografia líquida em fase reversa é considerada uma escolha adequada para a separação de misturas de compostos neutros e iônicos de baixo peso molecular (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Após inúmeros testes de composição da fase móvel utilizando metanol, acetonitrila e testes com diversos tampões, concluiu-se que a utilização do metanol acarretava em alargamentos dos picos, optando-se pela utilização da acetonitrila como modificador orgânico.

A utilização de tampão foi necessária, sendo testados fosfato de potássio, acetato de amônio, formiato de amônio e formiato de sódio e seus respectivos ácidos. Testou-se também variar o pH da solução, optando-se por utilizar o pH de 4,5. Os analitos foram separados somente quando utilizado formiato de amônio na concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 e modo de eluição gradiente (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Cromatograma obtido para separação dos analitos em estudo por HPLC-FLD em solução analítica preparada em metanol na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> com eluição no modo gradiente.



Fonte: Cromatograma obtido via software LC Solution

Desta forma, as condições instrumentais empregadas para o sistema de HPLC-FLD foram as seguintes:

- Para o cromatógrafo à líquido:
  - Coluna Cromatográfica: Coluna Alltima C18 - 5 µm; 150 x 3,2 mm (Alltech, Deerfield, IL, USA);
  - Volume de injeção de 20 µL;
  - Temperatura do forno da coluna: 35 °C;

- Eluente A: Tampão formiato de amônio: ácido fórmico, 100 mmol L<sup>-1</sup>, ajuste do pH a 4,5 contendo 0,02% de trietilamina;
- Eluente B: Acetonitrila;
- Gradiente da fase móvel: O programa foi iniciado em 20% do eluente A e foi diretamente levado a 30% em 5 min, mantendo-se constante durante 7 min e diminuindo para 20% do eluente A até 16 minutos. Esta é a condição inicial da fase móvel e foi mantida constante para que a coluna fosse reequilibrada.
- Vazão da fase móvel constante em 0,70 mL min<sup>-1</sup>;
- Tempo total de análise: 20 minutos.

Para o detector de fluorescência, as condições constam na Tabela 3.4, assim como os tempos de retenção de cada analito.

Tabela 3.4 – Condições instrumentais de detecção para determinação de drogas anticâncer, empregando HPLC-FLD em efluente hospitalar.

<b>Analito</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Comprimento de Onda de Excitação</b>	<b>Comprimento de Onda de Emissão</b>
Irinotecano	11,5	370	554
Doxorrubicina	12,4	235	550
Epirubicina	13,2	235	550
Daunorrubicina	16,5	235	550

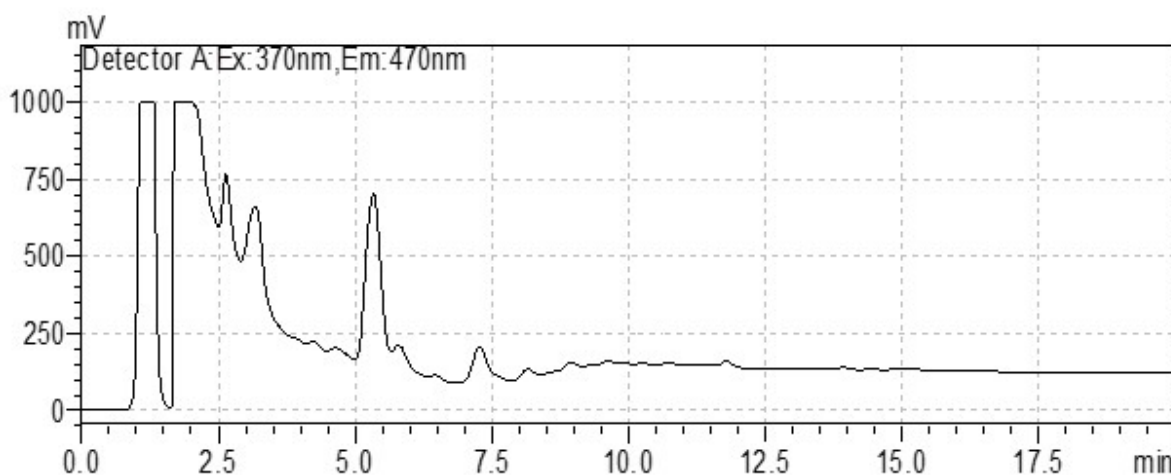
Fonte: Elaborado pela autora

Quando utilizado o modo isocrático, conseguiu-se a separação cromatográfica em solvente orgânico em tempo inferior a 10 minutos de corrida. Porém, quando em extrato de matriz, houve a coeluição de interferentes da matriz e os analitos. Para contornar este problema, fez-se a utilização dos adsorventes PSA, carvão ativo, SiOH e combinação destes. Porém, os mesmos se mostraram ineficientes para remoção das interferências, além de afetarem diretamente as recuperações. Sendo assim, foi



necessário ajuste da composição da fase móvel a fim de retardar o tempo de retenção dos analitos e evitar a sobreposição de picos (Figura 3.5).

Figura 3.5 – Cromatograma obtido para separação obtida por HPLD-FLD de um extrato de matriz obtido por SPE com eluição no modo gradiente.



Fonte: Cromatograma obtido via software LC Solution

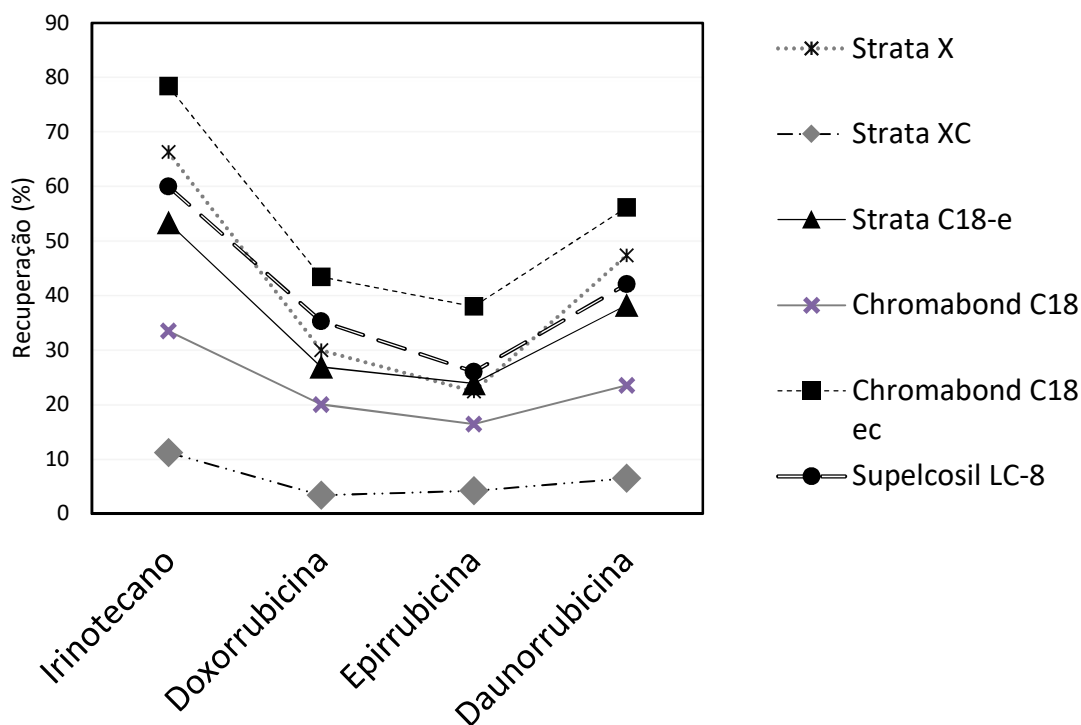
### 3.3.2 Extração em fase sólida

O parâmetro mais importante que deve ser otimizado em um novo procedimento de SPE é o tipo de sorvente. Sua seleção depende da natureza da matriz e das propriedades físico-químicas dos analitos-alvo. A Figura 3.6 mostra as recuperações (%) obtidas para os 6 tipos de cartuchos testados. O cartucho Chromabond C18ec apresentou as melhores recuperações obtidas para quatro analitos, enquanto o cartucho Strata XC apresentou as menores recuperações. Resultados semelhantes foram reportados em investigação empregando cartucho de troca iônica, para a extração de 13 drogas anticâncer em amostras ambientais (NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013).

Acetonitrila e solução de formiato de amônio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 4,5 foram selecionados para a etapa de condicionamento e equilíbrio, respectivamente, pois apresentaram uma taxa de recuperação ligeiramente superior, comparado ao uso das demais combinações de solvente para esta etapa (Figura 3.7). Já para a etapa de eluição, bons resultados foram obtidos a partir do uso de metanol como solvente para esta finalidade. A mistura de diclorometano: metanol (1:1, v/v) pode ser considerada

igualmente eficiente para a etapa de eluição. No entanto, o metanol foi escolhido para evitar o uso de solvente halogenado (Figura 3.7).

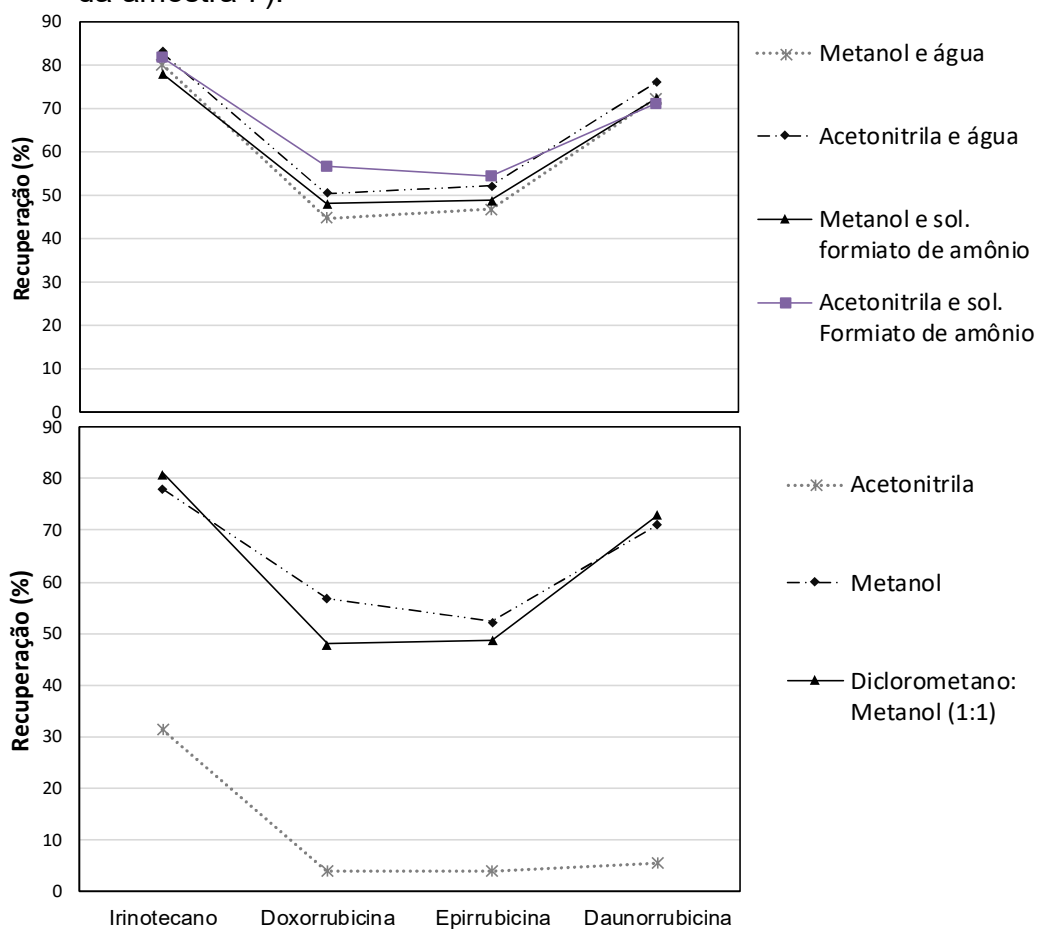
Figura 3.6 – Influências do material de fase sólida (pH 7 e metanol como solvente de eluição e fortificação da amostra em  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), nas recuperações de extração de SPE.



Fonte: Elaborado pela autora

Entre as variáveis que afetam a extração dos analitos, o pH da amostra e da água utilizada para a lavagem do cartucho SPE têm influência na adsorção dos analitos sobre o sorbente, por interações de Van der Waals, interações dipolo-dipolo. O pH da amostra, confere ao analito características polares ou apolares. Além do pH, a eficiência do procedimento de SPE é afetada por vários fatores, que às vezes são correlacionados. Uma estratégia baseada no uso de um delineamento experimental multivariado foi usada para avaliar os efeitos de sete variáveis (Tabela 3.2), definidas para o processo de SPE.

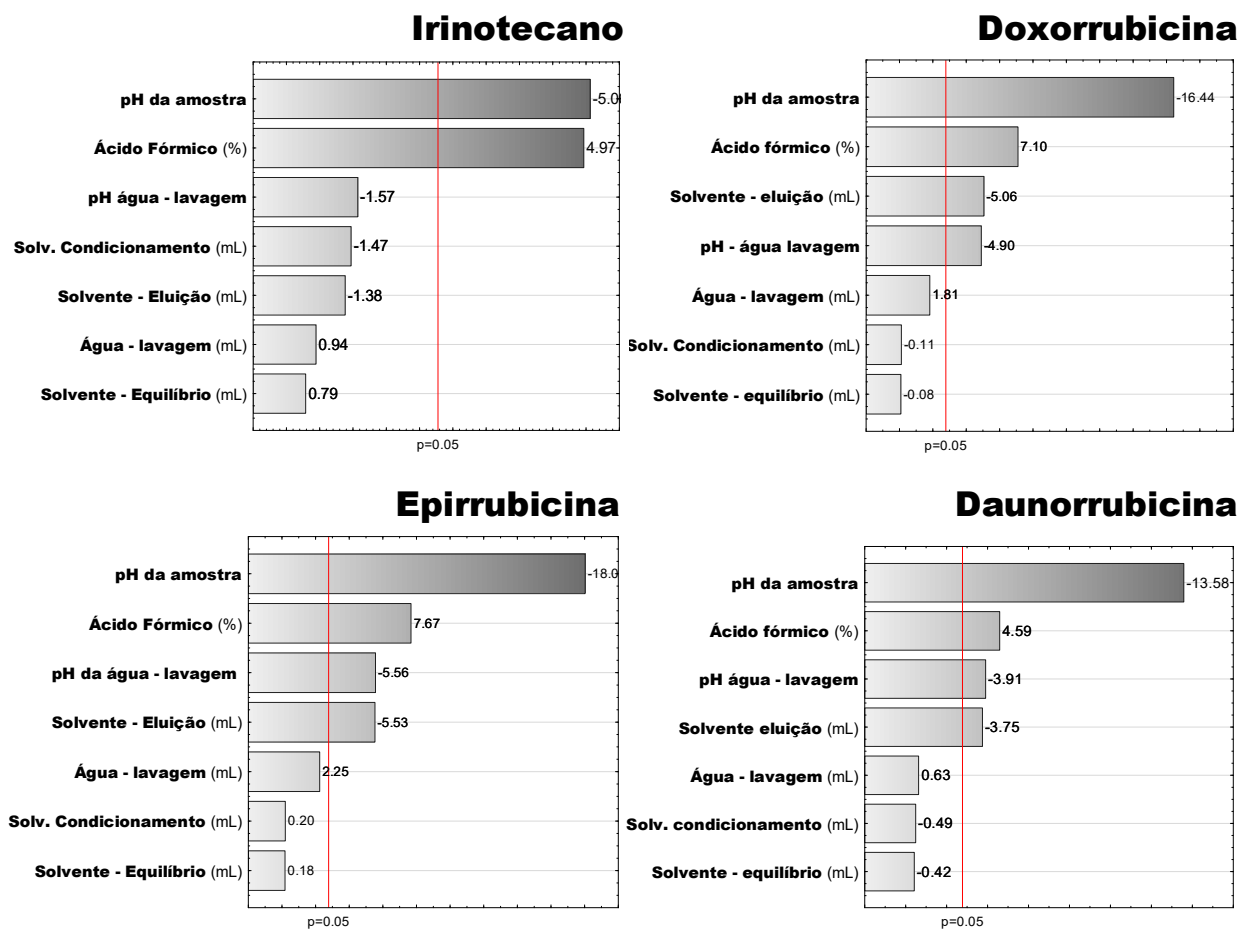
Figura 3.7 – Seleção de solventes para: (A) condicionamento e equilíbrio do cartucho SPE; (B) eluição dos analitos (Cartucho SPE Chromabond C18 ec e pH da amostra 7).



Fonte: Elaborado pela autora

Na Figura 3.8, pelo diagrama de Paretos identificaram-se as variáveis mais influentes sob a extração dos analitos. O pH da amostra e a adição de ácido fórmico ao solvente metanol são os fatores mais significativos para todos os analitos. O pH da água de lavagem e o volume do metanol tiveram um efeito significativo na extração da doxorubicina, epirubicina e daunorrubicina. O efeito dos volumes de solventes para o condicionamento, equilíbrio e lavagem não foi estatisticamente significativo; assim, eles não precisaram ser otimizados. Foi fixado em 1,0 mL o volume de água para lavar o cartucho. Os volumes dos solventes de condicionamento e equilíbrio foram fixados em 5 mL.

Figura 3.8 – Diagrama de Pareto para os efeitos para a extração em fase sólida. Linha vertical no diagrama define o nível de 95% de confiança.



Fonte: Elaborado a partir do programa Statistica - StatSoft

Os fatores relevantes identificados através do planejamento PBD, foram utilizados para otimizar a resposta para a extração dos quatro anticânceres, sendo eles: pH da amostra, pH da água de lavagem, % ácido fórmico e o volume de metanol empregado na eluição dos analitos. Um planejamento completo, do tipo CCD com 30 experimentos, (6 pontos central) foi conduzido e o planejamento experimental pode ser visualizado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Planejamento experimental para a otimização das variáveis da SPE empregando planejamento composto central

Variáveis ↓		Níveis				
		Baixo (-1)	Central	Alto (+)	- $\alpha$	+ $\alpha$
pH da amostra	$x_1$	5	7	9	3	11
pH da água de lavagem	$x_4$	5	7	9	3	11
Ácido fórmico (%)	$x_6$	0,06	0,1	0,4	0,02	0,18
MeOH (mL)	$x_7$	2	3	4	1	5

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 3.9 mostra os gráficos da superfície de resposta obtidos pelo CCD. Conforme mostrado, as maiores respostas foram observadas em pH ácido, mais precisamente, abaixo de 4,5, exceto para daunorrubicina, que apresentou uma melhor resposta com valores de pH entre 5 e 6 (Figura 3.9). Os gráficos de superfície de resposta obtidos para o volume de metanol e pH indicam que a melhor resposta foi obtida usando-se 1,5 - 2,5 mL de metanol e pH da amostra ácido. A adição de 0,08-0,12% de ácido fórmico ao metanol resultou em melhores recuperações (Figura 3.9). Os perfis das variáveis independentes em função da desejabilidade para os valores de recuperação (%) indicam as melhores condições que favorecem as melhores recuperações para extração em fase sólida. Desta forma, considerando as condições para que todos os compostos sejam extraídos simultaneamente, o procedimento de extração otimizado consiste em: condicionamento do cartucho Chromabond® C18 EC (500 mg, 3 mL) com 5 mL de acetonitrila e, para a etapa de equilíbrio, 5 mL de solução de formiato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 4,5. A amostra de 100 mL de efluente hospitalar, com pH ajustado em 3,5, é então percolada, na vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>, e, em seguida a lavagem dos cartuchos é feita com 1 mL de água ultrapura (pH 7), seguida por uma etapa de secagem de 5 min. Os analitos são então eluídos com 2,0 mL de metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico. Finalmente, os eluatos são evaporados até a secura (sob corrente de N<sub>2</sub> e banho termostatizado a 40°C) e ressuspensos com 1 mL do metanol (Figura 3.11).

Figura 3.9 – Superfície de resposta obtida por Planejamento Composto Central para: (A) Porcentagem de Ácido fórmico adicionado ao solvente de eluição *vs* pH da amostra, para daunorrubicina; (B) pH da amostra *vs* volume de metanol para eluição, para irinotecano; (C) pH da amostra *vs* porcentagem de ácido fórmico adicionado ao solvente de eluição; para doxorrubicina (D) pH da amostra *vs* volume de metanol para eluição, para epirrubicina.

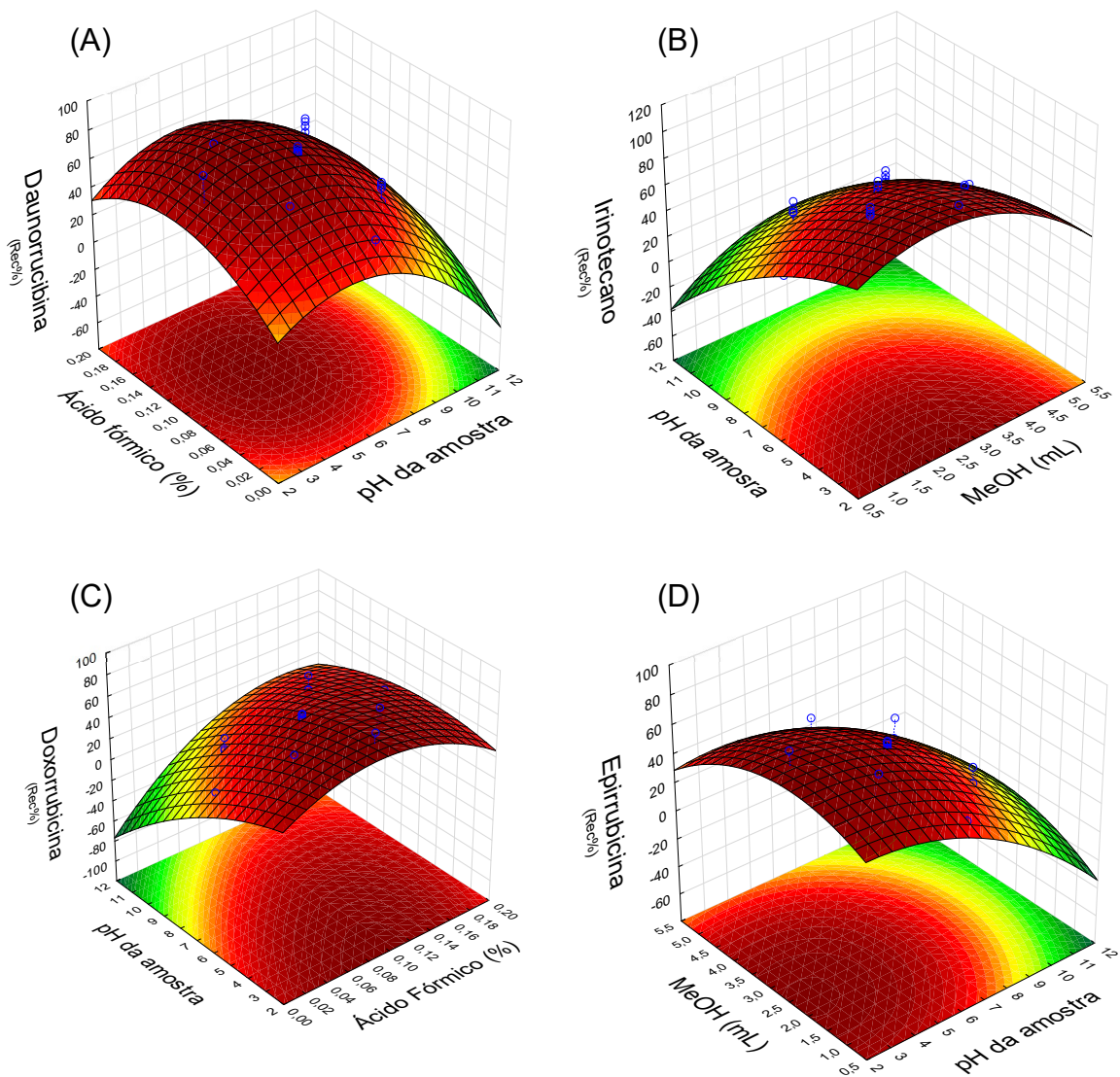


Figura 3.10 – Perfil das variáveis independentes relacionadas à deseabilidade de recuperação dos anticânceres em estudo por SPE.

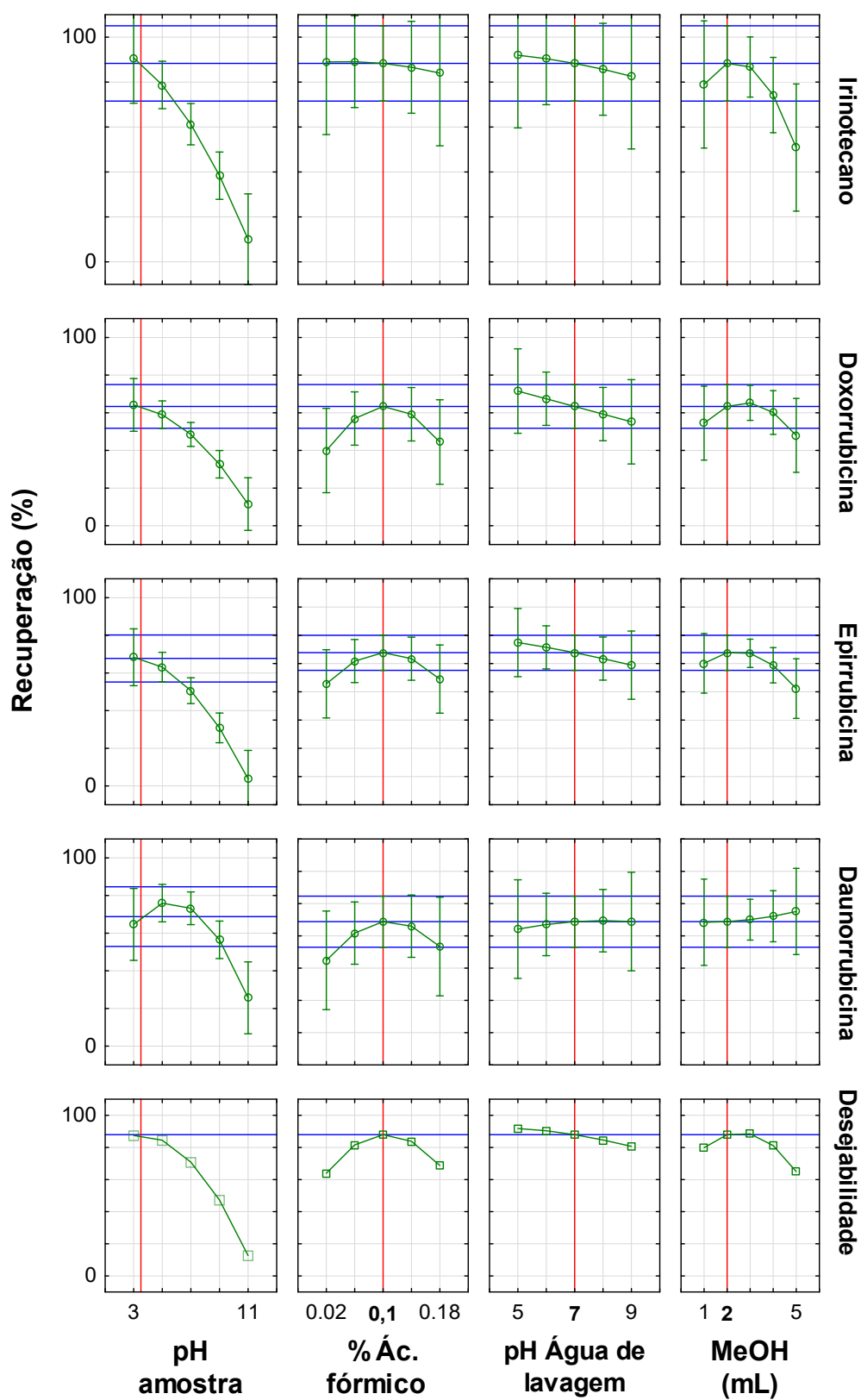
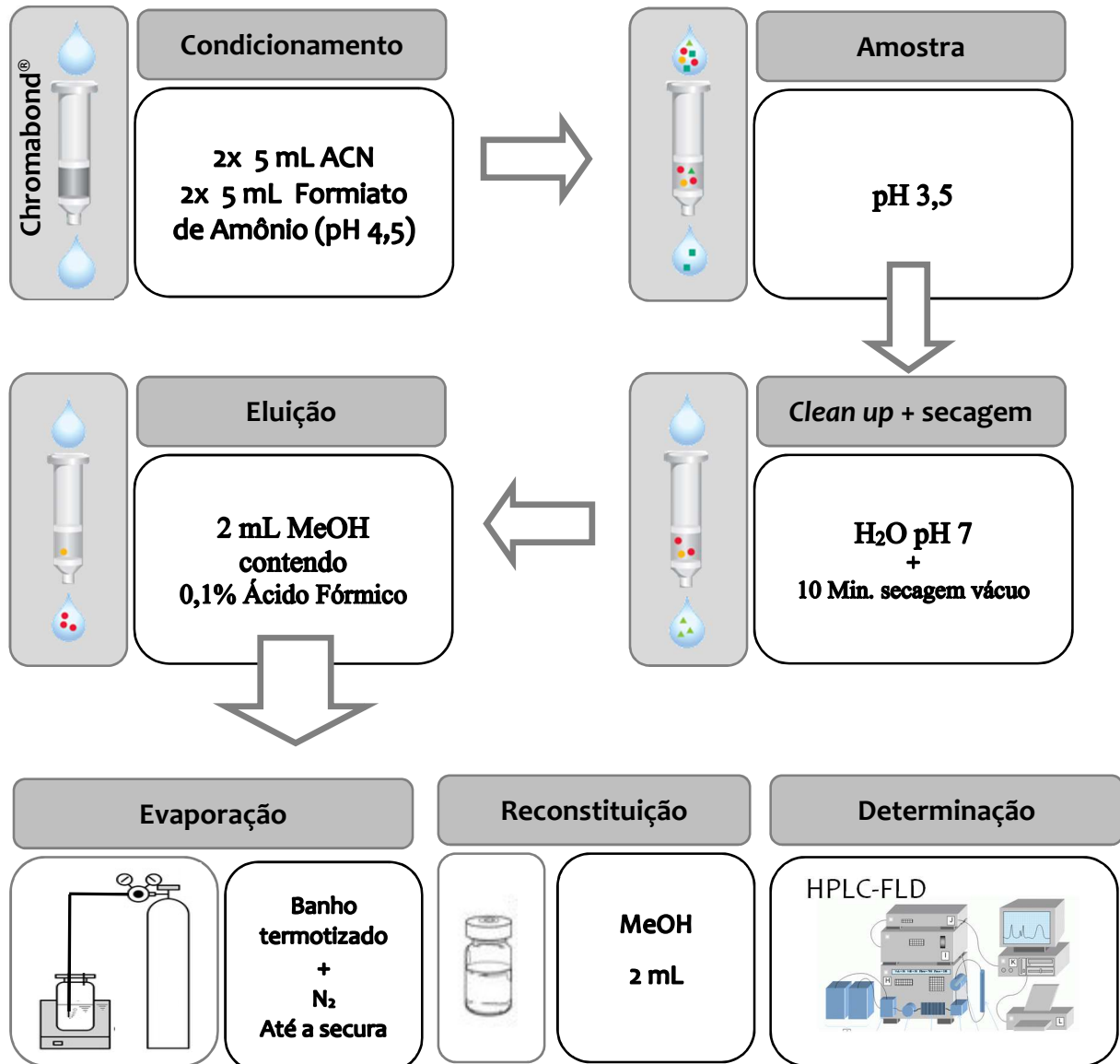


Figura 3.11 – Etapas do procedimento de extração em fase sólida, e variáveis otimizadas utilizando experimentos univariados e planejamento multivariado.



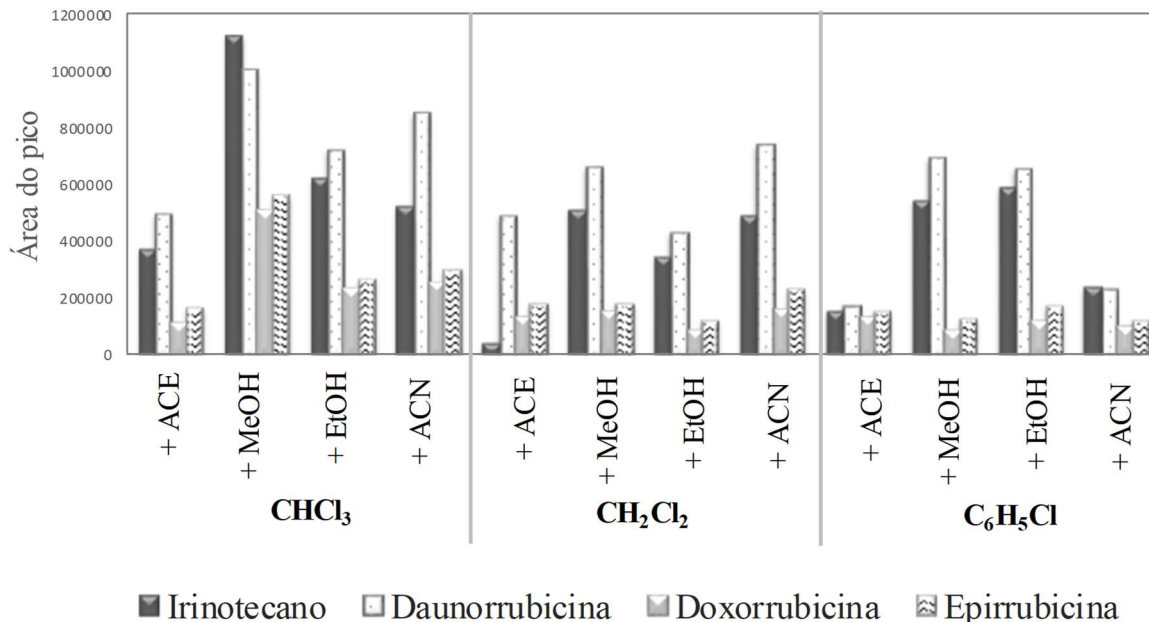
Fonte: Elaborado pela autora



### 3.3.3 Microextração líquido-líquido dispersiva

As interações entre os solventes devem ser observadas durante a otimização das condições de extração. Desta forma, a primeira etapa consistiu em selecionar a mistura de solventes extrator e dispersor, o que totalizou em 16 combinações de solventes. Todas as misturas de solventes testadas contendo tetracloreto de carbono foram rejeitadas porque os analitos não foram extraídos durante o seu uso. Como mostrado na Figura 3.12, a mistura de clorofórmio e metanol extraiu todos os analitos com maior eficiência quando comparada às demais misturas. Por esta razão, foi escolhida para este estudo.

Figura 3.12 – Efeito de diferentes misturas de solventes testados como extrator/dispersor na eficiência de extração por DLLME. Volume do solvente extrator 300  $\mu$ L; volume de solvente dispersor 700  $\mu$ L.



Abreviações: ACE, acetona; MeOH, metanol; EtOH, etanol; ACN, acetonitrila; CHCl<sub>3</sub>, clorofórmio; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, diclorometano; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl, clorobenzeno.

Fonte: Elaborado pela autora

Com relação a adição de sal, o melhor resultado foi obtido com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Após a injeção da mistura de solventes, testaram-se a extração dos analitos com agitação por vortex e banho de ultrassom as quais foram comparadas a interação da solução sem nenhuma etapa adicional de agitação. Nos três procedimentos, as respostas foram muito semelhantes, então o procedimento de extração mais simples foi escolhido, ou seja, a solução permaneceu em repouso durante a etapa de interação sem uma etapa adicional.

A partir dos resultados obtidos pelo planejamento experimental fatorial do tipo Plackett-Burman com 15 experimentos, identificaram-se os fatores que afetam a eficiência da extração dos analitos. A partir da análise dos diagramas de Pareto, identificaram-se os fatores que mostraram efeitos significativos na recuperação dos analitos, sendo eles: pH da amostra, força iônica e os volumes dos solventes empregados como dispersores e como extratores (como mostrado na Figura 3.13). Os efeitos do tempo de extração, velocidade e tempo de centrifugação não foram estatisticamente significativos. Desta forma, o tempo de centrifugação de 5 min a velocidade de 3500 rpm foram estabelecidos, visto ser suficiente para a separação de fases. Este é o estágio mais demorado na DLLME. Um longo tempo de centrifugação deve ser evitado, uma vez que o movimento gera calor, o que pode causar a ruptura da separação entre as fases (ZHOU et al., 2008). O efeito do tempo de extração foi insignificante sobre os resultados de recuperação dos analitos. Em vista disso, o tempo de 1 minuto foi definido para a etapa de interação.

Um planejamento empregando CCD com 26 experimentos foi realizado para a otimização dos fatores que apresentaram efeito significativo na recuperação dos analitos pela DLLME. Como pode ser visto na Tabela 3.6, os seguintes fatores foram otimizados nas seguintes faixas: pH da amostra 3–11, volume de metanol como solvente dispersor 400–1200  $\mu\text{L}$ , volume de clorofórmio como solvente extrator 200–800  $\mu\text{L}$ , concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2–1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . As respostas foram otimizadas simultaneamente usando a função de desejabilidade e os resultados são mostrados na Figura 3.14.

Figura 3.13 – Diagrama de Pareto para os efeitos estimados (valores absolutos) para DLLME. A linha vertical pontilhada define o nível de 95% de confiança

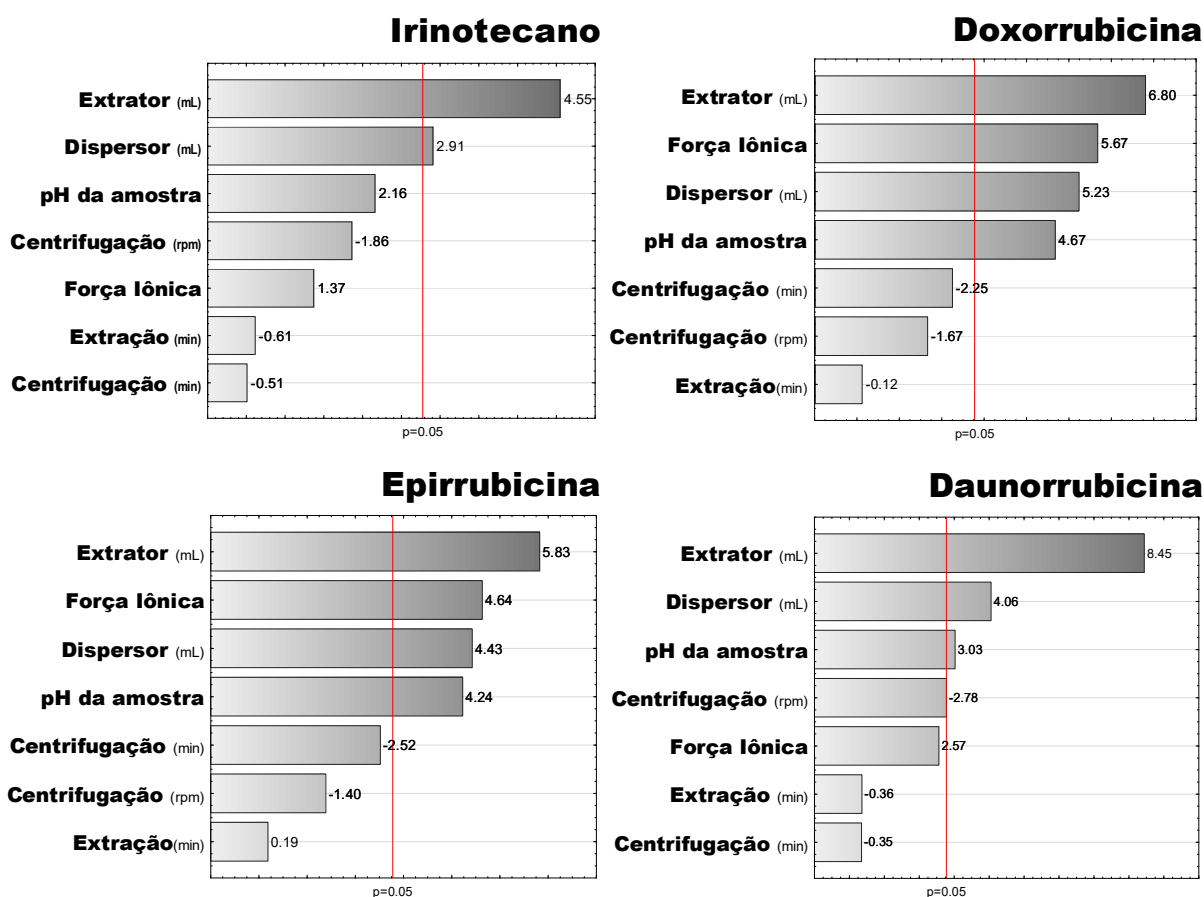
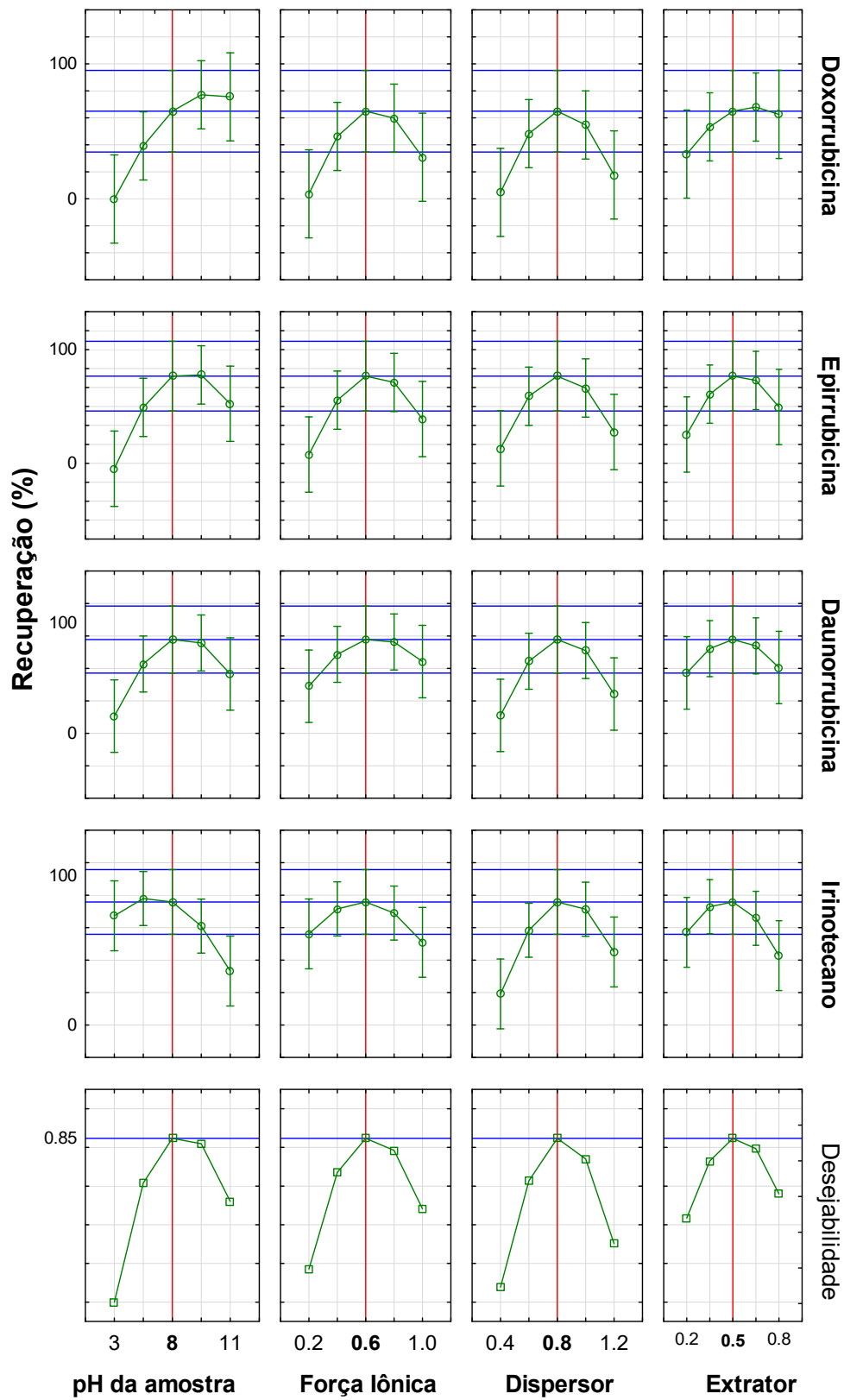


Tabela 3.6 – Planejamento experimental para a otimização das variáveis da DLLME empregando planejamento composto central

Variáveis ↓		Níveis			Pontos axiais	
		Baixo (-1)	Central	Alto (+)	- $\alpha$	+ $\alpha$
Solvente dispersor ( $\mu\text{L}$ )	X <sub>1</sub>	600	800	1000	400	1200
Solvente extrator ( $\mu\text{L}$ )	X <sub>2</sub>	350	500	650	100	800
pH da amostra	X <sub>3</sub>	5	7	9	3	11
Força iônica ( $\text{mol L}^{-1}$ )	X <sub>4</sub>	0,4	0,6	0,8	0,2	1,2

Figura 3.14 – Perfil das variáveis independentes relacionadas à deseabilidade de recuperação dos anticânceres em estudo por DLLME.



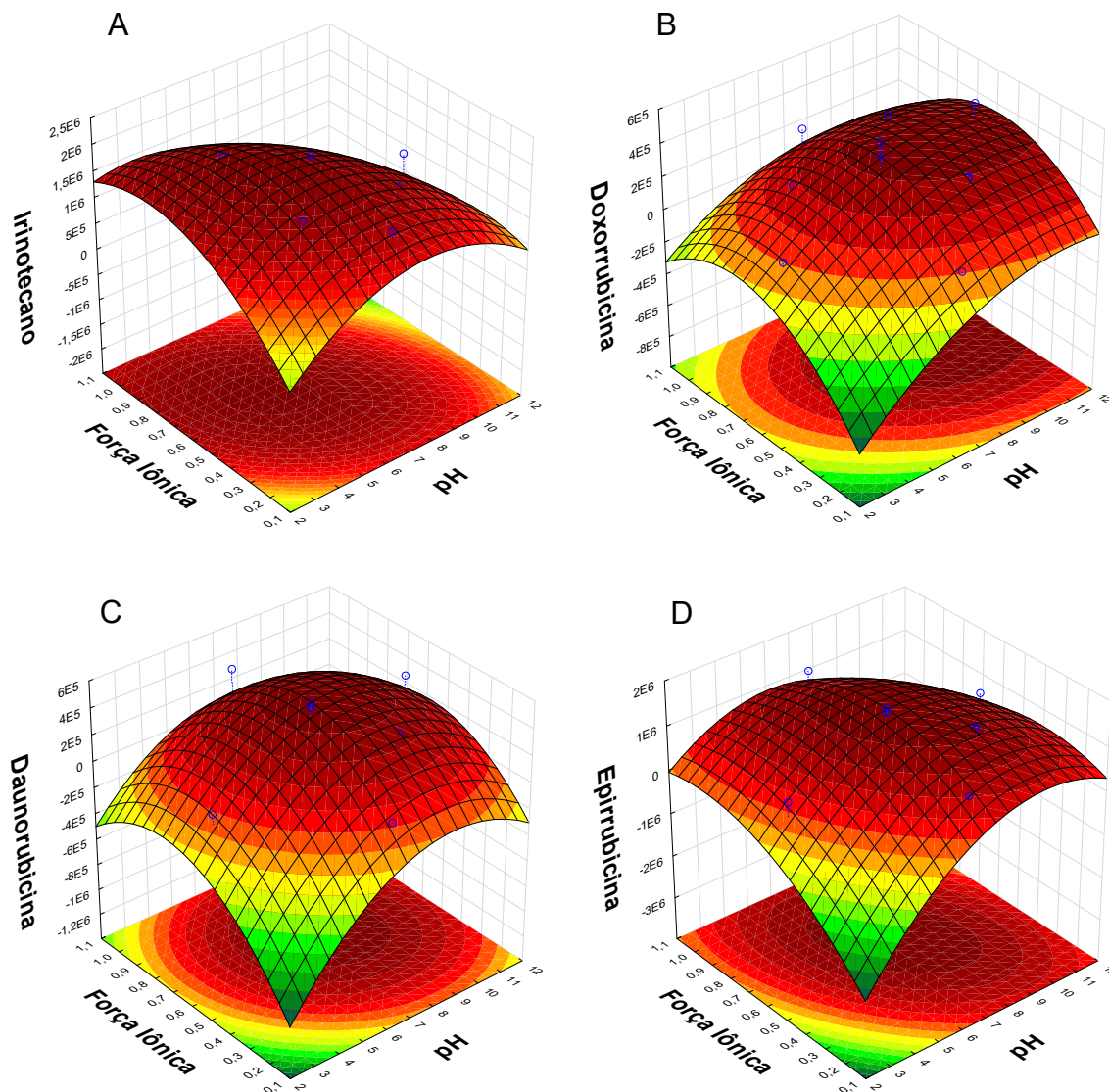
Os analitos ionizados durante a extração possuem baixa afinidade com o solvente orgânico. Como a ionização dos analitos é dependente do pH da solução, investigou-se o efeito do pH nas extrações na faixa de 3-11. Como pode ser visto (Figura 3.14), as recuperações aumentaram quando houve um aumento no valor do pH. No entanto, o oposto ocorreu no caso do irinotecano, uma vez que as recuperações não puderam ser explicadas apenas pelo efeito do pH, mas as interações entre os principais fatores, como o pH e a força iônica, também precisaram ser consideradas. A curvatura nos gráficos de pH *versus* força iônica, confirma a adequação dessas variáveis na região de estudo (Figura 3.14).

A adição de sal pode melhorar a capacidade de extração dos analitos devido ao efeito de *salting-out*, sendo que neste caso, a adição de  $0,06 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  promoveu aumento nas recuperações. Em maiores concentrações, a interação eletrostática entre as moléculas do analito e os íons de sal, provavelmente começaram a desempenhar papel dominante. Como consequência, a transferência de analitos para o solvente extrator pode ter sido afetada e, assim, pode-se justificar a redução na extração (EBRAHIMZADEH et al., 2014).

O volume do solvente de extração é outro fator importante, o qual foi otimizado e apresentou maior eficiência de extração quando foram adicionados o volume de até  $500 \mu\text{L}$  de solvente. Em volumes superiores, a razão entre as quantidades de solvente extrator/dispersor reduz o número de gotículas formadas e, conseqüentemente, observou-se diminuição na eficiência da extração.

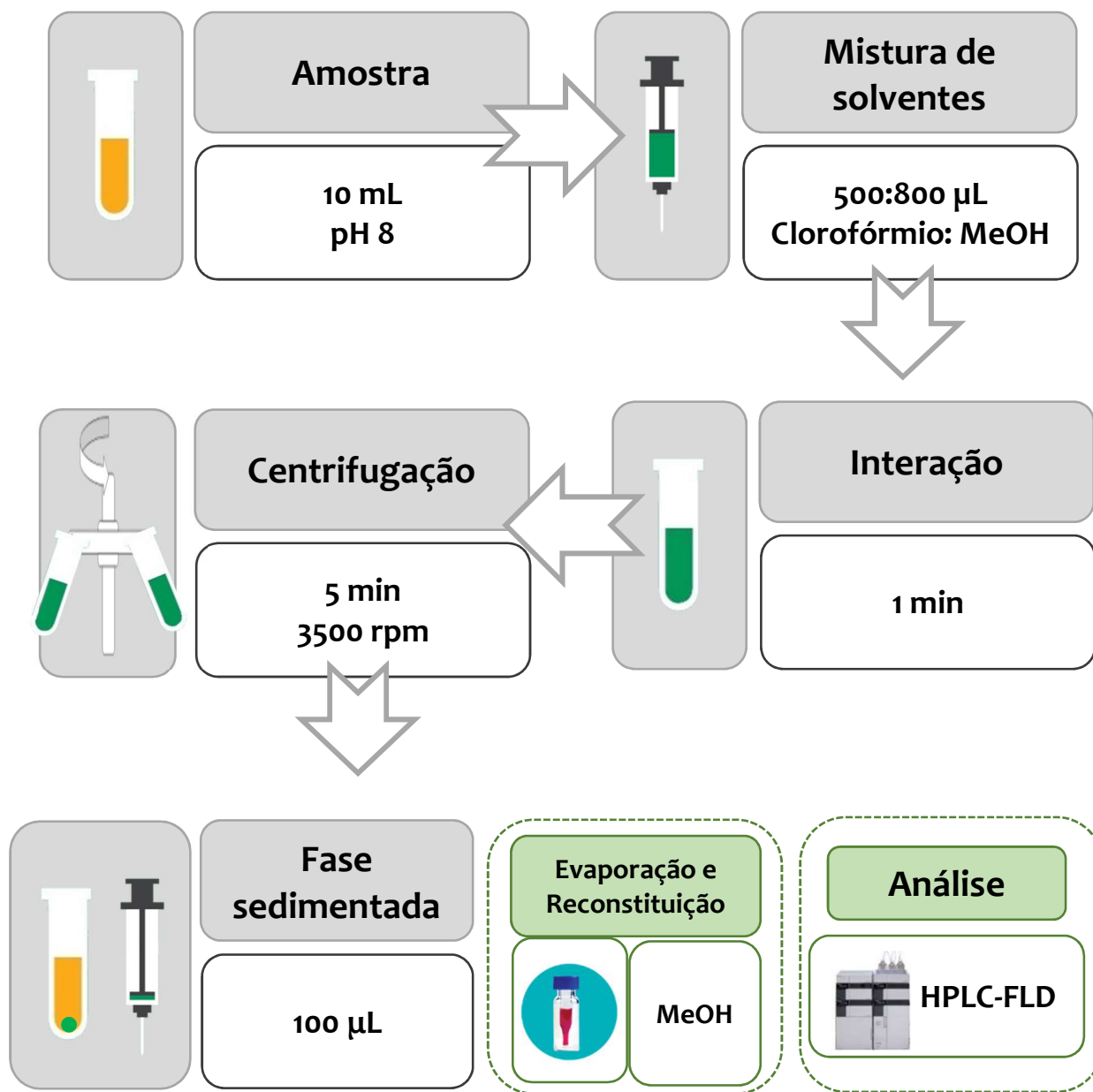
O aumento das recuperações por DLLME também pode ser otimizado com o aumento do volume de solvente dispersor até  $800 \mu\text{L}$ . Acima desse volume, uma diminuição de eficiência foi observada. Isto pode ser explicado da seguinte forma: se forem usados volumes mais baixos do dispersor, a suspensão turva não pode ser formada devido ao pequeno volume de metanol. Por outro lado, com maiores volumes, há uma redução na eficiência da extração causada pelo aumento na solubilidade dos analitos no solvente dispersor.

Figura 3.15 - Superfície de resposta obtida por Planejamento Composto Central para: (A) Força iônica vs pH da amostra, para Irinotecano; (B) pH da amostra vs Força iônica, para doxorubicina; (C) pH da amostra vs força iônica para daunorubicina; (D) pH da amostra vs força iônica, para epirrubicina.



$\text{Na}_2\text{SO}_4$  às amostras ( $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ) e ajuste para pH  $8,0 (\pm 0,05)$ . Foram injetados  $1300 \mu\text{L}$  de mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{metanol}$  ( $500: 800 \text{ v / v}$ ) à amostra de efluente hospitalar ( $10 \text{ mL}$ ) e, após  $1 \text{ min}$  de interação, foi centrifugado por  $5 \text{ min}$  a  $3500 \text{ rpm}$ . A fase sedimentada foi removida e um estágio de concentração adicional foi realizado sob fluxo de nitrogênio com banho termostatizado a  $40^\circ \text{C}$ , ressuspendido em  $100 \mu\text{L}$  de metanol e, subsequentemente, determinado por HPLC-FLD.

Figura 3.16 – Etapas do procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva otimizada e variáveis otimizadas utilizando experimentos univariados e planejamento multivariado.



Fonte: Elaborado pela autora

Quando os métodos de extração por SPE e DLLME são comparados, percebe-se que SPE tem algumas desvantagens, como as seguintes: i) é multiestágio, ii) necessita de maior quantidade/volume de amostra (10 vezes), iii) envolve estágios que são um pouco mais complicados ; iv) requer vácuo e a percolação da amostra é

demorada, e v) incorre em custos adicionais em função dos custos do cartuchos de SPE, além de que os mesmos são descartáveis.

Por outro lado, a DLLME foi inicialmente proposta como um procedimento alternativo e tem atraído bastante interesse, uma vez que é ecologicamente correta e eficaz para o pré-tratamento de amostras aquosas (RIBEIRO et al., 2014). Além de sua simplicidade, baixos custos, alta taxa de recuperação e velocidade, a DLLME precisa de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos. Neste estudo, foi possível reduzir o volume de  $\text{CHCl}_3$  para 500  $\mu\text{L}$ , o que também está em conformidade com as recomendações para os princípios da química analítica verde (FARRÉ et al., 2010; ARMENTA et al., 2017).

### 3.3.4 Validação do método

O procedimento de validação fornece evidências de que os métodos empregados são adequados ao propósito. Os métodos de extração otimizados por DLLME e por SPE foram validados em termos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LOQ (ISO/IEC 17025, 2017; SANTE, 2017). Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.7.

Os cromatogramas obtidos pela análise dos extratos de amostras “branco” de efluentes hospitalares não apresentaram picos ou quaisquer tipos de interferência nos tempos de retenção dos analitos estudados, o que confirmou a especificidade e seletividade do método analítico, para a complexa matriz que é o efluente hospitalar.

Os resultados para os testes de linearidade das curvas de calibração foram obtidos para soluções padrão em metanol e no extrato da matriz do efluente hospitalar (obtido por ambos SPE e DLLME). Soluções padrão foram preparadas em metanol para todos os analitos e o  $R^2$  foi  $\geq 0,999$ . No caso das soluções padrão preparadas no extrato da matriz, os valores de  $R^2$  foram  $\geq 0,990$ , o que mostra a boa linearidade do método, na faixa de 0,08 a 10  $\text{mg L}^{-1}$  o que corresponde a 0,8 a 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  na amostra de efluente ( devido a concentração de 100 vezes).



Tabela 3.7 – Resultados obtidos para validação de SPE e DLLME em termos de R<sup>2</sup>, precisão (*intraday* e *interday*), exatidão (recuperação) e efeito matriz (%).

Droga Anticâncer	R <sup>2</sup>		Nível de Fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	SPE			DLLME					
	Solvente	Matriz		Recuperação (%)	RSD (%)		Efeito Matriz (%)	Recuperação (%)	RSD (%)		Efeito Matriz (%)	
		SPE	DLLME		<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>			<i>Intraday</i>	<i>Interday</i>		
Irinotecano	0,9993	0,9957	0,9983	1	95,75	8,13	8,03	-9,01	87,98	8,95	6,93	-6,12
				2,5	92,06	3,33	1,36	88,60	7,03	5,52		
				10	94,74	4,74	4,16	90,01	7,82	5,01		
Doxorrubicina	0,9997	0,9985	0,9901	1	74,22	10,3	7,6	-6,53	77,39	15,9	9,58	-4,78
				2,5	75,42	6,56	7,12	74,61	14,6	8,06		
				10	80,95	6,11	4,14	75,23	12,8	7,91		
Epirrubicina	0,9999	0,9997	0,9917	1	74,54	8,74	5,46	-6,16	74,28	10,7	6,99	3,55
				2,5	76,79	5,73	0,82	76,04	9,9	4,97		
				10	87,50	5,03	2,97	78,97	11,5	7,07		
Daunorrubicina	0,9999	0,9991	0,9981	1	81,92	6,07	5,88	-3,78	86,98	11,4	6,59	2,21
				2,5	100,52	7,45	7,25	82,53	10,7	7,11		
				10	104,36	5,28	5,91	88,45	10,8	4,33		

Fonte: Elaborado pela autora.

A avaliação da premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Anderson-Darlin. O teste de Cochram foi utilizado para investigar a presença de valores discrepantes na curva analítica, onde foi verificada a homocedasticidade dos níveis de concentração, enquanto o teste de Breusch-Godfrey mostrou a independência dos resíduos da regressão ( $p > 0,05$ ). As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, ou seja, são homocedásticos e independentes, foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura da curva analítica para quantificação dos analitos.

Na avaliação do efeito matriz, os resultados obtidos para as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz foram comparados com aquelas preparadas em metanol. O efeito matriz dentro do intervalo de  $\pm 20\%$  não é considerado significativo; o que foi o caso de ambos os métodos de extração, uma vez que os efeitos de matriz situa-se entre -9,01 e -3,78 para SPE e -6,12 e 3,55 para DLLME, como pode ser visto na Tabela 3.7.

Para uma avaliação de exatidão e precisão, amostras “branco” de efluentes hospitalares foram fortificadas com uma solução mistura de drogas anticâncer nas concentrações de 1,0; 2,5 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os quatro medicamentos anticâncer mostraram recuperações na faixa de 70 - 120%, para SPE e DLLME, o que confirma a exatidão de ambos os métodos propostos.

A precisão *intraday* foi igual ou inferior a 10,3% para todos os analitos nas três concentrações estudadas e a reprodutibilidade *interday* apresentou valores adequados usando DLLME ou SPE (como mostrado na Tabela 3.7). Os limites de quantificação estabelecidos foram de 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para todos os fármacos anticancer. Não existem valores limite estabelecidos pelas agências reguladoras para anticânceres em efluentes hospitalares ou amostras ambientais. Por esse motivo, os limites relatados foram os mais baixos que puderam ser alcançados por ambas as metodologias analíticas validadas.

Os resultados fornecem evidências de que o método otimizado está em conformidade com critérios aceitáveis, como consequência, permitindo uma determinação precisa de medicamentos anticancer em amostras de águas, especificamente em efluentes hospitalares.

### 3.4 CONCLUSÃO

Um novo método cromatográfico usando DLLME e SPE foi desenvolvido e validado para a quantificação de quatro drogas anticâncer em efluente hospitalar. Os resultados de validação estavam de acordo com os critérios de aceitação e apresentaram boa linearidade, seletividade, precisão e exatidão. Os métodos propostos são uma melhoria significativa em relação aos descritos anteriormente na literatura. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo de como o DLLME pode ser usado para a quantificação de drogas anticâncer em efluentes hospitalares. Além disso, possui alguns benefícios adicionais não encontrados no SPE, como simplicidade, baixo custo, alta recuperação e velocidade, além do fato de exigir baixos volumes de solventes e menor quantidade de amostras.



#### **4 OCORRÊNCIA DE DOXORRUBICINA, EPIRRUBICINA, DAUNORRUBICINA E IRINOTECANO EM EFLUENTE HOSPITALAR**

---



## 4.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos confirmando a presença de drogas anticâncer em sistemas aquáticos já foram publicados na década de 1980 (AHERNE; ENGLISH; MARKS, 1985), alguns na década de 1990 (AHERNE; HARDCASTLE; NIELD, 1990; STEGER-HARTMANN; KÜMMERER; SCHECKER, 1996) e, mais recentemente, é observado crescente interesse científico na ocorrência desses compostos no meio aquático (JOHNSON et al., 2008; NEGREIRA; DE ALDA; BARCELÓ, 2014; PARRELLA et al., 2014; LEDER; RASTOGI; KÜMMERER, 2015; ISIDORI et al., 2016; FRANQUET-GRIELL et al., 2017a; BOTTONI; CAROLI, 2018).

Estas drogas tornaram-se mais difundidas, devido ao aumento mundial da incidência de câncer (MAHNIK et al., 2007). Após a administração, alguns desses medicamentos não são totalmente metabolizados e são pouco biodegradáveis, o que significa que apresentam resistência aos processos de remoção biológica e física durante o tratamento de águas residuais (BOOKER et al., 2014). Uma vez que eles combinam propriedades toxicológicas com baixa biodegradabilidade, mesmo em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ), podem oferecer risco à saúde humana e animal (BESSE; LATOUR; GARRIC, 2012; TOOLARAM; KÜMMERER; SCHNEIDER, 2014).

As concentrações em amostras ambientais, reportadas globalmente, têm sido na faixa de concentração de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em países tais como Espanha (MARTÍN et al., 2011; NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013; PARRELLA et al., 2014; ISIDORI et al., 2016); Austria (LENZ et al., 2007); Canadá (RABII et al., 2014); China (YIN et al., 2010a); Suíça (BUERGE et al., 2006); Japão (AZUMA et al., 2015, 2016); Romênia (MOLDOVAN, 2006) e Alemanha (KÜMMERER; AL-AHMAD, 2010).

No Brasil, existem relativamente poucos estudos investigando a ocorrência de fármacos em ambientes aquáticos. Conforme estudo bibliográfico reportado recentemente (QUADRA et al., 2017), as pesquisas publicadas, focaram principalmente os seguintes aspectos: ansiolíticos, antipiréticos, estimulantes, analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antidiabéticos, betabloqueadores, diuréticos, reguladores lipídicos, hormônios, antidepressivos e medicação psiquiátrica. No entanto, nenhum desses estudos determinou a ocorrência ou a riscos associados aos medicamentos anticancerígenos em amostras ambientais no Brasil.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de compostos anticâncer selecionados em efluentes do Hospital Universitário da Universidade

Federal de Santa Maria (HUSM). Além disso, há uma discussão sobre os efeitos dos riscos ambientais causados pelos compostos medidos. Quatro agentes citotóxicos foram escolhidos para este estudo: irinotecano, doxorubicina, epirrubicina e daunorrubicina. Vários fatores foram tomados em consideração ao fazer a escolha por estes anticânceres, principalmente, os valores de consumo no HUSM e seus efeitos tóxicos e carcinogênicos. Essas drogas anticâncer selecionadas estão entre as mais utilizadas nos protocolos de quimioterapia do HUSM.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O HUSM está localizado no centro do estado do Rio Grande do Sul (latitude 29° 43'02 "S e longitude 53° 43'4,2" W), Brasil, e oferece cobertura de saúde para quase 1 milhão de habitantes. Além disso, é um hospital oncológico de referência, que atende a cerca de 25 mil pacientes todos os meses.

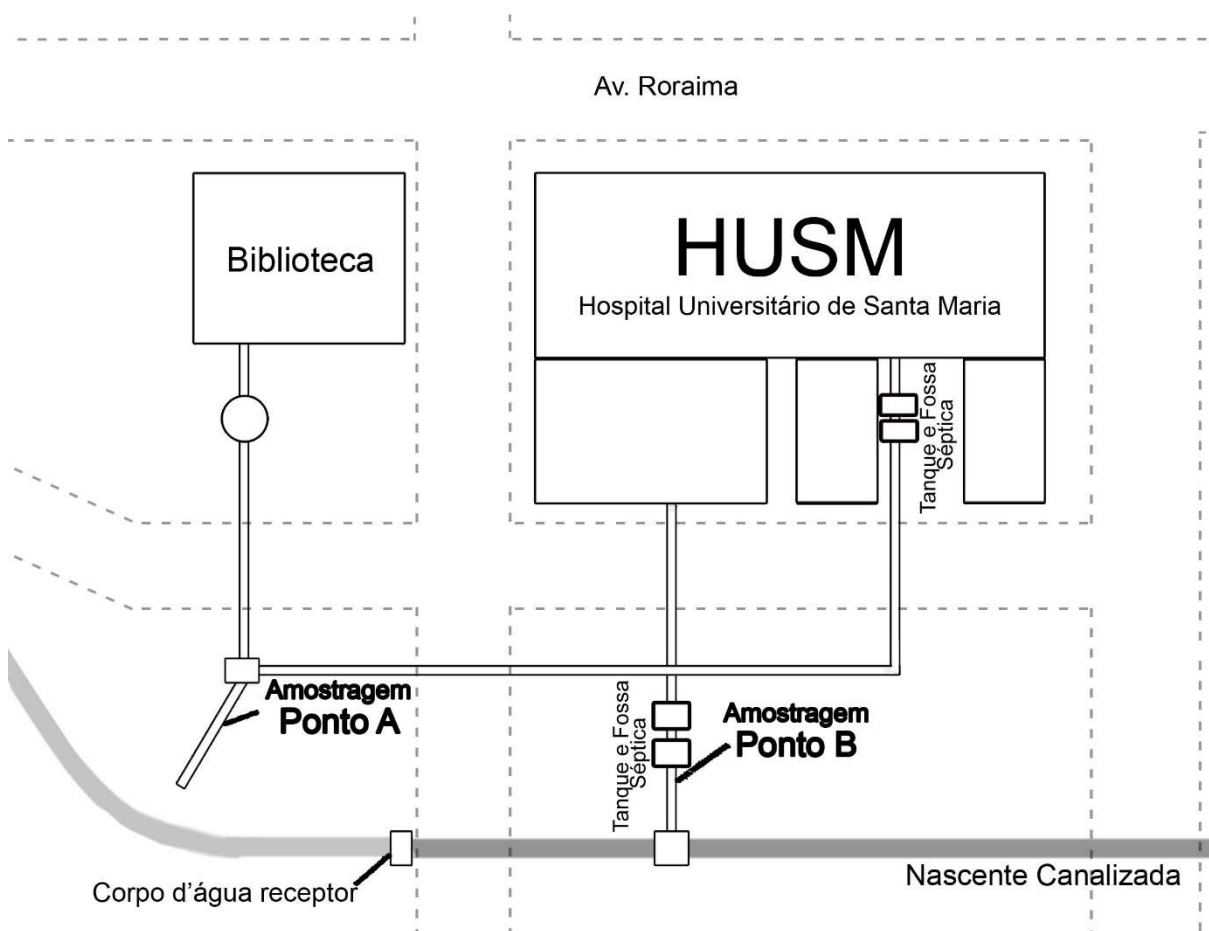
O fator-chave neste estudo foi a investigação da ocorrência diária de drogas anticâncer no efluente tratado no HUSM, durante o período de uma semana inteira. Para a determinação analítica, foi empregado o método desenvolvido e validado, descrito no Capítulo 3. A caracterização físico-química do efluente gerado pelo HUSM conta no Apêndice 1. Durante a análise, amostras de controle de qualidade (amostras "branco" fortificadas) foram avaliadas juntamente com as demais amostras de efluente hospitalar durante todo protocolo de extração com a finalidade de detectar eventuais problemas de contaminação.

O esgoto do HUSM é processado em uma planta de sistema de tratamento biológico razoavelmente elementar e, em seguida, o efluente tratado é descarregado em um curso de água (receptor). O esquema da estação de tratamento hospitalar é ilustrado na Figura 4.1. Existem duas correntes de efluente tratadas, chamadas A e B, que foram amostradas ao longo de um período de 24 h a uma taxa de uma amostra a cada 2h (12 sub-amostras), que compuseram uma amostra composta no final de cada dia. No primeiro dia da coleta, as 12 subamostras resultantes foram analisadas separadamente para obter um perfil mais preciso da ocorrência das drogas em estudo em função do tempo. No caso de todos os outros dias de amostragem, apenas a amostra composta diária foi analisada. Cada subamostra coletada foi homogeneizada,



transferida para uma garrafa âmbar mantida em caixa térmica enquanto era transportada para o laboratório; depois, foram filtrados, acidificados (pH 2,5; HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) e armazenados a 4-8°C até a análise (dentro de 24-48h). Precauções de segurança rigorosas foram tomadas devido à toxicidade das amostras. A amostragem ocorreu no período de 29 de março a 4 de abril de 2017.

Figura 4.1 - Representação esquemática do sistema de esgotos e sistema de tratamento de efluentes do HUSM.



Fonte: Elaborado pela autora

Em conformidade com as diretrizes europeias, os quocientes de risco (QRs) foram calculados pela razão entre as concentrações ambientais medidas (MECs) e a concentração sem efeito previsível (PNEC). O pior cenário foi assumido, e os MECs mais altos foram usados para os cálculos do RQ. Os valores de PNEC foram obtidos da literatura (ORIAS; PERRODIN, 2013; ENVIRONMENT CANADA, 2015; OLALLA et al., 2018).

Um valor QR inferior a 0,1 significa que não são esperados efeitos adversos e o risco é insignificante; entre 0,1 e 1,0, o risco é baixo, mas pode haver efeitos adversos. No entanto, se o valor QR estiver entre 1 e 10, há um risco moderado e os efeitos adversos são prováveis. Finalmente, um alto risco é previsto se o valor do QR calculado for maior que 10 (EUROPEAN COMMISSION, 2003; STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014; OLALLA et al., 2018).

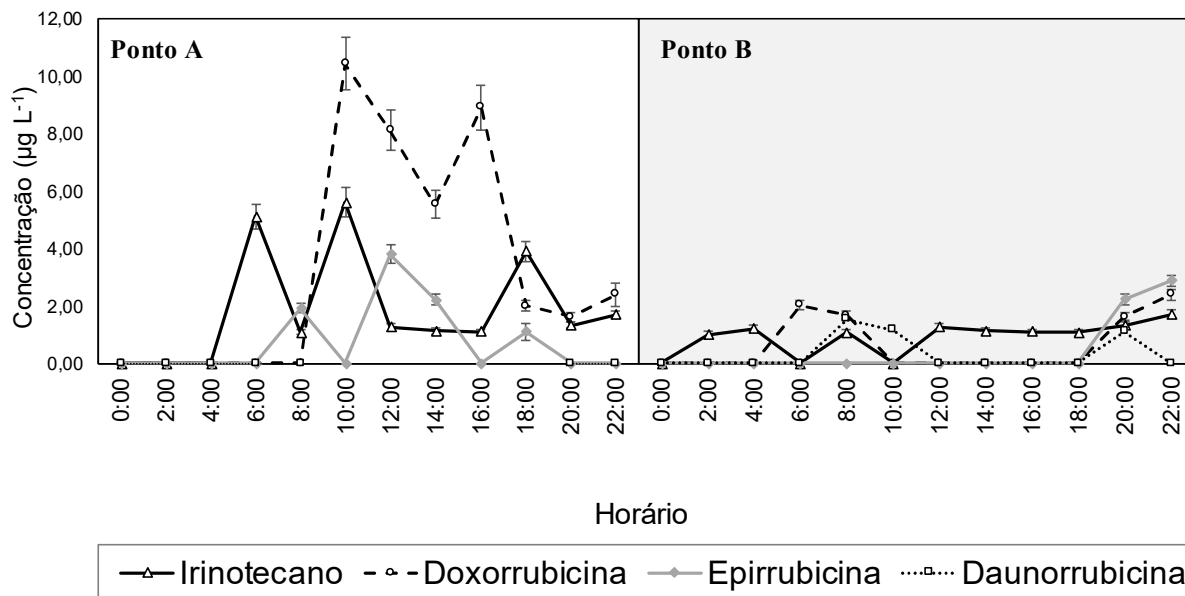
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Avaliação do perfil da ocorrência de anticânceres ao longo de um dia

Neste estudo, o efluente do HUSM foi, inicialmente, submetido a uma avaliação analítica das concentrações das drogas anticâncer, em intervalos de tempo mais curtos (a cada 2h), durante o período de um dia, com o objetivo de obter um perfil mais preciso como as concentrações variam ao longo do dia. Na Figura 4.2 constam as concentrações determinadas para os analitos nos dois pontos de amostragem.

Um perfil completamente diferente das concentrações dos compostos anticâncer foi obtido nos pontos A e no ponto B. Todas os quatro compostos foram detectados no ponto B, enquanto, a daunorrubicina não foi detectada no ponto A. De maneira geral, os resultados obtidos no ponto A mostram grandes flutuações em diferentes momentos do dia, ou seja, entre às 6h00min e às 18h00min (até 10,40  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). No ponto B, as concentrações determinadas foram, em geral, inferiores às do ponto A; e, às 10h00min, as maiores concentrações foram determinadas para 3 dos 4 anticânceres estudados (1,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 2,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,87  $\mu\text{g L}^{-1}$  para irinotecano, doxorubicina e epirrubicina, respectivamente).

Figura 4.2 – Perfil temporal da ocorrência de drogas anticâncer no efluente do HUSM durante um dia, em dois pontos de coleta. Barras de erro representam o desvio padrão das réplicas (n=3)



Fonte: Elaborado pela autora.

Em termos de frequência de detecção ao longo de um dia, o irinotecano foi a droga anticâncer mais frequentemente detectada; em nove amostras no ponto A ( $1,09 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $5,10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e em nove amostras no ponto B ( $1,07 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $1,69 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Além disso, a doxorrubicina foi quantificada em sete amostras do ponto A ( $1,60 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $10,40 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e em quatro amostras do ponto B ( $1,67 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $2,38 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A epirrubicina ocorreu em quatro amostras coletadas no ponto A ( $1,10 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $3,80 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e em duas amostras do ponto B ( $2,22 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $2,87 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Durante o dia, a droga anticâncer daunorrubicina foi determinada apenas no ponto A, em três amostras, coletadas às 8h00min ( $1,53 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 10h00min ( $1,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e às 20h00min ( $1,10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Estes resultados demonstram as flutuações das concentrações de anticâncer em seu perfil de ocorrência ao longo de um dia e os picos de concentrações que ocorreram durante o período de um único dia.

### 4.3.2 Ocorrência de drogas anticâncer em efluente hospitalar

O efluente do HUSM é submetido a tratamento microbiológico em sistema dotado de tanque séptico e filtro anaeróbio, antes de ser descarregado no curso d'água (receptor). A ineficiência do atual sistema de tratamento é claramente aparente a partir da ocorrência desses quimioterápicos no efluente tratado, o qual foi observado ao longo dos 7 dias de estudo, conforme é mostrado na Tabela 4.1.

Irinotecano foi o composto anticâncer mais amplamente detectado, foi quantificado em seis das sete amostras do Ponto A, em concentrações que variaram de  $1,39 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $3,40 \mu\text{g L}^{-1}$  (concentração média de  $2,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e em quatro de sete amostras do ponto B, na faixa de concentração de  $1,10$  a  $1,39 \mu\text{g L}^{-1}$  (valor médio de  $1,21 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A ocorrência deste composto anticâncer em efluentes hospitalares foi relatada na Espanha em 16 das 20 amostras avaliadas em níveis de até  $0,73 \mu\text{g L}^{-1}$  (GÓMEZ-CANELA et al., 2014). Em outro estudo realizado, também na Espanha, esse composto foi determinado em concentrações de  $0,042 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $0,273 \mu\text{g L}^{-1}$  (FERRE-ARACIL et al., 2016). Mais recentemente, foi reportado em efluentes de um hospital espanhol em concentrações na faixa de  $0,085 \mu\text{g L}^{-1}$  até  $0,273 \mu\text{g L}^{-1}$  (OLALLA et al., 2018). A ocorrência de irinotecano também foi reportada em amostras de esgoto da Eslovênia, em concentrações de até  $49 \text{ng L}^{-1}$  (ISIDORI et al., 2016).

A segunda droga mais importante em termos de frequência de detecção foi a doxorubicina, com ocorrência no ponto A, em seis dos sete dias de coleta, em concentrações na faixa de  $2,43 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $4,64 \mu\text{g L}^{-1}$  (valor médio de  $3,26 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e, no ponto B, em três amostras, na faixa de  $\leq\text{LOQ}$  a  $2,08 \mu\text{g L}^{-1}$  (com concentração média de  $1,87 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Esses resultados são próximos aos relatados para a doxorubicina em amostras de efluentes hospitalares de Viena (LENZ et al., 2007; MAHNIK et al., 2007) e superiores aos valores de  $4,5 \text{ng L}^{-1}$  e  $4,2 \text{ng L}^{-1}$  quantificados em amostras de efluentes na Espanha (MARTÍN et al., 2011, 2014).

Tabela 4.1 – Concentração de anticâncer  $\pm$ SD (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), determinadas no efluente hospitalar do HUSM, no período de 7 dias, empregando DLLME-HPLC-FLD.

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) $\pm$ SD							
	Irinotecano		Doxorrubicina		Epirrubicina		Daunorrubicina	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1,9 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,08	3,2 $\pm$ 0,21	<1,00	<1,00	-	-	-
2	1,44 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,11	3,08 $\pm$ 0,18	-	6,22 $\pm$ 0,43	2,67 $\pm$ 0,21	3,69 $\pm$ 0,27	1,08 $\pm$ 0,09
3	1,77 $\pm$ 0,08	-	2,96 $\pm$ 0,18	1,67 $\pm$ 0,11	-	2,27 $\pm$ 0,19	<1,00	-
4	3,40 $\pm$ 0,32	-	4,64 $\pm$ 0,37	2,08 $\pm$ 0,13	-	-	2,92 $\pm$ 0,22	<1,00
5	2,39 $\pm$ 0,20	-	3,20 $\pm$ 0,23	-	-	-	2,75 $\pm$ 0,22	-
6	-	1,20 $\pm$ 0,11	-	-	-	-	1,73 $\pm$ 0,14	-
7	1,39 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,10	2,43 $\pm$ 0,15	-	3,05 $\pm$ 0,32	-	1,60 $\pm$ 0,11	-

- Não detectado

Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, outras pesquisas não detectaram a doxorubicina em águas residuais hospitalares e municipais, nem em águas superficiais e subterrâneas (YIN et al., 2010a; NEGREIRA; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2013; RABII et al., 2014; ISIDORI et al., 2016).

O anticâncer daunorrubicina foi encontrado em seis amostras de efluente coletadas no ponto A, em concentrações na faixa de <LOQ para  $3,69 \mu\text{g L}^{-1}$  (concentração média de  $2,54 \text{ ng L}^{-1}$ ), e duas amostras de efluente do ponto B, na faixa de <LOQ para  $1,08 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este medicamento anticâncer foi relatado em concentrações de  $<0,06 \mu\text{g L}^{-1}$  em efluentes hospitalares de Viena (MAHNIK et al., 2006). Um menor número de estudos investigando a ocorrência de daunorrubicina foi encontrado e, portanto, o número de trabalhos que tem detectado e reportado a ocorrência deste composto em amostras ambientais têm sido inferior comparado aos demais anticânceres alvo desse estudo.

Em relação a epirrubicina, embora tenha sido o composto menos detectado, apresentou maior concentração. Cinco amostras foram positivas para epirrubicina, três amostras do Ponto A (<LOQ;  $3,05 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $6,22 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e duas amostras do Ponto B ( $2,27 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,67 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Mahnik et al. também encontraram concentrações de epirrubicina na faixa de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$  em efluente hospitalar (Mahnik et al., 2006), que eram concentrações ligeiramente inferiores às medidas neste estudo no efluente do HUSM. Na Espanha, foram determinadas concentrações de  $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$  de epirrubicina em efluentes hospitalares (GÓMEZ-CANELA et al., 2014), inferiores aos encontrados no presente estudo, bem como concentrações superiores, até  $24,8 \mu\text{g L}^{-1}$  em efluentes urbanos (GÓMEZ-CANELA et al., 2012). O irinotecano foi investigado e não foi detectado em um estudo canadense de efluentes municipais (RABII et al., 2014).

De acordo com pesquisas prévias, esse é o primeiro estudo que fornece dados sobre a ocorrência de doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina e irinotecano em amostras ambientais brasileiras, particularmente de efluente hospitalar.

As concentrações de quimioterápicos encontradas no ambiente aquático de vários países diferem, principalmente por causa de: i) número variável de pacientes que necessitam de tratamento, ii) quantidade variável da droga administrada e, iii) clima e quantidade de água consumida (RABII et al., 2014).

Mesmo em baixas concentrações, há uma considerável preocupação com as drogas anticâncer, uma vez que elas interferem na estrutura e funções do DNA. Assim,

todos os organismos vivos são suscetíveis a sua toxicidade (BIAŁK-BIELIŃSKA et al., 2017). De fato, a doxorubicina e a daunorrubicina são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como provavelmente carcinogênicas (Grupo 2A) e possivelmente carcinogênicas (Grupo 2B) para humanos (IARC, 1990), respectivamente.

A ocorrência de drogas anticâncer é indicativo de que o tratamento adotado para o efluente gerado pelo HUSM não é adequado para a degradação deste tipo de composto. Vale a pena notar que, em geral, as estações de tratamentos dos hospitais brasileiros são projetadas, em um primeiro momento, para reduzir a carga orgânica. Além disso, atualmente não há regulamentos nacionais relativos à presença de produtos farmacêuticos no meio aquático.

### **4.3.3 Avaliação preliminar de riscos ambientais**

Como mencionado anteriormente, a avaliação de risco foi realizada de acordo com as diretrizes estabelecidas pela União Europeia. Dois fatores devem ser examinados antes de realizar uma avaliação de risco ambiental, i) a concentração da droga no ambiente, e ii) a menor concentração da droga que pode ter um efeito adverso sobre a vida silvestre, neste caso, o valor da PNEC.

A Tabela 2.1, lista os QRs calculados para cada medicamento anticâncer. Nos pontos A e B, todos os analitos exibem  $QR > 10$ , o que representa um alto risco para organismos aquáticos e ecossistemas. Estes riscos ecotoxicológicos devem ser considerados como uma indicação de um risco potencial para o ambiente, devido à disponibilidade reduzida de dados experimentais de toxicidade e às características particulares das amostras investigadas.

Negreira et al. calculou os QRs de doxorubicina e irinotecano em águas residuais municipais e hospitalares na Espanha e os valores reportados não representaram um risco ecológico ( $QR < 1$ ) (NEGREIRA; DE ALDA; BARCELÓ, 2014). Em 2018, no mesmo grupo de pesquisa, em investigação semelhante, dois anticânceres deste estudo foram quantificados em águas residuais em concentrações que representaram risco ambiental insignificante para as concentrações de doxorubicina e elevado risco ambiental para as concentrações de irinotecano (OLALLA et al., 2018). Martin et al. relataram níveis médios de risco para as

concentrações de doxorubicina e baixos níveis de risco para as concentrações de epirrubicina e irinotecano (MARTÍN et al., 2014).

Tabela 4.2 - Quociente de Risco e índice PBT para cada anticâncer em estudo

Anticâncer	MEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		PNEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Literatura	Quociente de Risco		PBT			Referências
	Ponto A	Ponto B		Ponto A	Ponto B	P	B	T	
	Doxorubicina	4,64	2,08	0,01	464,0	208,0	3	0	
Epirrubicina	6,22	2,67	0,355	17,5	7,5	2	1	3	(ORIAS; PERRODIN, 2013) (SANGION; GRAMATICA, 2016)
Daunorubicina	3,69	1,08	$4,9 \times 10^{-4}$	7530,6	2204,1	2	1	3	(ENVIRONMENT CANADA, 2015) (SANGION; GRAMATICA, 2016)
Irinotecano	3,4	1,39	0,023	147,8	60,4	3	0	3	(OLALLA et al., 2018)

Abreviaturas: MEC, Concentração ambiental medida; PNEC, Concentração sem efeito previsível; PBT, Persistencia, Bioacumulação e toxicidade.

Além disso, a capacidade de bioacumulação de alguns compostos pode resultar em um maior grau de ecotoxicidade e, dada a descarga contínua, isto é, de agentes anticancerígenos em águas residuais de efluentes - embora não constituindo um risco a princípio - eles podem eventualmente tornar-se extremamente perigosos (OLALLA et al., 2018).

A avaliação PBT verifica o potencial de um fármaco ser persistente, bioacumulativo e tóxico ao mesmo tempo. Eles podem resistir à degradação biótica/abiótica e persistir inalterados por muito tempo; eles também podem interagir com humanos e animais selvagens, acumulando-se em organismos vivos e tendo efeitos tóxicos.

As estimativas foram extraídas de índices na literatura para definir os riscos ambientais associados em termos do PBT (como mostrado na Tabela 4.2). No caso do irinotecano e da doxorubicina, o risco pode ser atribuído a sua persistência e toxicidade, uma vez que nenhum deles tende a se bioacumular. Epirrubicina e daunorubicina demonstraram alta toxicidade (valor PBT 3).



Vale a pena notar que o PBT é previsto como "persistente e tóxico" para os quatro medicamentos anticâncer, embora nenhum deles seja identificado como bioacumulativo. Este resultado era esperado para os três fármacos da classe das antraciclinas, devido aos seus valores  $\log K_{ow}$ . Irinotecano tem um  $K_{ow}$  superior a três, o que é um indicador do seu potencial de bioacumulação.

No documento elaborado pela Agência Europeia dos Produtos Químicos, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina e irinotecano são suspeitos de carcinogenicidade e mutagenicidade, que são perigosos para o meio aquático e ambientalmente persistentes. Além disso, as três antraciclinas estudadas são suspeitas de serem sensibilizantes respiratórios e terem toxicidade reprodutiva; e, irinotecano, como sensibilizador da pele (ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2016).

Deve também ser notado que os fármacos anticâncer não são liberados no ambiente como compostos isolados, mas, como misturas complexas de compostos inalterados, produtos de degradação e seus metabólitos. Apesar de suas baixas concentrações, quando presentes em misturas, elas podem afetar organismos em concentrações muito mais baixas do que quando esses organismos são expostos a um único composto (NOVAK et al., 2017).

#### 4.4 CONCLUSÕES

Das quatorze amostras coletadas do efluente gerado pelo HUSM ao longo de uma semana, 13 amostras apresentaram pelo menos traços de um dos quatro analitos, o que confirma que o atual sistema de tratamento de efluentes adotado pelo hospital não é eficiente para degradação desses compostos.

A avaliação preliminar do risco indicou que as concentrações determinadas das quatro drogas anticâncer no efluente do HUSM representam risco ecotoxicológico elevado. No entanto, essa afirmação deve ser corroborada pela realização de testes bioanalíticos confirmatórios. Isso ocorre porque a co-ocorrência de diferentes drogas anticâncer e muitos outros produtos farmacêuticos tornam possível prever efeitos tóxicos ainda maiores como resultado de interações sinérgicas.

Antes de chegar a uma conclusão definitiva, mais pesquisas são necessárias para saber se as concentrações médias quantificadas de drogas anticâncer refletiram realmente as concentrações usuais ou se foram apenas ocorrências ocasionais. No entanto, isso estava além do escopo deste estudo.

## **5 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS ANTICÂNCER POR FOTÓLISE E OZONIZAÇÃO**

---



## 5.1 INTRODUÇÃO

Sistemas de tratamento de águas residuais, que usam processos microbiológicos, têm sido utilizados extensivamente em todo o mundo, principalmente porque produzem efluentes que atendem aos padrões de qualidade exigidos, a custos de operação e manutenção razoáveis (JELIĆ et al., 2012). Contudo, a ineficácia deste tipo de tratamento para remoção/mineralização de drogas anticâncer, têm sido reportada por vários autores (BUERGE et al., 2006; YIN et al., 2010b; FERRANDO-CLIMENT; RODRIGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2014; GHAFURI et al., 2018)

Do ponto de vista ambiental e de saúde humana, uma etapa antecedente/subsequente às estações de tratamento deste tipo de efluente, objetivando a remoção de contaminantes, tais como fármacos, seria uma alternativa para limitar/minimizar a contínua descarga. A pesquisa e desenvolvimento sobre a aplicação dos processos avançados de oxidação (PAOs) para a remoção de contaminantes tem sido intensa por duas razões, em primeiro lugar, a tecnologia diversificada envolvida e, em segundo lugar, muitas áreas de aplicação potencial. O alto poder de oxidação dos PAOs tem sido usado na ampla gama de aplicações, incluindo o tratamento de águas residuais contaminadas por produtos farmacêuticos tais como antibióticos, beta-bloqueadores, antiinflamatórios não estereoidais, antidepressivos, antiepilépticos, drogas ilícitas, etc. Em estudo conduzidos por Gros et al. o nível de degradação relatado variou entre 40 e 99% (GROS et al., 2010).

A remoção de contaminantes por PAOs depende da geração de espécies altamente oxidantes, tais como (principalmente, mas não exclusivamente) o radical hidroxil HO•, que tem um alto potencial de oxidação ( $E^0 = 2,8 \text{ V}$ ). Os radicais HO• reagem com contaminantes, levando à decomposição ou mineralização da matéria orgânica a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e íons inorgânicos eletrofílicos (KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009).

Dentre os PAOs, a ozonização apresenta-se como método atraente para remoção de um amplo espectro de microcontaminantes (FITZKE; GEISSEN, 2007; BROSEÚS et al., 2009). Há duas rotas de reação comuns para degradar os contaminantes orgânicos pelo tratamento com ozônio: reação direta com o ozônio molecular e reação indireta com radicais livres, principalmente radicais HO•, gerados pela decomposição do ozônio. Em geral, o ozônio molecular reage seletivamente com

ligações insaturadas, grupos aromáticos e amino. Os radicais hidroxila são oxidantes altamente reativos e não seletivos, embora sua concentração seja menor que a do ozônio e sejam facilmente removidos pelo meio. Sua geração pode ser promovida aumentando o pH, adicionando peróxido de hidrogênio ao meio reacional, aplicando radiação UV ou usando catalisadores sólidos (KOVALOVA et al., 2013). A via dominante envolvida num processo específico, depende largamente das características da matriz específica (isto é, pH, alcalinidade, potencial redox, matérias orgânicas). Além disso, as matérias orgânicas dissolvidas podem atuar como removedores de HO•, o que pode diminuir significativamente a eficiência do tratamento com ozônio (KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009).

Um número crescente de estudos têm demonstrado a eficácia da remoção de drogas anticâncer via ozonização. Garcia-Ac et al. (GARCIA-AC et al., 2010) mostraram que o anticâncer metotrexato pode ser removido de forma rápida e eficaz da água potável por ozonização, enquanto a remoção de ciclofosfamida precisa de uma dosagem de ozônio muito maior e de um tempo de contato mais longo. Em contraposição, outros estudos demonstraram que o ozônio só pode degradar parcialmente compostos farmacêuticos recalcitrantes sem mineralização completa, quando na presença de urina (ESCHER et al., 2006; DODD et al., 2008).

Ferre-Aracil et al. (FERRE-ARACIL et al., 2016) mostraram que a ozonização foi economicamente viável como processo de tratamento para a degradação de quatro compostos anticâncer (ifosfamida, ciclofosfamida, irinotecano e capecitabina). Diversos estudos têm aplicado a ozonização para decomposição de drogas anticâncer, incluindo clorambucila, ciclofosfamida, dacarbazina, flutamida, ifosfamida, tamoxifeno e metotrexato, em efluente doméstico (KOVALOVA et al., 2013); ciclofosfamida e ifosfamida em efluente hospitalar (ČESEN et al., 2015); cisplatina, ciclofosfamida e metotrexato em água potável (HERNÁNDEZ et al., 2008).

Destacam-se também os processos fotoquímicos para a degradação de contaminantes, no qual a fotólise por UV tem sido empregada como um processo alternativo de tratamento de água para a desinfecção de patógenos, por sua relação custo-benefício e pela sua compatibilidade com o meio ambiente. A tecnologia UV não requer adição de produtos químicos ao processo (BOLTON; STEFAN, 2002).

Na presença de irradiação UV, alguns compostos químicos sofrem transformação fotoquímica como resultado da absorção direta de fótons. Além disso, as moléculas de água podem se dividir sob irradiação em radicais hidroxila reativos,

que podem reagir com compostos orgânicos (fotólise indireta) (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007).

A fotólise não influencia aspectos tais como por exemplo, sabor e odor da água tratada, em comparação com outros processos tais como cloração. Adicionalmente, a fotólise pode ser empregada em conjunto a poderosos oxidantes químicos, como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , persulfato ( $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ),  $\text{O}_3$ , catálise com  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{TiO}_2$ , resultando em vários tipos importantes de PAOs fotoquímicos (BOLTON; STEFAN, 2002).

A eficiência da fotólise depende das condições de irradiação UV (a fonte e potência da luz), dos compostos orgânicos-alvo e da composição química da matriz aquosa. Com relação aos compostos anticâncer, resultados reportados na literatura, indicam que medicamentos ciclofosfamida e ifosfamida são fotoliticamente estáveis independentemente das condições de pH. No entanto, ambos os fármacos podem ser decompostos em intermediários por fotólise indireta mediada por nitratos ou carbonatos (BUERGE et al., 2006; WOLS et al., 2013; LAI; LIN; LIN, 2015). O estudo da degradação do fármaco quimioterápico citarabina, demonstrou que o processo de fotólise foi inadequado para degradar este composto, tendo em vista sua baixa eficiência (OCAMPO-PÉREZ et al., 2010) Os estudos supracitados mostraram que os radicais  $\text{HO}\cdot$  são os principais oxidantes para ciclofosfamida, ifosfamida e citarabina durante a degradação fotoquímica.

Em contraste com os fármacos supramencionados, o anticâncer 5-fluoracila é suscetível à fotólise, com uma meia-vida do processo de  $56 \pm 11$  h. O estudo conduzido por Lai et al. (LAI; LIN; LIN, 2015) demonstrou que o bicarbonato, o nitrato e o ácido fúlvico reagem com os estados excitados do 5-fluoracila e, assim, aumentam as taxas de fotólise. O tipo de fonte de radiação também influencia o processo, conforme demonstrado em trabalho por Lutterbeck et al. (LUTTERBECK et al., 2016). Os autores verificaram a degradação do 5-fluoracila após 32 min sob uma lâmpada de mercúrio de média pressão, enquanto sob uma lâmpada Xe (simulando luz solar) foi apenas parcialmente degradado (32,2%) após 256 min.

A fotólise de drogas citostáticas têm sido caracterizada por uma taxa de remoção relativamente alta, com relação ao composto original. Outras drogas anticâncer, como a dacarbazina (BAHRPEYMA; HEMMATEENEJAD; JAVIDNIA, 2016), doxorubicina (NAWARA; KRYSINSKI; BLANCHARD, 2012) e capecitabina (GUO; ZHENG; CHEN, 2015), foram decompostas em vários subprodutos. Além

disso, em alguns casos, os produtos de transformação eram possivelmente mais tóxicos do que o composto original correspondente (GUO; ZHENG; CHEN, 2015).

Há um crescente interesse no estudo da degradação de compostos anticâncer, e os compostos ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato e 5-fluoracila têm sido os compostos mais investigados (nesta ordem). Porém, o escopo de estudo deve ser ampliados a investigação de um número maior de medicamentos anticâncer.

Têm-se como objetivo estudar a degradação de quatro drogas anticâncer, sendo elas, doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina e irinotecano, empregando os processos de fotólise e ozonização, na matriz efluente hospitalar.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foram estabelecidas as condições para o sistema cromatográfico LC-ESI-MS para a quantificação dos quatro analitos anticâncer, alvos deste estudo. Utilizou-se um cromatógrafo a líquido, sistema LC (Shimadzu, Kyoto, Japão, modelo Prominence) constituído por: bomba binária LC-20AD, degaseificador DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, detector por espectrometria de massas e módulo comunicador CBM-20<sup>a</sup>. Os cromatogramas foram adquiridos e analisados pelo Software LC-Solution.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C18 (100 mm × 2,1 mm, 2,6 µm) (Kinetex, Phenomenex) que foi mantida a 35 °C. A fase móvel consistiu de água ultrapura (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. O programa de gradiente da fase móvel foi iniciado em 15% do eluente B até 1,5 min e em seguida, foi diretamente levado a 30% em 5,5 min, e em 90% a 10 min. Na sequência, diminuiu-se para 15% do eluente A até 12 min. Esta é a condição inicial da fase móvel e foi mantida constante para que a coluna fosse reequilibrada, até o final da corrida cromatográfica em 15 min. O fluxo de fase móvel foi ajustado para 0,4 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 10 µL.

O espectrômetro de massa equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI), operando em modo positivo e monitoramento seletivo de íons foi selecionado para a detecção dos compostos anticâncer selecionados para este estudo. A razão massa/carga (*m/z*) para doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina e irinotecano



foram 544, 544, 528 e 587, respectivamente. As condições operacionais do MS foram otimizadas da seguinte maneira: vazão do gás nebulizador  $1,5 \text{ L min}^{-1}$ , temperatura CDL  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura do bloco  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , vazão do gás de secagem  $10 \text{ L min}^{-1}$ , tensão do detetor  $1,50 \text{ kV}$ . A aquisição e o processamento dos dados foram realizados com o auxílio de uma versão da solução Shimadzu LC-MS para o sistema LC-MS-2020. O método previamente validado apresentou coeficientes de determinação superiores a 0,999 e limite de quantificação foi de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os parâmetros necessários para avaliar a confiabilidade analítica dos resultados e garantir a qualidade dos experimentos foram obtidos com sucesso, de acordo com o guia de controle de qualidade analítica e procedimento de validação de métodos SANTE e em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela norma ISO/IEC 17025.

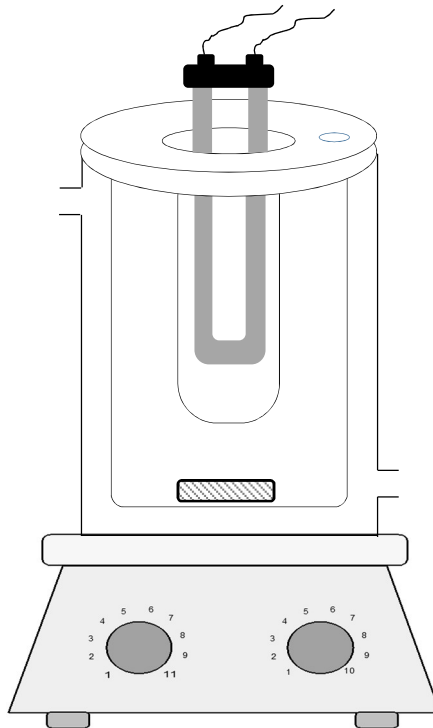
Com relação as amostras de efluentes hospitalar, teve-se o HUSM como campo de estudo. O esgoto deste hospital é processado em uma planta de sistema de tratamento biológico razoavelmente elementar e, em seguida, o efluente tratado é descarregado em um curso de água. As coletas das amostras foram efetuadas logo após o tratamento. A amostragem foi efetuada por compostagem. Cada subamostra coletada foi homogeneizada, transferida para um frasco âmbar mantida em caixa térmica para ser transportada para o laboratório; depois, foram filtrados, acidificados ( $\text{pH } 2,5$ ;  $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e armazenados a  $4\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$  sendo que as coletas foram efetuadas sempre num período de  $24\text{-}48 \text{ h}$  anterior ao uso. Precauções de segurança rigorosas foram tomadas devido à toxicidade das amostras. Antes da aplicação dos processos avançados de oxidação, O pH das amostras de efluente hospitalar foi ajustado utilizando NaOH ou HCl, estas foram, fortificadas na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para cada analito avaliado. Efetuou-se a avaliação da degradação de cada analito de forma individual.

### 5.2.1 Processos de degradação por ozonização e fotólise

Para a degradação fotolítica, empregou-se reator de bancada tipo tanque agitado (*home made*) com jaqueta termostática, em batelada, sendo a parte interna em vidro e o material externo em aço inoxidável, a fim de evitar a dispersão da luz UV. A radiação ultravioleta foi gerada por lâmpada de baixa pressão UV-C com  $13 \text{ W}$  de potência e  $35 \mu\text{W cm}^{-2}$  de intensidade (Bravoluz), emissão em  $254 \text{ nm}$ , a qual estava

protegida por tubo de quartzo de imersão. Fez-se o controle de temperatura ( $20 \pm 2$  °C) por meio de sistema de arrefecimento com circulação de água e a agitação da solução com auxílio de agitador magnético. A degradação de cada um dos analitos foi avaliada em três distintos pH da amostra de efluente hospitalar (5, 7 e 9), e as reações fotoquímicas foram executadas por 60 minutos, sendo que alíquotas de 500  $\mu\text{L}$ , foram tomadas nos tempos, 0 (antes da irradiação), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos e estas foram analisadas por LC-MS.

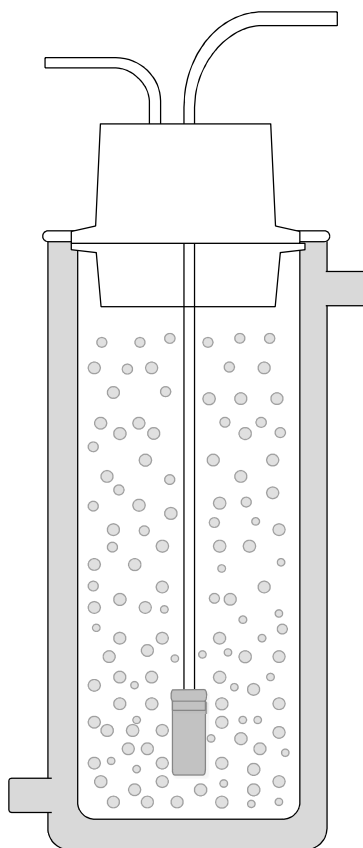
Figura 5.1 – Representação esquemática do fotorreator empregado para os experimentos de fotólise.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os experimentos para degradação via ozonização foram conduzidos em reator de microdispersão de bolhas em batelada, acoplado a gerador de ozônio da marca Ozonebras (São José dos Campos, Brasil), com tecnologia de efeito corona, utilizando ar seco e com produção média de  $1,5 \text{ g h}^{-1}$  de  $\text{O}_3$ , com alimentação de ar seco (Figura 5.2)

Figura 5.2 - Representação esquemática do reator empregado para os experimentos de ozonização.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a avaliação da degradação dos analitos efetuou-se a avaliação do pH da solução submetida a ozonização. Os valores de pH da amostra de efluente hospitalar avaliados foram 5, 7 e 9. No decorrer de 60 min de ozonização foram retiradas alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  nos tempos 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 e 60 min, as quais foram avaliadas quanto à degradação dos fármacos anticâncer em estudo empregando LC-MS.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Degradação via fotólise

O estado de protonação causa alterações no espectro de absorção e/ou outras características fotoquímicas destes compostos, desta forma, o pH pode influenciar a degradação de compostos anticâncer (CARLSON et al., 2015). Considerando este fato, estudou-se a degradação dos quatro compostos anticâncer em condições ácida, neutra e básica. A Figura 5.3 compara os resultados de degradação para os quatro compostos anticâncer, quando se ajustou o pH inicial das amostras de efluente hospitalar em 5, 7 e 9. Os resultados de degradação após uma hora de fotólise mostraram que nenhum dos compostos foi totalmente removido nas condições estudadas.

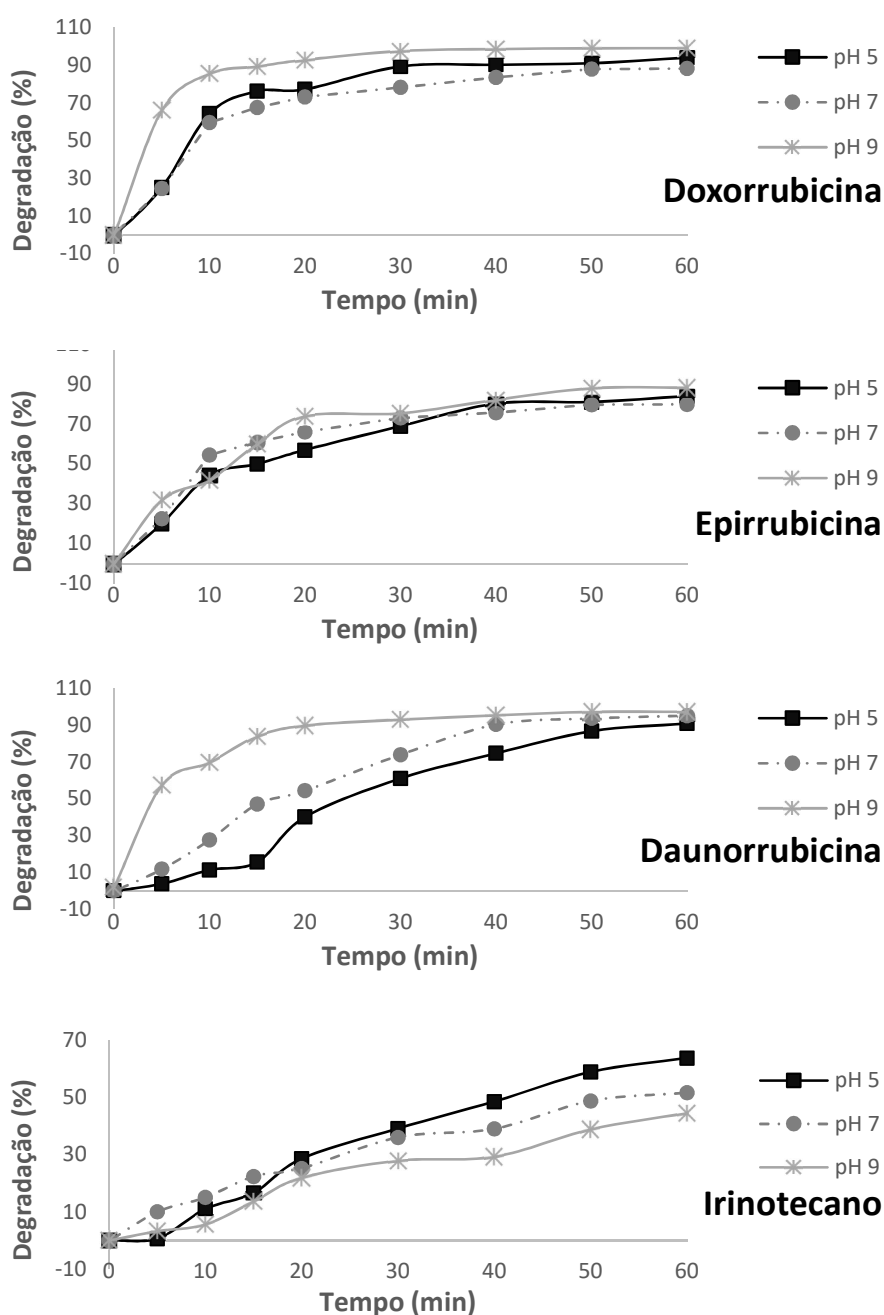
A doxorubicina, daunorrubicina e epirrubicina apresentaram degradação de 97,3%, 88,3%, 99,0%, respectivamente, quando o pH da amostra foi inicialmente ajustado em 9. Nesta condição a degradação foi ligeiramente superior quando comparada ao ajuste do pH da amostra em 5 e 7. Dentre estes três compostos, a daunorrubicina foi a que apresentou maior influência na taxa de degradação em virtude das alterações de pH. O anticâncer irinotecano apresentou degradação de 44,56% em pH 9; 51,66% em pH 7 e 63,81% em pH 5. Todos esses compostos possuem fragmentos aromáticos que explicam a absorbância da luz UV, e conseqüentemente o que justifica sua degradação via fotólise.

Franquet-Griell e colaboradores (FRANQUET-GRIELL et al., 2017b) estudaram a degradação de 16 fármacos anticâncer, incluindo doxorubicina, daunorrubicina e irinotecano em água tipo mili-Q. Os autores obtiveram resultados que indicam a instabilidade destes compostos neste meio, sendo que 90% destes foram removidos apenas por hidrólise, enquanto os anticânceres melfalano, prednisona e etoposídeo foram completamente removidos sob radiação UV (254 nm). Já após os 90 minutos de irradiação, ciclofosfamida, ifosfamida, gencitabina, capecitabina, ácido micofenólico e megestrol não puderam ser completamente removidos.

Como relação a doxorubicina, Nawara et al. (NAWARA; KRYSINSKI; BLANCHARD, 2012) explica que este composto exibe fotorreatividade incomum em soluções aquosas. Os dados obtidos pelos autores mostram que existem duas vias

fotorreativas distintas para a doxorrubicina. Um deles é um processo de duas etapas que leva à formação do ácido 3-metoxissalicílico, um produto de degradação estável. A outra via é uma fotorredução da doxorrubicina para formar a di-hidroquinona correspondente, que sofre oxidação espontânea mediada por oxigênio dissolvido para recuperar a doxorrubicina com a formação de peróxido de hidrogênio.

Figura 5.3 – Gráficos de degradação por fotólise dos compostos anticâncer com amostra em pH 5, 7 e 9.



Fonte: Elaborado pela autora, com uso do Microsoft excel.

Calza et al. (CALZA et al., 2014) publicaram dados referentes à degradação de doxorubicina em água utilizando fotólise e fotocátalise. Diferentemente dos dados obtidos neste estudo com efluente hospitalar, no processo de fotólise em água ultrapura, foi promovido uma degradação parcial dentro de 1 h de irradiação, apenas 10% da doxorubicina foi degradada. Tal diferença pode ser explicado com base nas diferenças de modelos de reator utilizados. Os autores reportaram a utilização de um sistema de reação em uma célula de vidro com capacidade de 5 mL e emprego de uma lâmpada de 40 W com emissão em 360 nm. Enquanto o modelo de reator utilizado no presente trabalho, possui maior capacidade de amostra e a lâmpada fica submersa no mesmo, no qual o efluente fica em maior contato possível com a fonte de radiação UV, sendo esta de 13 W com emissão em comprimento de onda mais energético (254 nm). Por outro lado, os autores reportam que a fotocátalise demonstrou maior eficiência na degradação, sendo este degradado em 100% após 30 minutos de reação. Foi determinado uma série de produtos de degradação da doxorubicina, principalmente resultantes da (poli) hidroxilação ou da oxidação da molécula. Além disso, três produtos se originaram do descolamento da porção de glicosídica.

A fotólise de fármacos anticâncer têm sido caracterizada na literatura por uma taxa de remoção relativamente elevada do composto original mas por outro lado, tem apresentado baixo grau de mineralização (GUO; ZHENG; CHEN, 2015; BAHREPEYMA; HEMMATEENEJAD; JAVIDNIA, 2016; LUTTERBECK et al., 2016).

Com relação ao anticâncer irinotecano, foi o composto que apresentou maior resistência a fotólise, com menor eficiência de degradação em pH 9 (44,6%), sendo degradado em até 63,8% em pH 5, apresentando nesta condição, maior suscetibilidade a fotólise. Em estudo conduzido por Franquet-Griell et al. (FRANQUET-GRIELL et al., 2017b), resultados similares para degradação de irinotecano foram observados, o que corrobora com este estudo. Os autores puderam observar a completa degradação quando foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao sistema.

Para avaliar a cinética da fotodegradação dos quatro compostos anticâncer, foi utilizada a seguinte relação (Equação 1, 2 e 3):

$$-\frac{d[C]}{dt} = K_1 [HO\bullet][C] \quad \text{Equação 1}$$

$$K_1 [HO\bullet] = K_{obs} \quad \text{Equação 2}$$

$$-\frac{d[C]}{dt} = K_{obs} [C] \quad \text{Equação 3}$$

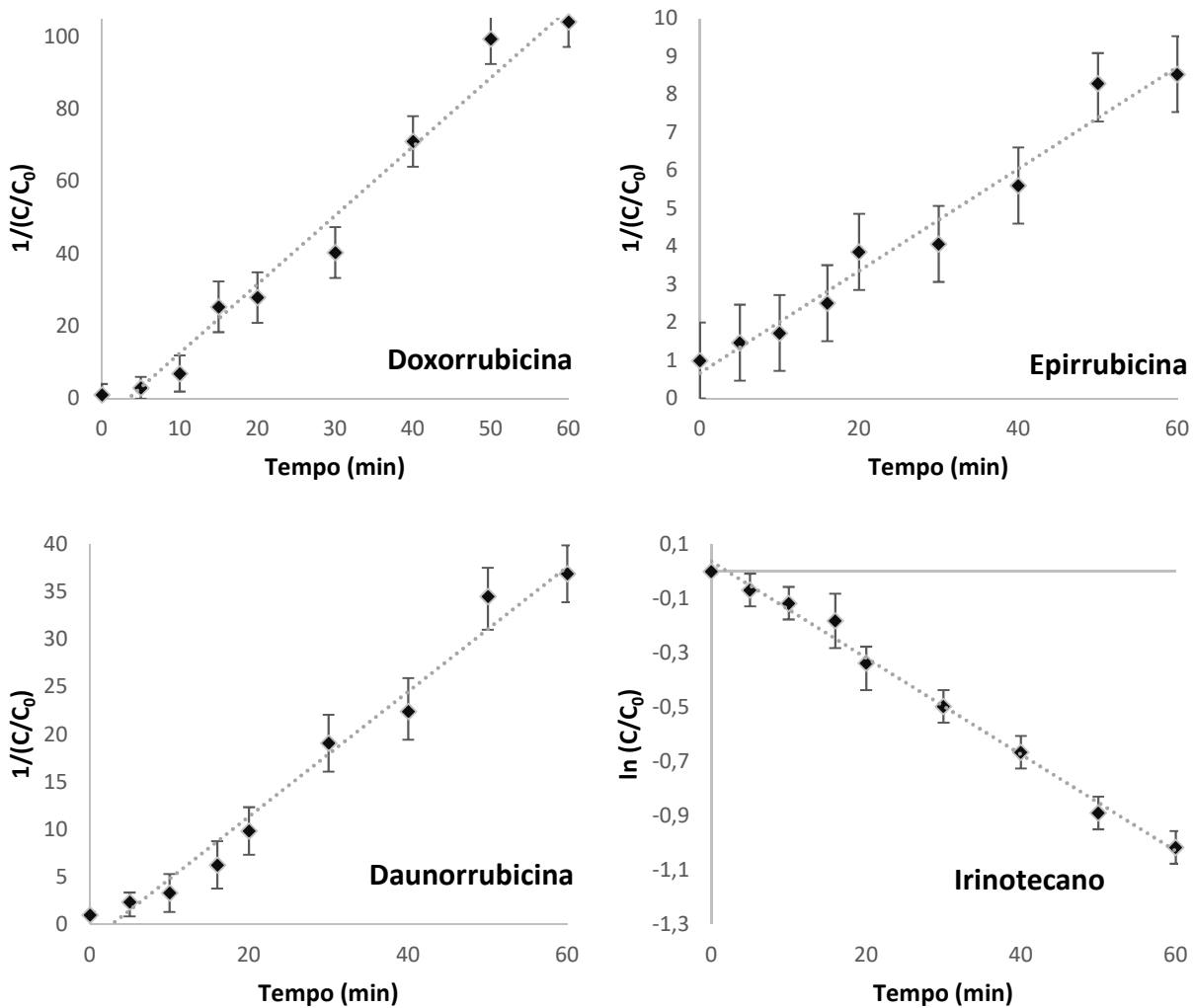
O processo de fotólise foi modelado com uma cinética de pseudo-segunda ordem com relação as concentrações de doxorubicina, epirrubicina e daunorrubicina, e pseudo-primeira ordem com relação as concentrações de irinotecano, pois se ajusta adequadamente a diminuição da concentração durante o processo fotolítico. Para reações de segunda ordem, a determinação da constante de velocidade pode ser realizada a partir da avaliação de  $1/[C]$  versus tempo, quando deve ser observada a linearidade da curva e a inclinação igual a constante cinética observada ( $K_{obs}$ ). Os dados cinéticos obtidos constam na Tabela 5.1. Conforme evidencia-se, a epirrubicina apresenta a menor constante de velocidade e conseqüentemente o maior tempo de meia vida para a degradação via fotólise, com processo cinético aparente de segunda ordem, enquanto a daunorrubicina apresentou o menor tempo de meia vida. Nos processos de segunda ordem, o tempo de meia vida tem dependência da concentração inicial do composto, o qual neste caso, usou-se as maiores concentrações determinadas no efluente do HUSM e reportadas no capítulo 3 deste trabalho.

Tabela 5.1 – Dados obtidos pelo processo de degradação via fotólise quanto a ordem de reação, constante cinética observada ( $K$ ), tempo de meia vida e ajuste ao modelo ( $R^2$ ).

Analito	Ordem	$K_{obs}$	$t_{1/2}$ (min)	$R^2$
Epirrubicina	pseudo-segunda	0,0035 L $\mu\text{g}^{-1}$ min $^{-1}$	45,93	0,9688
Daunorrubicina	pseudo-segunda	0,0764 L $\mu\text{g}^{-1}$ min $^{-1}$	3,55	0,9752
Doxorrubicina	pseudo-segunda	0,0609 L $\mu\text{g}^{-1}$ min $^{-1}$	4,45	0,9731
Irinotecano	pseudo-primeira	0,0181 min $^{-1}$	38,30	0,9922

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.4 – Cinética de reação para degradação de anticâncer por fotólise em efluente hospitalar



Fonte: Elaborado pela autora, com uso do Microsoft excel.

O composto irinotecano foi o único dos quatro estudados que apresentou cinética aparente de primeira ordem. Neste caso, o tempo de meia vida foi de  $0,0181 \text{ min}^{-1}$  e o tempo de meia vida de 38,30 min, o qual é independente das concentrações nas quais os compostos contaminantes estão presentes, neste caso, o irinotecano.

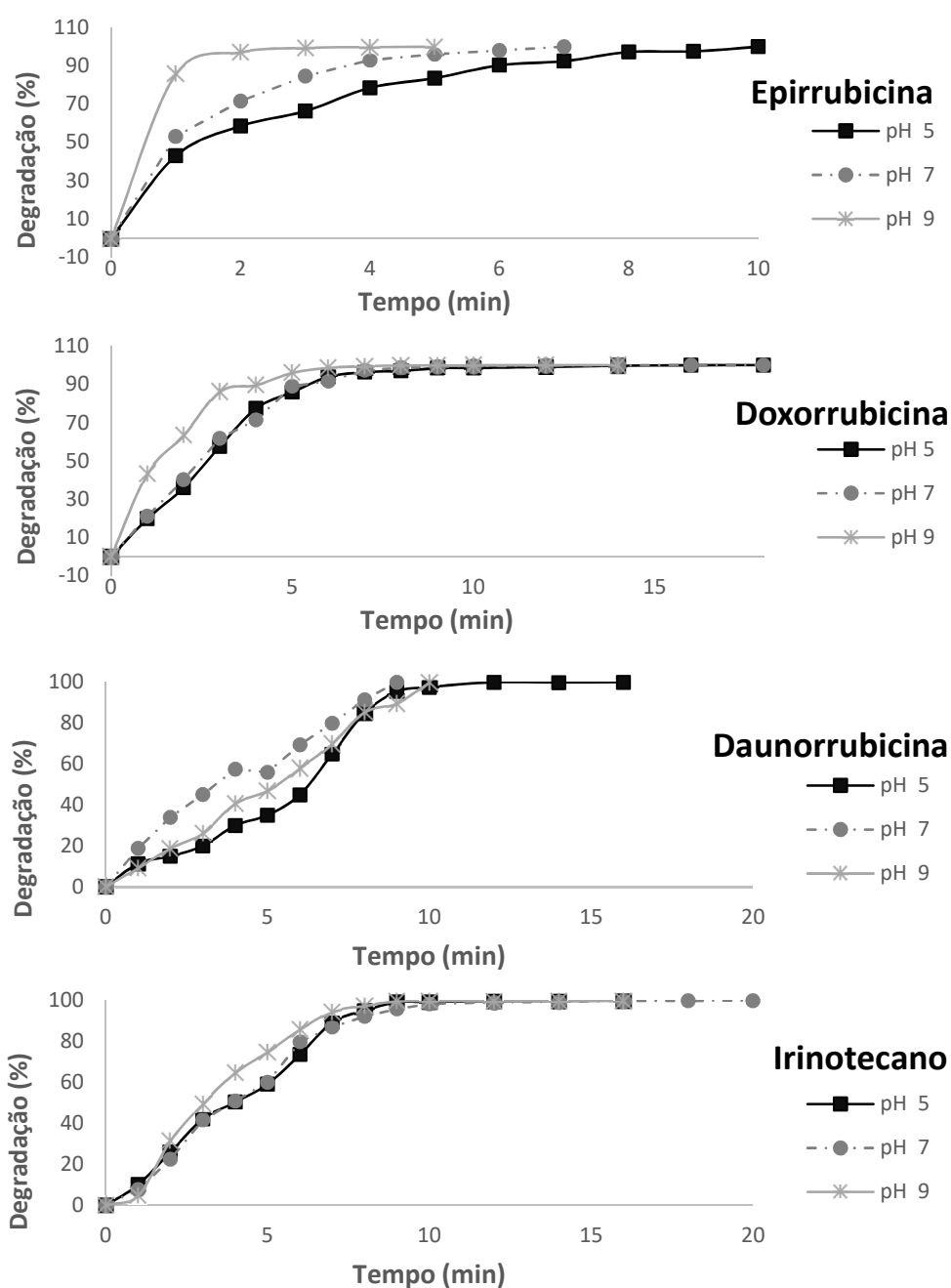
Destaca-se ainda, que em sistema de segunda ordem a degradação ocorre muito mais lentamente em relação aos sistemas de primeira ordem. A diminuição da velocidade em sistemas de segunda ordem têm consequências ambientais importantes, pois contaminantes que ocorrem por reações de segunda ordem tendem a permanecer em concentrações baixas por um período de tempo maior.



### 5.3.2 Degradação via ozonização

Dados na literatura tem reportado que degradação das drogas citotóxicas pela ozonização é relativamente rápida e dependente do pH. O mesmo foi evidenciado neste estudo, em que os 4 compostos foram 100% degradados com relação ao composto original em até 20 minutos (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Gráficos de degradação por ozonização dos compostos anticâncer com amostra em pH 5, 7 e 9.



Doxorrubicina e epirrubicina foram removidas em menor tempo quando em pH 9, enquanto daunorrubicina apresentou resultados similares em pH 7 e 9. Já o composto irinotecano apresentou pouca diferença na degradação com relação ao pH, sendo ligeiramente superior a degradação em pH 9. Resultados similares foram obtidos em estudos com o anticâncer cisplatina, a qual pode ser totalmente removida após uma reação de 2 min a pH 9 (HERNÁNDEZ et al., 2008), enquanto a ciclofosfamida foi degradada após 10 min a pH 8,5 (FERRE-ARACIL et al., 2016).

Este fato pode ser explicado devido a taxa de decomposição do ozônio aumenta com o aumento do pH da solução, uma vez que os íons hidroxila catalisam a decomposição do ozônio para formar os radicais e espécies reativas. Em geral, em pH <4, o principal mecanismo da ozonização é a reação direta (molecular) com os compostos orgânicos, enquanto que para pH entre 4 e 9 estão presentes a reação direta e radicalar. Em pH > 9, predomina o mecanismo de degradação por meio de radicais livres (VON GUNTEN, 2003).

Somensi et al. (SOMENSI et al., 2012) relataram que a eficiência de remoção da doxorubicina foi dependente do pH nos sistemas de ozonização e sonólise/ozonização. Os autores justificam que o aumento no pH resultou na concentração elevada de radicais hidroxila, bem como outras espécies ativas de oxigênio, o que pode explicar a taxa de decomposição do fármaco.

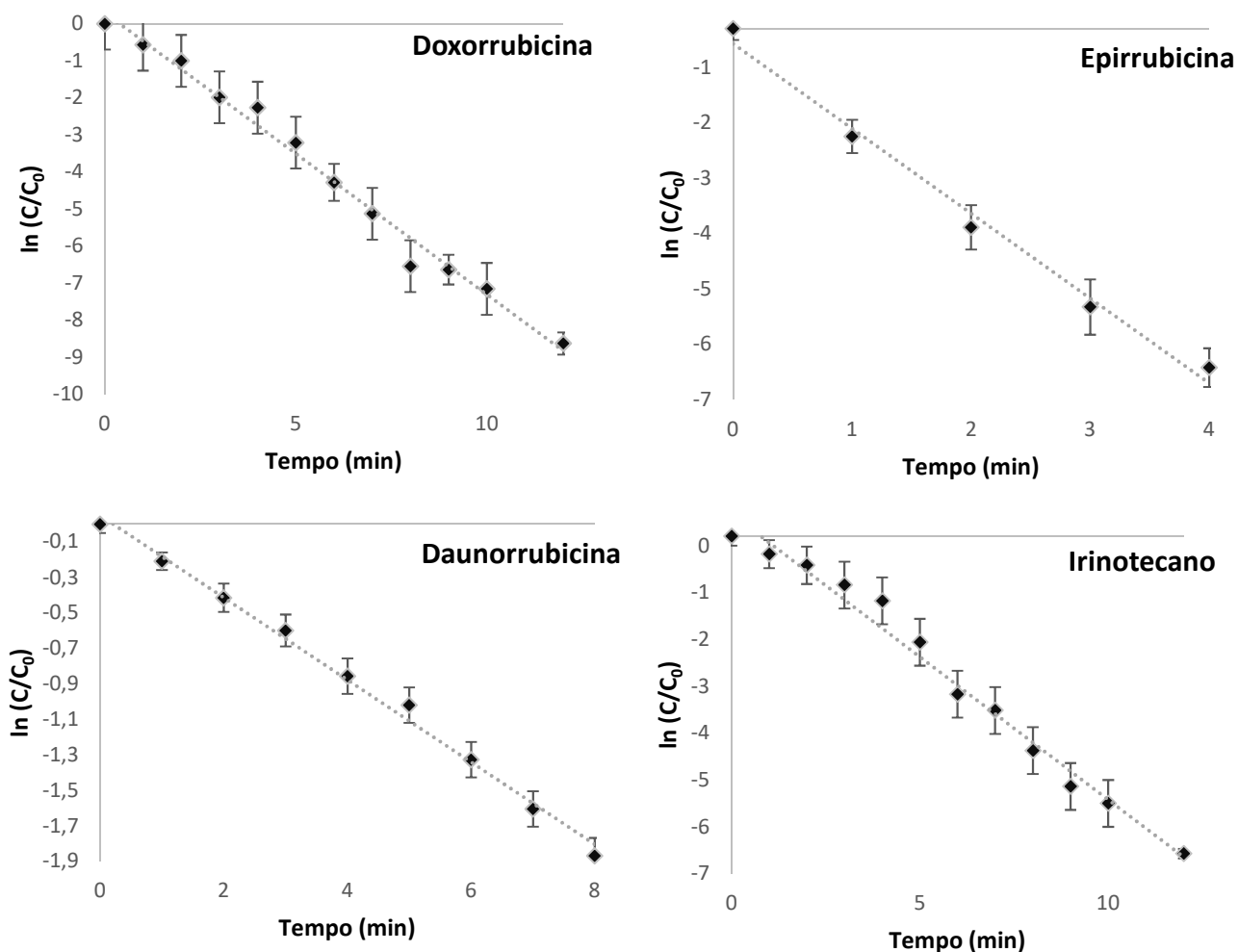
O processo de degradação via ozonização foi modelado com uma cinética de pseudo-primeira ordem com relação as concentrações de doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina e irinotecano. Foram plotados gráficos avaliando o logaritmo natural da concentração em função do tempo (Figura 5.6), no qual foi observada linearidade da curva e pela inclinação desta obtiveram-se as constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem para cada analito, cujos dados estão organizados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Dados obtidos pelo processo de degradação via ozonização para reação de pseudo-primeira ordem, constante cinética observada (K), tempo de meia vida e ajuste ao modelo (R<sup>2</sup>).

<b>Analito</b>	<b>K<sub>obs</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (min)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Epirrubicina</b>	0,7472	0,93	0,9891
<b>Daunorrubicina</b>	0,2155	3,22	0,9963
<b>Doxorrubicina</b>	0,5679	1,22	0,9471

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.6 - Cinética de reação para degradação de anticâncer por ozonização em efluente hospitalar



Fonte: Elaborado pela autora, com uso do Microsoft excel.

## 5.4 CONCLUSÕES

Os processos avançados de degradação tanto via fotólise quanto via ozonização se mostraram alternativas aos processos convencionais de tratamento de efluentes, com relação à degradação dos quatro compostos anticâncer. No entanto, a ozonização mostrou-se mais eficiente considerando-se a porcentagem de degradação do composto original, em um menor tempo quando comparando ao processo de fotólise.

Porém, estudos adicionais são necessários para investigar os produtos de degradação e a possível toxicidade deste, comparada ao composto original, visto que degradar o composto original não necessariamente têm-se a completa mineralização assim como também não se pode afirmar que ocorreu redução da toxicidade do efluente tratado.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



Este capítulo final resume em que medida os objetivos foram alcançados e aponta os destaques deste trabalho. Deste modo, a primeira etapa foi alcançada com sucesso através do desenvolvimento e validação de dois novos métodos para a análise das quatro drogas anticâncer selecionadas em efluente hospitalar, empregando cromatografia líquida e detecção por fluorescência e pré-concentração por SPE e por DLLME. O Cartucho chromabond C18 ec apresentou as melhores recuperações para todos os analitos, o pH da amostra e a adição de ácido fórmico ao solvente de eluição metanol foram os fatores mais significativos na recuperação dos quatro analitos em estudo, sendo estes otimizados em planejamento completo rotacional juntamente com os fatores pH da água empregada na etapa de lavagem e volume de metanol utilizado para eluição dos analitos.

Para a extração por DLLME, os fatores que apresentaram maior influência na recuperação dos analitos foram o pH da amostra, força iônica e os volumes dos solventes empregados como dispersores e como extratores. Desta forma estes fatores foram otimizados de forma multivariada. As condições ótimas de cada metodologia foram investigadas e em posse destas informações, as mesmas foram então validadas, em termos de linearidade, seletividade, efeito matriz, precisão (*intraday* e reprodutibilidade *interday*), exatidão e limite de quantificação (LOQ). Os procedimentos propostos forneceram evidências de que o método otimizado está em conformidade com critérios aceitáveis e como consequência, permitindo uma determinação precisa de drogas anticâncer em amostras de águas residuais hospitalares.

Com relação aos métodos de extração, estes apresentaram recuperações satisfatórias, sendo que em pesquisa a literatura especializada, não se encontraram publicações de métodos de microextração para determinação de drogas anticâncer em amostras ambientais. O método foi aplicado para a determinação de quatro anticânceres no efluente hospitalar do HUSM.

A ineficiência do atual sistema de tratamento empregado pelo HUSM foi claramente notório a partir da determinação da ocorrência desses quimioterápicos no efluente tratado, o qual foi observado ao longo dos 7 dias de estudo. No ponto A, das 7 amostras analisadas, foram detectados irinotecano em seis amostras com concentração média de  $2,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ; doxorubicina em seis amostras em concentração média de  $3,26 \mu\text{g L}^{-1}$ ; daunorrubicina em seis amostras em concentrações com valor médio de  $2,54 \text{ ng L}^{-1}$  e epirrubicina em três amostras nas concentrações  $<1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ;

3,05  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 6,22  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O ponto B também apresentou contaminação pelos quatro compostos nas 7 amostras investigadas, sendo determinados concentrações médias de 1,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  para irinotecano (quatro amostras); 1,87  $\mu\text{g L}^{-1}$  de doxorubicina (3 amostras) e concentrações de < LOQ para 1,08  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas duas amostras contendo daunorrubicina e 2,27  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,67  $\mu\text{g L}^{-1}$  em duas amostras contaminadas por epirubicina.

Em ambos os pontos A e B, os analitos exibem  $QR > 10$ , o que representa um alto risco para organismos aquáticos e ecossistemas. O risco ecotoxicológico deve ser considerados como uma indicação de um risco potencial para o ambiente, devido à disponibilidade reduzida de dados de toxicidade experimental e às características particulares das amostras investigadas.

Os processos de fotólise e ozonização foram escolhidos para investigação como uma das possíveis soluções para a remoção das drogas anticâncer do efluente do HUSM, como um processo de pós tratamento, vislumbrando tais compostos foram determinadas e em concentrações que podem oferecer risco ao ambiente. Experimentos em escala de bancada mostraram que ozonização foi o processo que mostrou maior eficiência para a degradação dos quatro compostos anticâncer, independente do pH do efluente hospitalar. A fotólise, por sua vez, apesar de degradar consideravelmente alguns compostos, não foi eficiente para degradar nenhum dos analitos em sua totalidade.



## **7 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS**

---



Os resíduos gerados neste trabalho foram segregados e, da mesma maneira que todos os resíduos gerados no LATER, armazenados em frascos apropriados. Os resíduos líquidos são separados em halogenados e não halogenados. Os resíduos sólidos são armazenados em embalagens plásticas e identificados.

São então, encaminhados ao Almoxarifado de Química, para o Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos do Departamento de Química da UFSM, que dá a destinação final, através de empresa especializada e credenciada para tal atividade.



## **8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

---



Como possibilidades para trabalhos futuros, sugere-se:

- ✓ Ampliação do escopo do método cromatográfico a outros compostos anticâncer, incluindo os principais metabólitos;
- ✓ Estudar a ocorrência dos compostos alvo desse estudo no sedimento de rio;
- ✓ Ampliar a investigação ao efluente urbano;
- ✓ Estudar os produtos de degradação e a toxicidade destes;
- ✓ Estudo de outros métodos de degradação avançados.





## **9 REFERÊNCIAS**

---



AHERNE, G. W.; BRIGGS, R. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 41, n. 10, p. 735–736, 1989.

AHERNE, G. W.; ENGLISH, J.; MARKS, V. The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 9, n. 1, p. 79–83, fev. 1985.

AHERNE, G. W.; HARDCASTLE, A.; NIELD, A. H. Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 42, n. 10, p. 741–742, out. 1990.

ALMEIDA, C. A. A. de; BRENNER, C. G. B.; MINETTO, L.; MALLMANN, C. A.; MARTINS, A. F. Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. *Chemosphere*, v. 93, n. 10, p. 2349–55, nov. 2013.

ALTISSIMO, J. Desenvolvimento de método de quantificação de estatinas em efluente hospitalar e estudo de degradação oxidativa avançada. 2015. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

ÁNGEL, M.; ZAVALA, L.; REYNOSO-CUEVAS, L. Simultaneous extraction and determination of four different groups of pharmaceuticals in compost using optimized ultrasonic extraction and ultrahigh pressure liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1423, p. 9–18, 2015.

ARMENTA, S.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. de la. Green Analytical Chemistry. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd, 2017. 76p. 1–25.

ARSAND, D. R.; KÜMMERER, K.; MARTINS, A. F. Removal of dexamethasone from aqueous solution and hospital wastewater by electrocoagulation. *Science of the Total Environment*, v. 443, p. 351–357, 2013.

AUERBACH, E. A.; SEYFRIED, E. E.; MCMAHON, K. D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 41, n. 5, p. 1143–1151, 2007.

AUS DER BEEK, T.; WEBER, F.-A.; BERGMANN, A.; HICKMANN, S.; EBERT, I.; HEIN, A.; KÜSTER, A. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 823–835, abr. 2016.

AZUMA, T.; ARIMA, N.; TSUKADA, A.; HIRAMI, S.; MATSUOKA, R.; MORIWAKE, R.; ISHIUCHI, H.; INOYAMA, T.; TERANISHI, Y.; YAMAOKA, M.; MINO, Y.; HAYASHI, T.; FUJITA, Y.; MASADA, M. Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Science of The Total Environment*, v. 548–549, p. 189–197, abr. 2016.

AZUMA, T.; ISHIUCHI, H.; INOYAMA, T.; TERANISHI, Y.; YAMAOKA, M.; SATO, T.; MINO, Y. Occurrence and fate of selected anticancer, antimicrobial, and psychotropic pharmaceuticals in an urban river in a subcatchment of the Yodo River basin, Japan. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 23, p. 18676–18686, 17 dez. 2015.

BADEA, I.; LAZĂR, L.; MOJA, D.; NICOLESCU, D.; TUDOSE, A. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 1–2, p. 305–309, set. 2005.

BAHRPEYMA, S.; HEMMATEENEJAD, B.; JAVIDNIA, K. Photo-degradation study of dacarbazine by spectrophotometric–chemometrics and HPLC methods. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 221–229, 29 fev. 2016.

BALAKRISHNA, K.; RATH, A.; PRAVEENKUMARREDDY, Y.; GURUGE, K. S.; SUBEDI, B. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 137, p. 113–120, mar. 2017.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. xiv–xvi, nov. 2003.

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

BASU, S.; ZENG, M.; YIN, T.; GAO, S.; HU, M. Development and validation of an UPLC–MS/MS method for the quantification of irinotecan, SN-38 and SN-38 glucuronide in plasma, urine, feces, liver and kidney: Application to a pharmacokinetic study of irinotecan in rats. *Journal of Chromatography B*, v. 1015–1016, p. 34–41, mar. 2016.

BEN, W.; ZHU, B.; YUAN, X.; ZHANG, Y.; YANG, M.; QIANG, Z. Occurrence, removal and risk of organic micropollutants in wastewater treatment plants across China: Comparison of wastewater treatment processes. *Water Research*, v. 130, p. 38–46, mar. 2018.

BESSE, J.; LATOUR, J.; GARRIC, J. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*, v. 39, n. 1, p. 73–86, fev. 2012.

BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; MULKIEWICZ, E.; STOKOWSKI, M.; STOLTE, S.; STEPNOWSKI, P. Acute aquatic toxicity assessment of six anti-cancer drugs and one metabolite using biotest battery – Biological effects and stability under test conditions.

Chemosphere, v. 189, p. 689–698, 1 dez. 2017.

BOILLOT, C.; BAZIN, C.; TISSOT-GUERRAZ, F.; DROGUET, J.; PERRAUD, M.; CETRE, J. C.; TREPO, D.; PERRODIN, Y. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Science of the Total Environment*, v. 403, n. 1–3, p. 113–129, 2008.

BOLTON, J. R.; STEFAN, M. I. Fundamental photochemical approach to the concepts of fluence (UV dose) and electrical energy efficiency in photochemical degradation reactions. *Research on Chemical Intermediates*, v. 28, n. 7–9, p. 857–870, jan. 2002.

BOOKER, V.; HALSALL, C.; LLEWELLYN, N.; JOHNSON, A.; WILLIAMS, R. Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Science of The Total Environment*, v. 473–474, p. 159–170, 1 mar. 2014.

BOTERO-COY, A. M.; MARTÍNEZ-PACHÓN, D.; BOIX, C.; RINCÓN, R. J.; CASTILLO, N.; ARIAS-MARÍN, L. P.; MANRIQUE-LOSADA, L.; TORRES-PALMA, R.; MONCAYO-LASSO, A.; HERNÁNDEZ, F. 'An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater'. *Science of The Total Environment*, v. 642, p. 842–853, nov. 2018.

BOTTONI, P.; CAROLI, S. Presence of residues and metabolites of pharmaceuticals in environmental compartments, food commodities and workplaces: A review spanning the three-year period 2014–2016. *Microchemical Journal*, v. 136, p. 2–24, jan. 2018.

BRACK, W.; DULIO, V.; SLOBODNIK, J. The NORMAN Network and its activities on emerging environmental substances with a focus on effect-directed analysis of complex environmental contamination. *Environmental Sciences Europe*, v. 24, n. 1, p. 29, 2012.

BRENNER, C. G. B. Antiandrogênios em efluentes hospitalar: extração com barras poliméricas e subprodutos, proposição de rotas de degradação por processos avançados de oxidação. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-

Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

BRENNER, C. G. B.; MALLMANN, C. a.; ARSAND, D. R.; MAYER, F. M.; MARTINS, A. F. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. *Clean - Soil, Air, Water*, v. 39, n. 1, p. 28–34, 2011.

BROSÉUS, R.; VINCENT, S.; ABOULFADL, K.; DANESHVAR, A.; SAUVÉ, S.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water Research*, v. 43, n. 18, p. 4707–4717, out. 2009.

BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta*, v. 593, n. 2, p. 129–139, jun. 2007.

BUERGE, I. J.; BUSER, H.-R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters †. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 23, p. 7242–7250, dez. 2006.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, set. 2011.

CALZA, P.; MEDANA, C.; SARRO, M.; ROSATO, V.; AIGOTTI, R.; BAIOCCHI, C.; MINERO, C. Photocatalytic degradation of selected anticancer drugs and identification of their transformation products in water by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1362, p. 135–144, out. 2014.

CARLSON, J. C.; STEFAN, M. I.; PARNIS, J. M.; METCALFE, C. D. Direct UV photolysis of selected pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution. *Water Research*, v. 84, p. 350–361, nov. 2015.

ČESEN, M.; KOSJEK, T.; LAIMOU-GERANIOU, M.; KOMPARE, B.; ŠIROK, B.; LAMBROPOLOU, D.; HEATH, E. Occurrence of cyclophosphamide and ifosfamide in aqueous environment and their removal by biological and abiotic wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, v. 527–528, p. 465–473, set. 2015.

CHABNER, B. A. Inibidores de topoisomerase: Camptotecinas, antraciclina e etoposídeo. In: CHABNER, B. A. . (Ed.). *Manual de Oncologia de Harrison*. 2. ed. Porto Alegre-RS: McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC, 2014. p. 47–61.

CHEMICALIZE. Calculation. Disponível em: <<https://chemicalize.com/#/>>. Acesso em: 4 mar. 2018.

CHEN, X.; PEER, C. J.; ALFARO, R.; TIAN, T.; SPENCER, S. D.; FIGG, W. D. Quantification of irinotecan, SN38, and SN38G in human and porcine plasma by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 62, p. 140–148, mar. 2012.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology letters*, v. 142, p. 185–194, 2003.

CONAMA. Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. In: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Data da legislação: 17/03/2005 – Publicação DOU: 18/03/2005, Seção I: Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

CONAMA. Resolução CONAMA n° 430, de 13 de maio de 2011. In: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Data da legislação: 13/05/2011 – Publicação DOU: 16/05/2011, DOU no 92: Diário Oficial da União, Brasília, 2011.



DA SILVA, D. S.; BRENNER, C. G. B.; MAYER, F. M.; MONTIPÓ, S.; MARTINS, A. F. PDMS extraction bars for the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and wastewater. *Journal of Separation Science*, v. 36, n. 2, p. 362–368, jan. 2013.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, v. 107, n. 6, p. 907–938, 1999.

DE JONG, F. A.; DE JONGE, M. J. A.; VERWEIJ, J.; MATHIJSSSEN, R. H. J. Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Letters*, v. 234, n. 1, p. 90–106, mar. 2006.

DODD, M. C.; ZULEEG, S.; GUNTEN, U. von; PRONK, W. Ozonation of Source-Separated Urine for Resource Recovery and Waste Minimization: Process Modeling, Reaction Chemistry, and Operational Considerations. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 24, p. 9329–9337, 15 dez. 2008.

EBRAHIMZADEH, H.; MIRBABAEI, F.; ASGHARINEZHAD, A. A.; SHEKARI, N.; MOLLAZADEH, N. Optimization of solvent bar microextraction combined with gas chromatography for preconcentration and determination of methadone in human urine and plasma samples. *Journal of Chromatography B*, v. 947–948, p. 75–82, 1 fev. 2014.

EBSERH. Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM/UFSM: Dimensionamento de serviços assistenciais e da gerência de ensino e pesquisa. Brasília: DF, 2013.

ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Information on Chemicals: Annex III inventory. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/annex-iii-inventory>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

EKHAISE, F. O.; OMAVWOYA, B. P. Influence of Hospital Wastewater Discharged from University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Benin City on its Receiving Environment. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v.

4, n. 4, p. 484–488, 2008.

EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J. M.; VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: A proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials*, v. 117, n. 1, p. 1–11, 2005.

ENVIRONMENT CANADA. Screening Assessment: Twenty-three Substances on the Domestic Substances List Used Primarily as Pharmaceuticals, v. 1, 2015.

ESCHER, B. I.; PRONK, W.; SUTER, M. J.-F.; MAURER, M. Monitoring the Removal Efficiency of Pharmaceuticals and Hormones in Different Treatment Processes of Source-Separated Urine with Bioassays. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 16, p. 5095–5101, ago. 2006.

FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M. F.; BARCELÓ, D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 11, p. 1347–1362, 1 dez. 2010.

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

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, n. 2, p. 122–159, 10 fev. 2006.

FERRANDO-CLIMENT, L.; CRUZ-MORATÓ, C.; MARCO-URREA, E.; VICENT, T.; SARRÀ, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere*, v. 136, p. 9–19, 2015.

FERRANDO-CLIMENT, L.; REID, M. J.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; THOMAS, K. V. Identification of markers of cancer in urban sewage through the use of a suspect screening approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 129, p. 571–580, set. 2016.

FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of ten anticancer drugs in hospital and urban wastewaters, and its application for the screening of human metabolites assisted by information-dependent acquisition tool (IDA) in sewage samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, n. 18, p. 5937–5952, 2013.

FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environmental Pollution*, v. 193, p. 216–223, 1 out. 2014.

FERRE-ARACIL, J.; VALCÁRCEL, Y.; NEGREIRA, N.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D.; CARDONA, S. C.; NAVARRO-LABOULAIS, J. Ozonation of hospital raw wastewaters for cytostatic compounds removal. Kinetic modelling and economic assessment of the process. *Science of The Total Environment*, v. 556, p. 70–79, jun. 2016.

FITZKE, B.; GEISSEN, S.-U. Sustainable removal of iodinated X-ray contrast media (XRC) by ozonation in a complex wastewater matrix – urine as example. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 12, p. 293–300, jun. 2007.

FRANK, C. da S. Concepção, construção e avaliação de fotorreatores catalisados na degradação de carga poluente e amoxicilina em efluente hospitalar. 2008. Tese de doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

FRANQUET-GRIELL, H.; GÓMEZ-CANELA, C.; VENTURA, F.; LACORTE, S. Anticancer drugs: Consumption trends in Spain, prediction of environmental

concentrations and potential risks. *Environmental Pollution*, v. 229, p. 505–515, 1 out. 2017a.

FRANQUET-GRIELL, H.; MEDINA, A.; SANS, C.; LACORTE, S. Biological and photochemical degradation of cytostatic drugs under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 323, p. 319–328, fev. 2017b.

FRÉDÉRIC, O.; YVES, P. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*, v. 115, p. 31–39, nov. 2014.

GARCIA-AC, A.; BROSÉUS, R.; VINCENT, S.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Oxidation kinetics of cyclophosphamide and methotrexate by ozone in drinking water. *Chemosphere*, v. 79, n. 11, p. 1056–1063, maio 2010

GARCIA-AC, A.; SEGURA, P. A.; VIGLINO, L.; FÜRTÖS, A.; GAGNON, C.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 48, p. 8518–8527, nov. 2009.

GARCIA-AC, A.; SEGURA, P. A.; VIGLINO, L.; GAGNON, C.; SAUVÉ, S. Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 46, n. 4, p. 383–390, abr. 2011.

GAUTAM, A. K.; KUMAR, S.; SABUMON, P. C. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environmental Management*, v. 83, p. 298–306, 2007.

GHAFURI, Y.; YUNESIAN, M.; NABIZADEH, R.; MESDAGHINIA, A.; DEHGHANI, M. H.; ALIMOHAMMADI, M. Platinum cytotoxic drugs in the municipal wastewater and drinking water, a validation method and health risk assessment. *Human and Ecological*

Risk Assessment: An International Journal, v. 24, n. 3, p. 784–796, 3 abr. 2018.

GOGOI, A.; MAZUMDER, P.; TYAGI, V. K.; TUSHARA CHAMINDA, G. G.; AN, A. K.; KUMAR, M. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, v. 6, p. 169–180, mar. 2018

GOLDWIRT, L.; LEMAITRE, F.; ZAHR, N.; FARINOTTI, R.; FERNANDEZ, C. A new UPLC-MS/MS method for the determination of irinotecan and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mice: application to plasma and brain pharmacokinetics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 66, p. 325–33, jul. 2012.

GÓMEZ-CANELA, C.; CORTÉS-FRANCISCO, N.; OLIVA, X.; PUJOL, C.; VENTURA, F.; LACORTE, S.; CAIXACH, J. Occurrence of cyclophosphamide and epirubicin in wastewaters by direct injection analysis–liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 8, p. 3210–3218, 1 set. 2012.

GÓMEZ-CANELA, C.; VENTURA, F.; CAIXACH, J.; LACORTE, S. Occurrence of cytostatic compounds in hospital effluents and wastewaters, determined by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, n. 16, p. 3801–3814, 14 jun. 2014.

GOULART, V. P.; VILLARINHO, J. G.; CAPUTI, C. S.; LUNKES, D. S.; PERLIN, V. G. Indicadores de Produção da Central de Quimioterapia Antineoplásica do Hospital Universitário de Santa Maria. In: *Anais da V Semana Científica do Hospital Universitário de Santa Maria HUSM, Santa Maria. Anais...* Santa Maria: UFSM, HUSM, Direção de Ensino e Pesquisa, 2014.

GROS, M.; PETROVIĆ, M.; GINEBREDÁ, A.; BARCELÓ, D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, v. 36, n. 1, p. 15–26, jan. 2010.

GUO, R.; ZHENG, F.; CHEN, J. Evaluation of the aquatic toxic effect varied during the degradation of capecitabine under the environmental abiotic and biotic processes. *RSC Advances*, v. 5, n. 94, p. 76772–76778, 2015.

HALLDIN, K. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, n. 2, p. 420–429, 2005.

HALLDIN, K.; BERG, C.; BRANDT, I.; BRUNSTRÖM, B. Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: Effects of in ovo exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, n. 11, p. 861–866, 1999.

HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LÜTZHOFT, H. C.; JØRGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. *Chemosphere*, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

HANN, S.; STEFÁNKA, Z.; LENZ, K.; STINGEDER, G. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, n. 2, p. 405–412, 29 jan. 2005.

HENRIQUES, D. M. Cefalosporinas e Surfactantes Não-lônico em Efluente Hospitalar: Determinação, Degradação por meio de Fotólise e Eletrocoagulação e Identificação de Subprodutos e Metabólitos. 2009. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

HERNÁNDEZ, C.; RAMOS, Y.; FERNÁNDEZ, L. A.; LEDEA, O.; BATALLER, M.; VÉLIZ, E.; BESADA, V.; ROSADO, A. Ozonation of Cisplatin in Aqueous Solution at pH 9. *Ozone: Science & Engineering*, v. 30, n. 3, p. 189–196, 29 maio 2008.

HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBANEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, p. 466–485, 2007.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, v. 225, n. 1–2, p. 109–118, 1999.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA. Hospital Universitário de Santa Maria: Nossa História. Disponível em: <<http://www.ebserh.gov.br/web/husm-ufsm/informacoes/institucional/nossa-historia>>. Acesso em: 2 abr. 2016.

HUANG, J.; ZHAO, D.; LIU, Z.; LIU, F. Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agents. *Cancer Letters*, v. 419, p. 257–265, 10 abr. 2018.

IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Pharmaceutical drugs. Lyon, France: WHO (World Health Organization) and IARC (International Agency for Research on Cancer), 1990. v. 50

IARC. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/burden\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx)>. Acesso em: 29 jul. 2018.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA, 2018.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; RUSSO, C.; KUNDI, M.; ŽEGURA, B.; NOVAK, M.; FILIPIČ, M.; MIŠÍK, M.; KNASMUELLER, S.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D.; ŽONJA, B.; ČESEN, M.; ŠČANČAR, J.; KOSJEK, T.; HEATH, E. Chemical and toxicological characterisation of anticancer drugs in hospital and municipal wastewaters from Slovenia and Spain. *Environmental Pollution*, v. 219, p. 275–287, 1 dez. 2016

ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Second ed. [s.l.] Genebra, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1,

p. 13–25, 2010.

JELIĆ, A.; GROS, M.; PETROVIĆ, M.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D. Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals During Conventional Wastewater Treatment. In: GUASCH, H.; GINEBREDA, A.; GEISZINGER, A. (Ed.). *Emerging and Priority Pollutants in Rivers. The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. 19p. 147–179.

JOHNSON, A. C.; JÜRGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; KÜMMERER, K.; KORTENKAMP, A.; SUMPTER, J. P. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, v. 348, n. 1–2, p. 167–175, 1 jan. 2008.

KAMATA, R.; TAKAHASHI, S.; SHIMIZU, A.; MORITA, M.; SHIRAISHI, F. In ovo exposure quail assay for risk assessment of endocrine disrupting chemicals. *Archives of Toxicology*, v. 80, n. 12, p. 857–867, 2006.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. *Chemosphere*, v. 77, n. 4, p. 518–525, out. 2009.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, v. 35, n. 2, p. 402–417, fev. 2009.

KOSJEK, T.; HEATH, E. Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 7, p. 1065–1087, jul. 2011.

KOVALOVA, L.; SIEGRIST, H.; GUNTEN, U. von; EUGSTER, J.; HAGENBUCH, M.; WITTMER, A.; MOSER, R.; MCARDELL, C. S. Elimination of Micropollutants during Post-Treatment of Hospital Wastewater with Powdered Activated Carbon, Ozone, and UV. *Environment Science & Technology*, v. 47, n. 14, p. 7899–7908, 2013.



KÜMMERER, K. Introduction: Pharmaceuticals in the Environment. In: KÜMMERER, K. (Ed.). *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. First ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2001a. p. 1–8.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, v. 45, n. 6–7, p. 957–969, nov. 2001b.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 2354–2366, 2009.

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A. Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 2, p. 486–496, 2010.

KÜMMERER, K.; ERBE, T.; GARTISER, S.; BRINKER, L. AOX-emissions from hospitals into municipal waste water. *Chemosphere*, v. 36, n. 11, p. 2437–2445, 1998.

KÜMMERER, K.; STEGER-HARTMANN, T.; MEYER, M. Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, v. 31, n. 11, p. 2705–2710, 1997.

LAI, W. W.-P.; LIN, H. H.-H.; LIN, A. Y.-C. TiO<sub>2</sub> photocatalytic degradation and transformation of oxazaphosphorine drugs in an aqueous environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 287, p. 133–141, abr. 2015.

LEDER, C.; RASTOGI, T.; KÜMMERER, K. Putting benign by design into practice – novel concepts for green and sustainable pharmacy: Designing green drug derivatives by non-targeted synthesis and screening for biodegradability. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 2, p. 31–36, 1 dez. 2015.

LENZ, K.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G.; STEFANKA, Z.; STINGEDER, G.; WEISSENBACHER, N.; MAHNIK, S. N.; FUERHACKER, M. Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. *Science of The Total Environment*, v. 345, n. 1–3, p. 141–152, jun. 2005.

LENZ, K.; MAHNIK, S. N.; WEISSENBACHER, N.; MADER, R. M.; KRENN, P.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S.; FERK, F.; BURSCH, W.; FUERHACKER, M. Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. *Water Science & Technology*, v. 56, n. 12, p. 141, dez. 2007.

LLEWELLYN, N.; LLOYD, P.; JÜRGENS, M. D.; JOHNSON, A. C. Determination of cyclophosphamide and ifosfamide in sewage effluent by stable isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 47, p. 8519–8528, nov. 2011.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

LUTTERBECK, C. A.; WILDE, M. L.; BAGINSKA, E.; LEDER, C.; MACHADO, Ê. L.; KÜMMERER, K. Degradation of cyclophosphamide and 5-fluorouracil by UV and simulated sunlight treatments: Assessment of the enhancement of the biodegradability and toxicity. *Environmental Pollution*, v. 208, p. 467–476, jan. 2016.

MACHEREY NAGEL. MN - Your partner for solid phase extraction. Disponível em: <<http://www.mn-net.com/SPEStart/tabid/4260/language/en-US/Default.aspx>>.

Acesso em: 5 jan. 2018.

MAHNIK, S. N.; LENZ, K.; WEISSENBACHER, N.; MADER, R. M.; FUERHACKER, M. Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-

bio-reactor system. *Chemosphere*, v. 66, n. 1, p. 30–37, jan. 2007.

MAHNIK, S. N.; RIZOVSKI, B.; FUERHACKER, M.; MADER, R. M. Development of an analytical method for the determination of anthracyclines in hospital effluents. *Chemosphere*, v. 65, n. 8, p. 1419–1425, nov. 2006.

MAHNIK, S.; RIZOVSKI, B.; FUERHACKER, M.; MADER, R. Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 380, n. 1, 29 set. 2004.

MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 5, p. 731–748, maio 2011.

MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 34, n. 22, p. 3166–3177, nov. 2011.

MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Occurrence and Ecotoxicological Risk Assessment of 14 Cytostatic Drugs in Wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 3, p. 1896, 16 mar. 2014.

MARTINS, A. F.; DOS SANTOS, J. B.; TODESCHINI, B. H.; SALDANHA, L. F.; DA SILVA, D. S.; REICHERT, J. F.; SOUZA, D. M. Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. *Chemosphere*, v. 170, p. 176–182, mar. 2017a.

MARTINS, A. F.; FRANK, C. da S.; ALTISSIMO, J.; DE OLIVEIRA, J. A.; DA SILVA, D. S.; REICHERT, J. F.; SOUZA, D. M. Determination of statin drugs in hospital effluent with dispersive liquid–liquid microextraction and quantification by liquid chromatography. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 52, n. 10, p.

939–945, 24 ago. 2017b.

MARTINS, A. F.; VASCONCELOS, T. G.; HENRIQUES, D. M.; FRANK, C. D. S.; KÖNIG, A.; KÜMMERER, K. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. *CLEAN – Soil, Air, Water*, v. 36, n. 3, p. 264–269, mar. 2008.

MAUDENS, K. E.; STOVE, C. P.; COCQUYT, V. F. J.; DENYS, H.; LAMBERT, W. E. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 30, p. 3907–3915, nov. 2009.

MAUDENS, K. E.; STOVE, C. P.; LAMBERT, W. E. Quantitative liquid chromatographic analysis of anthracyclines in biological fluids. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 25, p. 2471–2486, set. 2011.

MAYER, F. M. Parabenos em efluente hospitalar: Quantificação e identificação de metabólitos e subprodutos de oxidação avançada. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, RS., 2013.

MINETTO, L. Antibióticos Macrolídeos: Determinação e identificação de metabólitos e produtos de degradação em efluente hospitalar. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MINETTO, L.; MAYER, F. M.; MALLMANN, C. a.; MARTINS, A. F. Quantification of Diclofenac in Hospital Effluent and Identification of Metabolites and Degradation Products. *Clean - Soil, Air, Water*, v. 40, n. 9, p. 950–957, 2012.

MOLDOVAN, Z. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, v. 64, n. 11, p. 1808–1817, set. 2006.

MOMPELAT, S.; BOT, B. Le; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, v. 35, n. 5, p. 803–814, 2009.

MULLOT, J.-U.; KAROLAK, S.; FONTOVA, A.; HUART, B.; LEVI, Y. Development and validation of a sensitive and selective method using GC/MS-MS for quantification of 5-fluorouracil in hospital wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 394, n. 8, p. 2203–2212, 1 ago. 2009.

NAWARA, K.; KRYSINSKI, P.; BLANCHARD, G. J. Photoinduced Reactivity of Doxorubicin: Catalysis and Degradation. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 116, n. 17, p. 4330–4337, 3 maio 2012.

NEGREIRA, N.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk. *Science of The Total Environment*, v. 497–498, p. 68–77, 1 nov. 2014.

NEGREIRA, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D. On-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1280, p. 64–74, mar. 2013.

NEGREIRA, N.; REGUEIRO, J.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D. Degradation of the anticancer drug erlotinib during water chlorination: Non-targeted approach for the identification of transformation products. *Water Research*, v. 85, p. 103–113, 2015.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1225–1234, 2007.

NORPOTH, K.; NEHRKORN, A.; KIRCHNER, M.; HOLSEN, H.; TEIPEL, H. Investigations on the problem of solubility and stability of steroid ovulation inhibitors in water, wastewater and activated sludge. *ZblHyg I AbtOrig B*, v. 156, p. 500–512, 1973.

NOVAIS, A. S.; RIBEIRO FILHO, J. F.; AMARAL, E. M. F.; FARIA, A. M. NEW SORBENT WITH LOWER HYDROPHOBICITY FOR SOLID PHASE EXTRACTION: PREPARATION AND CHARACTERIZATION. *Química Nova*, 2014.

NOVAK, M.; ŽEGURA, B.; MODIC, B.; HEATH, E.; FILIPIČ, M. Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. *Science of The Total Environment*, v. 601–602, p. 293–300, 1 dez. 2017.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRY, P.; VEUTHEY, J.-L.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, out. 2011.

OCAMPO-PÉREZ, R.; SÁNCHEZ-POLO, M.; RIVERA-UTRILLA, J.; LEYVA-RAMOS, R. Degradation of antineoplastic cytarabine in aqueous phase by advanced oxidation processes based on ultraviolet radiation. *Chemical Engineering Journal*, v. 165, n. 2, p. 581–588, 1 dez. 2010.

OLALLA, A.; NEGREIRA, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. A case study to identify priority cytostatic contaminants in hospital effluents. *Chemosphere*, v. 190, p. 417–430, 1 jan. 2018.

ORIAS, F.; PERRODIN, Y. Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Science of The Total Environment*, v. 454–455, p. 250–276, jun. 2013.

PARK, D. J.; WON, J. H.; CHO, A. R.; YUN, H. J.; HEO, J. H.; HWHANG, T. H.; LEE, D. H.; KIM, W. M. Determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in rabbit plasma and tumors using a validated method of tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 962, p. 147–152, jul. 2014.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Estrogenic activity and cytotoxicity of six anticancer drugs detected in water systems. *Science of The Total Environment*, v. 485–486, p. 216–222, 1 jul. 2014.

PHENOMENEX. SPE - Strata-X: Simplified Solid Phase Extraction Solutions. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>>. Acesso em: 5 jan. 2018a.

PHENOMENEX. Strata Silica-Based Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents. Disponível em: <[http://phx.phenomenex.com/lib/br91821211\\_1.pdf](http://phx.phenomenex.com/lib/br91821211_1.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2018b.

PINO-OTÍN, M. R.; MUÑIZ, S.; VAL, J.; NAVARRO, E. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Science of The Total Environment*, v. 595, p. 441–450, out. 2017.

QUADRA, G. R.; OLIVEIRA DE SOUZA, H.; COSTA, R. dos S.; FERNANDEZ, M. A. dos S. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 2, p. 1200–1218, 13 jan. 2017.

RABII, F. W.; SEGURA, P. A.; FAYAD, P. B.; SAUVÉ, S. Determination of six chemotherapeutic agents in municipal wastewater using online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, v. 487, n. 1, p. 792–800, 15 jul. 2014.

REICHERT, J.; SOUZA, D.; GONÇALVES, J.; MARTINS, A. F. Quantification of Six Antipsychotics in Hospital Wastewater: Validation of the Solid Phase Extraction. In: XII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental Manizales, Manizales - Colombia. Anais... Manizales - Colombia: XII Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental, 2017.

REINTHALER, F. F.; POSCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, v. 37, n. 8, p. 1685–1690, 2003.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.-R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, maio 2006.

RIBEIRO, C.; RIBEIRO, A. R.; MAIA, A. S.; GONÇALVES, V. M. F.; TIRITAN, M. E. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 44, n. 2, p. 142–185, 3 abr. 2014.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 37, n. 1, p. 1–12, 1985.

SAARI, G. N.; SCOTT, W. C.; BROOKS, B. W. Global scanning assessment of calcium channel blockers in the environment: Review and analysis of occurrence, ecotoxicology and hazards in aquatic systems. *Chemosphere*, v. 189, p. 466–478, dez. 2017.

SANDERSON, H.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology Letters*, v. 203, p. 27–40, 2004.

SANGION, A.; GRAMATICA, P. PBT assessment and prioritization of contaminants of emerging concern: Pharmaceuticals. *Environmental Research*, v. 147, p. 297–306, maio 2016.

SANTANA-VIERA, S.; MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Cytostatic drugs in environmental samples: An update on the extraction and determination procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 373–386, 1 jun. 2016.



SANTOS, M. S. F.; FRANQUET-GRIELL, H.; ALVES, A.; LACORTE, S. Development of an analytical methodology for the analysis of priority cytostatics in water. *Science of The Total Environment*, v. 645, p. 1264–1272, dez. 2018.

SILVA, C. E. da; SILVEIRA, G. L. da; IRION, C. A. de O.; CRUZ, J. C. Monitoramento quali-quantitativo dos recursos hídricos em pequena bacia. In: *Gestión inteligente de los recursos naturales. Desarrollo y salud : Anales del XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, Cancun, Quintana Roo, México. Anais... Cancun, Quintana Roo, México: Federación mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2002.

SILVA, D. S. da. HPAs em Águas Superficiais e Efluente Hospitalar: Degradação por PAOs e Desenvolvimento de Métodos para a Determinação e Identificação de Subprodutos. 2016. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. Second ed. New York: John Wiley and sons, 1997.

SOMENSI, C. A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; GASPARETO, P.; RADETSKI, C. M. A comparison between ozonolysis and sonolysis/ozonolysis treatments for the degradation of the cytostatic drugs methotrexate and doxorubicin: Kinetic and efficiency approaches. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 47, n. 11, p. 1543–1550, set. 2012.

STEGER-HARTMANN, T.; KÜMMERER, K.; SCHECKER, J. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by twostep solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 726, n. 1–2, p. 179–184, mar. 1996.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. *World cancer report*. First ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.

STIEBER, M.; PUTSCHEW, A.; JEKEL, M. Treatment of Pharmaceuticals and Diagnostic Agents Using Zero-Valent Iron – Kinetic Studies and Assessment of Transformation Products Assay. *Environment Science & Technology*, v. 45, n. 11, p. pp 4944–4950, 2011.

STOCKHOLM COUNTY COUNCIL. Environmentally Classified Pharmaceuticals 2014. Swedish Association of the Pharmaceutical Industry. Disponível em: <<https://noharm-europe.org/documents/environmentally-classified-pharmaceuticals-2014-2015>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 7, p. 2138–2146, 2009.

SUPELCO. Supelco Solid Phase Extraction Products. Disponível em: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t402150.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2018.

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

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260, 1998.

TERNES, T. A.; HIRSCH, R.; MUELLER, J.; HABERER, K. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and  $\beta$  2 -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 362, n. 3, p. 329–340, 5 out. 1998.

TGD. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances, Commission Regulation (EC) No.

1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and. Part II ed. Brussels, Belgium: European Communities, 2003. v. Part II

TOOLARAM, A. P.; KÜMMERER, K.; SCHNEIDER, M. Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: A focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 760, p. 18–35, 2014.

UFSM. Vão-se os córregos, segue a poluição. Disponível em: <<http://site.ufsm.br/noticias/exibir/1316>>. Acesso em: 4 ago. 2016.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, v. 430, p. 109–118, jul. 2012a.

VERLICCHI, P.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, v. 389, n. 3–4, p. 416–428, 2010.

VERLICCHI, P.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Micro-pollutants in Hospital Effluent: Their Fate, Risk and Treatment Options. In: BARCELÓ, D. (Ed.). *Emerging Organic Contaminants and Human Health*. First ed. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012b. p. 139–171.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*, v. 37, n. 7, p. 1443–1467, abr. 2003.

WHO. World Health Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology (Norwegian Institute of Public Health) - ATC: Structure and principles. Disponível em: <[http://www.whocc.no/atc/structure\\_and\\_principles/](http://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/)>. Acesso em: 13 abr. 2015.

WILDE, M. L.; MONTIPÓ, S.; MARTINS, A. F. Degradation of  $\beta$ -blockers in hospital wastewater by means of ozonation and Fe<sup>2+</sup>/ozonation. *Water Research*, v. 48, n. 1, p. 280–295, 2014.

WOLS, B. A.; HOFMAN-CARIS, C. H. M.; HARMSSEN, D. J. H.; BEERENDONK, E. F. Degradation of 40 selected pharmaceuticals by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water Research*, v. 47, n. 15, p. 5876–5888, out. 2013.

YANG, Y. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of daunorubicin in rat plasma. *Talanta*, v. 71, n. 2, p. 596–604, 15 fev. 2007.

YANG, Y.; OK, Y. S.; KIM, K.-H.; KWON, E. E.; TSANG, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, v. 596–597, p. 303–320, out. 2017.

YIN, J.; SHAO, B.; ZHANG, J.; LI, K. A Preliminary Study on the Occurrence of Cytostatic Drugs in Hospital Effluents in Beijing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 84, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2010a.

YIN, J.; YANG, Y.; LI, K.; ZHANG, J.; SHAO, B. Analysis of Anticancer Drugs in Sewage Water By Selective SPE and UPLC-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, v. 48, n. 10, p. 781–789, 1 nov. 2010b.

YU, J. T.; BOUWER, E. J.; COELHAN, M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, v. 86, n. 1–2, p. 72–80, nov. 2006.

ZAGOTTO, G.; GATTO, B.; MORO, S.; SISSI, C.; PALUMBO, M. Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 764, n. 1–2, p. 161–171, nov. 2001.

ZHANG, J.; CHANG, V. W. C.; GIANNIS, A.; WANG, J.-Y. Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, v. 445–446, p. 281–298, fev. 2013.

ZHOU, Q.; BAI, H.; XIE, G.; XIAO, J. Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1177, n. 1, p. 43–49, 4 jan. 2008.

ZOUNKOVÁ, R.; ODRÁŠKA, P.; DOLE ALOVÁ, L.; HILSCHEROVÁ, K.; MARŠÁLEK, B.; BLÁHA, L. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2208, 2007.

ZUCCATO, E.; CALAMARI, D.; NATANGELO, M.; FANELLI, R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*, v. 355, n. 9217, p. 1789–1790, maio 2000.

ŽWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 15, n. 5, p. 677–690, 2006.



## **10 APÊNDICES**

---





Apêndice 1 – Caracterização do efluente hospitalar do HUSM.

<b>Parâmetro</b>	<b>Limites (CONAMA)</b>	<b>Limites (CONSEMA)</b>	<b>Efluente (HUSM)</b>
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-	-	39,5
Cloreto (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	86,6
Fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	1	-	13,9
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	<10	-	3,8
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	21,0
Potássio (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	25,0 ± 0,3
Sódio (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	45,9 ± 0,7
Sólidos suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	≤ 150	≤ 140	25
Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	460,7
pH	5-9	6-9	8,2
Temperatura média (°C)	< 40	< 40	23,0

Análises executadas pelo, LABORATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS INDUSTRIAIS E AMBIENTAIS (LAQIA), no ano de 2015.

