

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ BÖGER

**DETERMINAÇÃO DE PSICOFÁRMACOS EM MATRIZES AQUOSAS E SUA  
RELAÇÃO COM A DISPENSAÇÃO POR CENTROS DE ATENÇÃO  
PSICOSSOCIAL DE CURITIBA – PR**

CURITIBA

2015

BEATRIZ BÖGER

DETERMINAÇÃO DE PSICOFÁRMACOS EM MATRIZES AQUOSAS E SUA  
RELAÇÃO COM A DISPENSAÇÃO POR CENTROS DE ATENÇÃO  
PSICOSSOCIAL DE CURITIBA – PR

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Programa de Pós- Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

Co orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliane C. Gomes.

Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

CURITIBA

2015

Böger, Beatriz

Determinação de psicofármacos em matrizes aquosas e sua relação com a dispensação por Centros de Atenção Psicossocial de Curitiba – PR / Beatriz Böger - Curitiba, 2015.

106 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Ricardo Wagner

Coorientadores: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes e Professor Dr. Patrício Guillermo Peralta Zamora

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2015.

Inclui bibliografia

1. Poluentes emergentes. 2. Rio. 3. Psicofármacos. 4. CAPS I. Wagner, Ricardo II. Gomes, Eliane Carneiro. III. Zamora- Peralta, Guillermo Patrício. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.78



# TERMO DE APROVAÇÃO

**BEATRIZ BÖGER**

Título: **"DETERMINAÇÃO DE PSICOFARMACOS EM MATRIZES AQUOSAS E SUA RELAÇÃO COM A DISPENSAÇÃO POR CENTROS DE ATENÇÃO PSICOSSOCIAL DE CURITIBA - PR"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

*Ricardo Wagner*  
Prof. Dr. Ricardo Wagner  
Orientador

*Marcus Vinicius de Liz*  
Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

*Yanna Dantas Rattmann*  
Profª. Dra. Yanna Dantas Rattmann  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 11 de dezembro de 2015.

*A minha família,  
Origem da minha vida, identidade e valores, meu porto seguro,  
fonte de alegria e incentivadora dos meus sonhos e lutas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre me revelar o melhor caminho e me responder com pequenos sinais minhas dúvidas, me mostrar as oportunidades e as pessoas certas nos momentos oportunos.

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliane Carneiro Gomes e Prof. Dr. Ricardo Wagner, pela oportunidade de realizar esse mestrado, carinho, e confiança no meu trabalho. Em especial a professora Eliane pela paciência, pelo apoio incondicional, por ter me acompanhado de tão perto em todos os momentos, por contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de competência e dedicação.

Ao professor Dr. Patrício Zamora por estar sempre disposto em compartilhar recursos físicos para elaboração do trabalho e por contribuir com sua experiência.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo, que sempre se mostrou disposto a me ajudar a buscar recursos que possibilitassem a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Walfrido Kühn Svoboda que abriu novos horizontes na minha vida, há cinco anos, quando me selecionou para monitoria em Saúde Pública ainda durante a graduação.

Aos professores Marcus Vinicius de Liz e Yanna Dantas Rattmann por aceitaram o convite da banca de defesa deste trabalho.

A minha amiga e companheira de laboratório Tatiana, pelas boas idéias nos momentos críticos, conversas, risadas, incentivo, ensinamentos e prestatividade.

A minha amiga e parceira de trabalho Bianca do Amaral a quem muito admiro pessoalmente e profissionalmente e que nunca poupou tempo nem esforços pra me ajudar, pelos conhecimentos, carinho, discussões de resultados, dedicação e paciência.

Agradecimento especial à IC Priscila, pelas valiosas contribuições no laboratório, que com certeza aprendi mais com ela do que ela comigo.

A todos os professores do laboratório de Saúde Pública e Saúde Ambiental, pela amizade e convivência diária, apoio, por transformarem nosso

local de trabalho em um lugar prazeroso durante esses cinco anos, desde a monitoria.

Aos meus pais Jaime e Adrienne pelo amor e companheirismo. Principalmente ao meu pai que é minha referência e meu incentivador em todos esses anos de estudo fornecendo as condições necessárias para isso.

A Bianca, minha irmã, que sua amizade é um dos melhores presentes que Deus me deu e a Maísa por ser um exemplo de pessoa e mulher para nós duas.

Ao Samuel, meu amor, pela paciência, compreensão, por estar sempre presente, me entusiasmar, manter meus pés no chão e dar cada vez mais vontade de alcançar meus sonhos ao seu lado.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo empenho em fornecer condições estruturais e oportunidades de crescimento intelectual.

Ao secretário da pós-graduação, Jean, pela paciência e atenção.

A Secretária Municipal de Saúde de Curitiba, por autorizar e colaborar com a coleta de dados do meu trabalho nos CAPS.

A CAPES, que possibilitou financeiramente a realização desse mestrado.

A todos os professores da minha vida, em especial os professores do curso de graduação e pós-graduação que me inspiraram a seguir pelo caminho da docência.

“Portanto, vos asseguro: Pedi, e vos será concedido; buscai e encontrareis; batei e a porta será aberta para vós. Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e a quem bate se lhe abrirá.”

Lc 11:9-10



## RESUMO

Este trabalho, por meio de metodologias analíticas, visou à determinação de três psicofármacos mais dispensados em Centros de Atendimento Psicossocial (CAPS) em uma sub-bacia hidrográfica na cidade de Curitiba-PR. Os CAPS são um local estratégico para política de saúde mental num determinado território. Eles fazem parte da rede de atenção psicossocial atendendo às pessoas com transtornos mentais e dependentes químicos dos municípios em uma determinada região. Os dois CAPS estudados se encontram em bairros localizados sobre a sub-bacia do Belém em Curitiba, a qual seu principal rio é o Belém. Assim, para a determinação de resíduos dos psicofármacos: carbamazepina (CZ), diazepam (DZ) e clorpromazina (CP) na água do rio, por extração em fase sólida aliada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Diferentes condições foram avaliadas sendo que a melhor performance cromatográfica foi alcançada utilizando uma coluna C18, separação isocrática, fluxo  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , com fase móvel metanol:água deionizada (60:40, v:v) para CZ e DZ e acetonitrila:tampão fosfato  $0,01\text{M pH } 3,50$  (25:75 v:v) para CP, volume de injeção  $15 \mu\text{L}$  e temperatura  $30^\circ\text{C}$ . As melhores condições de pré-concentração, considerando as melhores recuperações para a maioria dos analitos, foram: condicionamento com  $5,00 \text{ mL}$  de acetonitrila e  $5,00 \text{ mL}$  de água  $\text{pH } 4,00$ , fluxo de  $3 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $100 \text{ mL}$  de amostra em  $\text{pH } 4,00$ , eluição com  $5,00 \text{ mL}$  de acetonitrila e reconstituição com  $1,00 \text{ mL}$  de água. Os parâmetros selecionados para a validação do método foram: sensibilidade, limite de detecção e quantificação ( $0,067 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,209 \mu\text{g L}^{-1}$  para CZ e de  $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,435 \mu\text{g L}^{-1}$  para DZ e  $0,583 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,67 \mu\text{g L}^{-1}$  para CP respectivamente), linearidade da curva analítica ( $R > 0,998$ ), precisão intraensaio (com desvio padrão relativo de até  $3,87\%$  para CZ,  $13,56\%$  para DZ e  $1,93\%$  para CP), interensaio (um desvio padrão relativo de até  $3,85\%$  para CZ,  $6,61\%$  para DZ e  $7,85\%$  para CP), ensaios de exatidão ( $98,25\%$  para CZ,  $64,65\%$  para CP e  $98,37\%$  para DZ) e robustez. Os parâmetros da validação foram avaliados estatisticamente com os testes *t*-Student, ANOVA e análise de variância, mostrando ser de confiança para a determinação dos psicofármacos nas amostras fortificadas e naturalmente contaminadas. A técnica de quantificação proposta mostrou-se simples, econômica quanto ao uso de reagentes e de rápida execução quando comparada às outras técnicas da literatura. O método desenvolvido foi aplicado em doze amostras de água coletadas no rio Belém em Curitiba-PR. Onde foi possível verificar a presença de dois medicamentos mais dispensados pelos CAPS: CZ e DZ, nas amostras do rio.

Palavras-chaves: Poluentes emergentes, rio, psicofármacos, Brasil, CAPS

---

## ABSTRACT

By means of analytical methodologies, this paper aimed at the determination of the most prescribed psychopharmacological drugs in Psychosocial Care Centers (CAPS) in aqueous matrices. CAPS are responsible for organizing a healthcare network for people with mental disorders and chemical dependents of the municipalities, being a strategic place for mental health policy in a given territory, i.e. the service is regionalized. The two CAPS studied are in neighborhoods located on the sub-basin of Belém, the main river of Curitiba. Thus, for the determination of psychopharmacological: carbamazepine (CZ), diazepam (DZ) and chlorpromazine (CP) residues in the water of the river, by solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography with detector of photodiode arrays. Different conditions were evaluated and the best chromatographic performance was achieved by using a C18 column, isocratic elution, a flow rate of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ , with mobile methanol phase: deionized water (60:40, v/v) to CZ and DZ and acetonitrile: phosphate buffer  $0.01 \text{ M}$  at pH 3.50 (25:75 v/v) to CP, injection volume  $15 \text{ uL}$  and  $30^\circ \text{ C}$  temperature. The best conditions for preconcentration, taking into account the best recoveries for most of the analytes, were: conditioning with  $5.00 \text{ ml}$  of acetonitrile and  $5.00 \text{ ml}$  of water at pH 4.00, a flow rate of  $3 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $100 \text{ ml}$  of sample at pH 4.00, elution with  $5.00 \text{ ml}$  of acetonitrile and reconstitution with  $1.00 \text{ ml}$  of water. The selected parameters for the validation of the method were: sensitivity, detection limit and quantification ( $0.067 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.209 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for CZ and  $0.13 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0.435 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for DZ and  $0.583 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and  $1.67 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for CP respectively), linearity of the calibration curve ( $R > 0.998$ ), intra-assay precision (with RSD of up to 3.87% for CZ, 13.56% for DZ and 1.93% for CP), inter assay (a relative standard deviation of up to 3.85% for CZ, 6.61% for DZ and 7.85% for CP), accuracy testing (98.25% for CZ, 64.65% for CP and 98.37% for DZ) and robustness. The validation parameters were statistically evaluated with the *t*-Student, ANOVA and analysis of variance tests, proving to be reliable for the determination of the psychopharmacological drugs in the fortified and naturally contaminated samples. The proposed quantification technique was shown to be simple, economic as to the use of reagents and rapidly executable when compared to the other literary techniques. The developed method was applied to twelve samples of water collected from the river Belém in Curitiba-PR, where it was possible to verify the presence of two drugs most frequently dispensed CAPS: CZ and DZ, in the river samples.

Keywords: Emerging contaminants, river, pharmaceutical drugs, Brazil, CAPS

---

## LISTA DE ABREVIATÓES

<b>ACN</b>	-	Acetonitrila
<b>ANOVA</b>	-	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>C18</b>	-	Octadecil
<b>CP</b>	-	Clorpromazina
<b>CV</b>	-	Coeficiente de variação
<b>CZ</b>	-	Carbamazepina
<b>CAPS</b>	-	Centros de Atenção Psicossocial
<b>DAD</b>	-	Detector por Arranjo de Diodos
<b>DPR (RSD)</b>	-	Desvio padrão relativo
<b>DZ</b>	-	Diazepam
<b>ETE</b>	-	Estação de Tratamento de Esgoto
<b>FE</b>	-	Fase Estacionária
<b>FID</b>	-	Detector por ionização em Chama
<b>FL</b>	-	Detector por Fluorescência
<b>FM</b>	-	Fase Móvel
<b>GC</b>	-	Cromatografia a Gás
<b>HPLC (CLAE)</b>	-	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<b>ICH</b>	-	<i>International Conference on Harmonisation</i>
<b>INMETRO</b>	-	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia
<b>IAP</b>	-	Instituto Ambiental do Paraná
<b>IUPAC</b>	-	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>IQA</b>	-	Índice de Qualidade da Água
<b>LC</b>	-	Cromatografia Líquida
<b>LD</b>	-	Limite de detecção
<b>LQ</b>	-	Limite de quantificação
<b>MS (EM)</b>	-	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrômetro de massa)
<b>WHO (OMS)</b>	-	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

<b>PAPS</b>	- 3-Fosfoadenosina -5- Fosfossulfato
<b>PSF</b>	- Programas de Saúde da Família
<b>POPs</b>	- Poluentes orgânicos persistentes
<b>RMC</b>	- Região Metropolitana de Curitiba
<b>RENAME</b>	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
<b>REMUNE</b>	- Relação Municipal de Medicamentos Essenciais
<b>RAPS</b>	- Rede de Atenção Psicossocial
<b>PR</b>	- Paraná
<b>SAIC</b>	- Sistema de Abastecimento Integrado de Curitiba
<b>SANEPAR</b>	- Companhia de Saneamento do Paraná
<b>SNGPC</b>	- Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
<b>SPE (EFS)</b>	- Solid Phase Extraction
<b>SRT</b>	- Serviço de Residência Terapêutica
<b>UBS</b>	- Unidades Básicas de Saúde
<b>UDPGA</b>	- Ácido Uridino Difosfato Glicurônico
<b>USFDA</b>	- <i>U.S. The Food and Drug Administration</i>
<b>USEPA</b>	- <i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
<b>UV</b>	- Ultravioleta
<b>UV-VIS</b>	- Ultravioleta-visível

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Ocorrência e níveis de psicofármacos encontrados no ambiente pelo mundo .....	15
TABELA 2. Psicofármacos encontrados em matrizes aquosas brasileiras. ....	17
TABELA 3. Experimentos de ecotoxicidade de LC <sub>50</sub> (24h) em diferentes animais .....	20
TABELA 4. Características dos padrões utilizados .....	43
TABELA 5. Parâmetros e condições avaliados para o planejamento fatorial... 44	
TABELA 6. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> testados para a recuperação de CP, DZ e CZ em água no pH 4,00 empregando cartuchos StrataX®.....	45
TABELA 7. Parâmetros cromatográficos encontrados na literatura para a quantificação dos medicamentos estudados.....	47
TABELA 8. Coordenadas dos pontos de coleta na Bacia do Rio Belém. ....	52
TABELA 9. Relação medicamentos mais utilizados nos CAPS e sua classe terapêutica.....	55
TABELA 10. Propriedades físico-químicas dos medicamentos estudados. ....	55
TABELA 11. Otimização do pH .....	59
TABELA 12. Resultados obtidos para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> avaliando os efeitos do solvente de condicionamento/eluição (S <sub>cond./eluiç.</sub> ), do volume da amostra (V <sub>amostra</sub> ) e da concentração (Conc.) na recuperação dos analitos CZ, DZ e CP.....	60
TABELA 13. Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> .....	61
TABELA 14. Otimização do volume de reconstituição .....	63
TABELA 15. Tempo de retenção e média das áreas em diferentes concentrações e nas diferentes colunas testadas.....	65
TABELA 16. Características físicas dos recheios das colunas testadas. ....	67
TABELA 17. Condições cromatográficas selecionadas. ....	69
TABELA 18. Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidas para CZ, DZ e CP por HPLC-DAD à 286 nm, 254 nm e 254 nm respectivamente e principais parâmetros de mérito. ....	75

TABELA 19. Limites de detecção e quantificação encontrados para o método proposto. ....	76
TABELA 20. Áreas médias obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no mesmo dia. ....	77
TABELA 21. Áreas médias obtidas e desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em três dias diferentes.....	78
TABELA 22. Recuperações obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ . ....	79
TABELA 23. Áreas médias obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no mesmo dia. ....	80
TABELA 24. Recuperação dos analitos em amostra real fortificada nos três diferentes pontos de coleta do rio Belém. ....	81
TABELA 25. Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 1 ( próximo a nascente). ....	82
TABELA 26. Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 2 (5 km da nascente). ....	84
TABELA 27. Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 3 (Foz).....	85



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Rotas simplificadas da entrada de fármacos nos ambientes aquáticos.....	14
FIGURA 2. Sub-bacias hidrográficas do município de Curitiba.....	21
FIGURA 3. Sub-bacia da bacia do rio Belém.....	24
FIGURA 4. Cartucho típico empregado em SPE.....	27
FIGURA 5. Principais etapas empregadas em SPE, visando o isolamento de um composto.....	28
FIGURA 6. Grupo ligante do cartucho Strata X®.....	43
FIGURA 7. Localização da sub-bacia hidrográfica do rio Belém.....	51
FIGURA 8. Pontos de coletas.....	52
FIGURA 9. Fluxograma de trabalho após coletas.....	53
FIGURA 10. Interpretações geométricas para CZ, DZ E CP dos efeitos significativos do planejamento 2 <sup>3</sup> .....	62
FIGURA 11. Melhores condições de pré-concentração selecionadas.....	64
FIGURA 12. Espectro de UV-Vis para: a) CZ, b) DZ de 1 mg L em metanol:água (60:40 v:v) e c) CP 1 mg L em acetonitrila: tampão fosfato 0,01 M pH 3,50 (25:75 v:v).....	65
FIGURA 13. a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm na coluna Zorbax Eclipse; b) Ampliação da banda de eluição do DZ na coluna Zorbax Eclipse.....	66
FIGURA 14. A) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm na coluna Zorbax Eclipse; B) Ampliação da banda de eluição da CZ na coluna Zorbax Eclipse.....	66
FIGURA 15. Cromatograma para o padrão de CP obtido por eluição isocrática (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm na coluna Zorbax Eclipse.....	67

FIGURA 16. a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; b) Ampliação da banda de eluição do DZ.....	71
FIGURA 17. a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; b) Ampliação da banda de eluição da CZ.....	72
FIGURA 18. a) Cromatogramas para o padrão de CP obtidos por eluição isocrática (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm;b) Ampliação da banda de eluição da CP. ....	73
FIGURA 19. Curvas analíticas médias para CZ e DZ (a) e CP (b).....	75
FIGURA 20. Cromatogramas obtidos das quatro coletas da nascente (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas.O destaque na figura para CZ. ....	83
FIGURA 21. Cromatogramas obtidos das quatro coletas da nascente (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas.O destaque na figura para DZ. ....	83
FIGURA 22. Cromatogramas obtidos das quatro coletas no ponto 2 (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas.O destaque na figura para CZ. ....	84
FIGURA 23. Cromatogramas obtidos das quatro coletas da foz (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para CZ. ....	85
FIGURA 24. Cromatogramas obtidos das quatro coletas da foz (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas.O destaque na figura para DZ. ....	86
FIGURA 25. Cromatogramas obtidos das três primeiras coletas da foz (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas.O destaque na figura para CP na segunda coleta. ....	86

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>9</b>
2.1 CONSUMO DE PSICOFARMACOS NO BRASIL.....	9
2.2 CENTROS DE ATENÇÃO PSICOSOCIAL.....	11
2.3 MICROPOLUENTES EMERGENTES .....	13
2.4 EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NO MEIO AQUÁTICO .....	18
2.5 HIDROGRAFIA DE CURITIBA.....	21
2.5.1 Sub-bacia do Passaúna .....	22
2.5.2 Sub-bacia do Barigui .....	22
2.5.3 Sub-bacia do Belém .....	23
2.5.4 Sub-bacia Riberão dos Padilhas.....	26
2.5.5 Sub-bacia do Atuba.....	26
2.6 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	26
2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISES.....	29
2.8 LEGISLAÇÃO .....	31
2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	33
2.9.1 Especificidade/Seletividade.....	34
2.9.2 Linearidade.....	35
2.9.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) .....	36
2.9.4 Precisão.....	36
2.9.5 Exatidão.....	37
2.9.6 Robustez .....	38
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 PRIMEIRA ETAPA: IDENTIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS MAIS DISPENSADOS NOS CAPS DE CURITIBA.....	41
4.2 SEGUNDA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	42
4.2.1 Limpeza da vidraria .....	42
4.2.2 Reagentes e consumíveis.....	42
4.2.3 Desenvolvimento da extração em fase sólida.....	43
4.2.3.1 Otimização do pH.....	44

4.2.3.2 Otimização da concentração, volume de amostra e solvente de condicionamento e eluição .....	45
4.2.3.3 Otimização do volume de reconstituição .....	45
4.2.4 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	46
4.3 TERCEIRA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	48
4.3.1 Seletividade.....	48
4.3.2 Linearidade.....	49
4.3.3 Limites de detecção e de quantificação .....	49
4.3.4 Precisão.....	49
4.3.5 Exatidão.....	50
4.3.6 Robustez .....	50
4.4 QUARTA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO.....	51
4.1.1 Coletas e processamento das amostras .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1 MEDICAMENTOS MAIS DISPENSADOS NO CAPS EM CURITIBA .....	54
5.1.1 Carbamazepina .....	55
5.1.2 Diazepam .....	56
5.1.3 Clorpromazina .....	57
5.2 DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA .....	58
5.2.1 Otimização do pH.....	59
5.2.2 Otimização da concentração, volume de amostra e solvente de condicionamento e eluição.....	60
5.2.3 Otimização do volume de reconstituição .....	63
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO .....	64
5.3.1 Avaliação da estabilidade das soluções padrões .....	70
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	70
5.4.1 Seletividade.....	70
5.4.2 Linearidade.....	74
5.4.3 Limites de detecção e de quantificação .....	75
5.4.4 Ensaio de precisão .....	76
5.4.5 Ensaios de exatidão .....	78
5.4.6 Ensaios de robustez.....	79
5.5 ANÁLISE DE AMOSTRA DO RIO.....	80
5.5.1 Amostras do rio Belém fortificadas.....	81
5.5.2 Amostras do rio Belém não fortificadas .....	82
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, não é mais possível considerar que a água seja um bem público inesgotável. O uso descontrolado e irracional, aliado ao aumento da demanda, em função do crescimento populacional, faz com que o cenário de escassez seja cada vez mais verossímil. Durante muito tempo, perpetuou-se no inconsciente humano que a água seria um bem infinito, por se tratar de um recurso natural autossustentável pela sua capacidade de autodepuração (PHILIPPI, 2005; FENSTAD et al., 2014). Porém, o crescimento das cidades aumentou de tal forma que tal capacidade de autodepuração foi superada pela carga poluidora dos efluentes (ANDRADE, 2010).

No Brasil, aproximadamente 2,89 bilhões de m<sup>3</sup>/ano de esgotos sanitários são despejados diretamente nos corpos de água pelas redes coletoras de esgoto em áreas urbanizadas, sem tratamento. Dados obtidos através do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento do ano de 2008, publicados pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, mostram que a cobertura urbana com rede coletora de esgotos sanitários no Brasil é cerca de 50% e no sul a média de tratamento é de 38,3% (ANA, 2013).

Após a Segunda Guerra Mundial, a produção de novos produtos químicos e produtos farmacêuticos intensificaram-se. Desta forma a contaminação hídrica aumentou devido a introdução de diferentes compostos químicos no meio aquático, resultantes de um desenvolvimento desenfreado e não sustentável. Ao mesmo tempo, no entanto, foi adquirido o conhecimento sobre a possível influência de produtos químicos e farmacêuticos no ambiente e na saúde humana. Devido à presença de tais compostos em baixas concentrações no ambiente aquático. A maior parte dos produtos químicos e produtos farmacêuticos usados pelos consumidores vão para os esgotos, como resultado do seu descarte incorreto, esgotos hospitalares, produção industrial, efluente doméstico e também na disposição em aterros e excreções animais (KÜMMERER, 2011).

Aliado a isso, nas últimas décadas, a dispensação de medicamentos psicofármacos, que tem ação direta no sistema nervoso central, vem aumentando consideravelmente na rede pública e nas farmácias comerciais. Esse crescimento tem sido atribuído ao aumento da frequência de diagnósticos de transtornos psiquiátricos na população (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Os medicamentos são geralmente excretados na urina, uma parte desses são biotransformados e outra pode ser eliminada inalterada, após a atividade biológica. E ainda, há alguns que são biotransformados e se tornam com maior potencial toxicológico que seu antecessor. A excreção urinária é um meio de contaminação do meio ambiente, principalmente aquático, pois o tratamento de esgoto não é eficiente para remoção desses compostos, levando à poluição de águas usadas para o consumo (BILA; DEZOTTI, 2003).

Esses novos compostos químicos são cada vez mais presentes nos ambientes aquáticos, vêm recebendo grande atenção, em razão de sua capacidade de persistência no ambiente e por serem continuamente usados pela população (GHISELLI; JARDIM, 2007; COLAÇO *al et.*, 2014).

Dessa forma, quando as águas são utilizadas para o abastecimento público sem um tratamento adequado, ou seja, sem a remoção dos compostos farmacológicos, isso pode representar um expressivo comprometimento à qualidade das águas superficiais e subterrâneas (JONES; LESTER; VOULVOULIS, 2005). Além disso, há o aparecimento de danos ecológicos comprovados em organismos integrantes da cadeia trófica aquática (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Estudos demonstram que os fármacos estão tornando-se presentes em ambientes aquáticos em várias partes do mundo (BILA; DEZOTTI, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007; COLAÇO *al et.*, 2014). A ocorrência de fármacos residuais no esgoto doméstico e águas naturais é um importante tema de discussão pelas comunidades científicas de vários países, como Canadá e Alemanha (TERNES *et al.*, 1999), Brasil (STUMPF *et al.*, 1999; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2009; TORRES; HELOÍSA; AMÉRICO, 2012), China (LIU; WONG, 2013), Áustria, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Suíça, Holanda e os EUA (HEBERER, 2002). Esses produtos farmacêuticos



presentes na água são denominados como micropoluentes (BILA; DEZOTTI, 2003).

Estudos de monitoramento de micropoluentes emergentes no Brasil em esgotos, águas superficiais e de abastecimento, ainda são escassos. A revisão da literatura mostra que há pouquíssimos trabalhos publicados abordando a presença de tais contaminantes em matrizes ambientais referentes a dados do Brasil (LEITE *et al.*, 2010).

O interesse crescente na determinação desses contaminantes ocorre pelo fato de que eles não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água e, portanto, podem ser candidatos para futuras legislações, dependendo das pesquisas sobre a sua toxicidade e efeitos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Além disso, se destacam como poluentes orgânicos persistentes (POPs) no ambiente aquático, acarretando efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde pública, porque apresentam diferentes graus de resistência e biodegradação (KÜMMERER, 2011; FENSTAD *et al.*, 2014).

Para determinação e monitoramento de micropoluentes emergentes são necessários métodos que permitam a detecção de poluentes em níveis de traços ( $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ ) e especialmente consigam detectar compostos polares, tais como a maioria dos medicamentos, incluindo os seus produtos de biotransformação que anteriormente não eram passíveis de análise (KÜMMERER, 2011).

Atualmente estão disponíveis na literatura uma grande variedade de procedimentos analíticos para determinação destes micropoluentes emergentes. No entanto o que se destaca na determinação destes compostos são técnicas cromatográficas, devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação. As análises podem ser realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC), geralmente acopladas à espectrometria de massas ou por absorção de radiação de UV-visível (KÜMMERER, 2011).

Porém a extração em matrizes complexas como as ambientais, tais como, águas naturais, solo, sedimentos, lodo biológico e efluente de ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) torna a determinação ainda mais complicada, pela grande quantidade de diferentes compostos orgânicos nessas matrizes (KÜMMERER, 2011).

Pode-se observar que o monitoramento da qualidade das águas ainda é muito restritivo a certas regiões do país, pois, mesmo sendo uma importante ferramenta de diagnóstico e obtenção de resultados, ainda recebe pouca importância pelos órgãos competentes (STUMPF *et al.*, 1999).

O diagnóstico das reais condições em que se encontram as bacias de abastecimento auxilia na avaliação dos sistemas de tratamento de água e de esgoto, assim como no fomento de novos desafios aos meios científicos. As demandas observadas, relativas aos contaminantes emergentes devem ser bem estudadas para que possam ser tomadas medidas factíveis a essa questão.

Considerando esses aspectos, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a presença e concentração de psicofármacos em uma análise pontual em amostras de rios que cortam a cidade de Curitiba, sabendo-se que os níveis máximos permitidos para estes compostos não estão descritos na legislação brasileira. Além disso, relacionar a presença destes fármacos com a dispensação por centros de atenção psicossocial de Curitiba.

É importante mencionar que não se conhece a concentração de micropoluentes emergentes nos rios da cidade de Curitiba, sabe-se que esses POPs não são removidos nos tratamentos convencionais utilizados. Então este trabalho também levará ao conhecimento dos setores de saúde e de meio ambiente dados sobre a qualidade da água dos rios da cidade quanto ao teor destes micropoluentes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSUMO DE PSICOFARMACOS NO BRASIL

Os psicofármacos são medicamentos que tem ação no sistema nervoso central, são usados em doenças psiquiátricas, visando à melhora, a cura ou a estabilização das mesmas. Neste grupo estão incluídos os ansiolíticos, os antidepressivos, os antipsicóticos e os antiepiléticos. Os principais fatores envolvidos no uso desses medicamentos são: ansiedade, depressão, insônia, problemas sociais e outros (GALDURÓZ *et al.*, 2005).

Nos últimos dez anos, observou-se um crescimento significativo no consumo destes medicamentos em vários países ocidentais e, até mesmo, em alguns países orientais (RODRIGUES *et al.*, 2006). Esse crescimento tem sido atribuído ao aumento da frequência de diagnósticos de transtornos psiquiátricos na população, à introdução de novos psicofármacos no mercado farmacêutico e às novas indicações terapêuticas para esses medicamentos já existentes (GALDURÓZ *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006).

A despeito disso no Brasil, segundo publicação da OMS no Relatório sobre da Saúde Mental no Mundo, a estimativa de que 23 milhões de pessoas (12% da população) possuam algum tipo de transtorno mental diagnosticado, sendo ao menos 5 milhões (3% da população) em níveis de moderado a grave (OMS, 2001).

O Brasil ocupa o 6º lugar entre os 10 principais mercados farmacêuticos do mundo capitalista. A estimativa é de que em 2017 o país chegue ao quarto lugar ficando atrás somente de Estados Unidos, China e Japão. São mais de 32 mil rótulos, com 12 mil substâncias no país sendo comercializados como medicamentos. Há uma drogaria para cada 3 mil habitantes, mais que o dobro recomendado pela OMS (JESUS, 2004; FENAFAR, 2015).

Os índices do crescimento do setor farmacêutico no Brasil demonstram de forma inequívoca a forte expansão do consumo de medicamentos no país. Mesmo com a desaceleração da nossa economia nos últimos anos, este setor caminha a passos largos. Em 2013, o faturamento do setor farmacêutico

brasileiro foi da ordem de R\$ 58 bilhões, um aumento de 140% em uma década (FENAFAR, 2015).

Crescentes também têm sido os investimentos do setor público, na disponibilização de medicamentos nas farmácias das unidades de saúde (hospitais e postos de saúde). A evolução dos investimentos em medicamentos feitos pelo Ministério da Saúde aponta que em 2003 foram investidos 1,8 bilhões de reais e em 2013 esse valor saltou para R\$11,88 bilhões (FENAFAR, 2015). Em 2025, mais de 30% da população brasileira terá mais de 60 anos, conseqüentemente o consumo de medicamentos tende a aumentar. De acordo com Éboli em 2003, pessoas com mais de 65 anos (18% da população) são responsáveis por cerca de 30% do gasto total com a saúde (ÉBOLI, 2003).

Dados do primeiro Boletim de Farmacoepidemiologia do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC), divulgado pela ANVISA, que traz um perfil do consumo de 143 medicamentos de venda controlada, no período de março de 2007 a março de 2010. O monitoramento é feito a partir das receitas médicas retidas e notificações de entrada e saída de produtos em mais de 39 mil estabelecimentos, localizados em 3,5 mil municípios. Um levantamento feito pela agência mostra que 44% dos remédios controlados vendidos em farmácias e drogarias são para o tratamento de transtornos mentais e de comportamento (ANVISA, 2011).

Os transtornos mentais e comportamentais estão dentro do grupo de doenças do sistema nervoso central, que respondem por 74,8% dos remédios controlados consumidos no País. Existem 70 tipos diferentes de princípios ativos registrados no País que agem no sistema nervoso (ANVISA, 2011).

Segundo, dados divulgados pela ANVISA, durante audiência pública, o registro nacional de fornecimento de medicamentos controlados aos usuários saltou de pouco mais de 113 mil caixas, em 2009, para quase 295 mil em 2014. O aumento foi de 161% (ANVISA, 2015).

Dentre esses psicofármacos, os benzodiazepínicos encontram-se entre os mais consumidos, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (ANVISA, 2009).

## 2.2 CENTROS DE ATENÇÃO PSICOSOCIAL

Segundo o Ministério da Saúde (MS, 2015), o serviço de base comunitária deve articular-se em rede para que a Rede de Atenção Psicossocial (RAPs) possa ser consolidada. A rede extra-hospitalar de atenção à saúde mental seria composta por Centros de Atenção Psicossocial (CAPS), Serviços Residenciais Terapêuticos (SRT), Centros de Convivência, Unidades Básicas de Saúde (UBS), Programas de Saúde da Família (PSF) e Ambulatórios de Saúde Mental (SCHRANK; OLSCHOWSKY, 2008; BRASIL, 2013).

Os CAPS têm um papel central na articulação dessa rede extra-hospitalar, assim como tem um papel estratégico na própria RAP brasileira. É função dos CAPS prestar atendimento clínico em regime de atenção diária, evitando as internações em hospitais psiquiátricos, promover a inserção social das pessoas com transtornos mentais através de ações intersetoriais, regular a porta de entrada da rede de assistência em saúde mental na sua área de atuação e dar suporte à atenção à saúde mental na rede básica (BRASIL, 2013).

Ou seja, são os CAPS responsáveis por organizar a rede de atenção às pessoas com transtornos mentais nos municípios, sendo os articuladores estratégicos desta rede e da política de saúde mental num determinado território. Isso porque visam fortalecer os laços sociais do usuário em sua região, através de coresponsabilização e protagonismo do indivíduo no seu tratamento. Além disso, o Ministério da Saúde cita que os CAPS devem ser substitutivos, e não complementares ao hospital psiquiátrico. Cabe a esses serviços o acolhimento e a atenção às pessoas com transtornos mentais graves e persistentes, procurando preservar e fortalecer os laços sociais do usuário em seu território, através da coresponsabilização e do protagonismo desse indivíduo em seu tratamento (BRASIL, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde (Portaria n.º 336/GM, 2002) existem diferentes tipos de CAPS, dependendo de sua abrangência e função:

CAPS I – Serviço de atenção psicossocial com capacidade operacional para atendimento em municípios com população entre 20.000 e 70.000 habitantes.

CAPS II – Serviço de atenção psicossocial com capacidade operacional para atendimento em municípios com população entre 70.000 e 200.000 habitantes.

CAPS III – Serviço de atenção psicossocial com capacidade operacional para atendimento em municípios com população acima de 200.000 habitantes.

CAPS i II – Serviço de atenção psicossocial para atendimentos a crianças e adolescentes, constituindo-se na referência para uma população de cerca de 200.000 habitantes, ou outro parâmetro populacional a ser definido pelo gestor local, atendendo a critérios epidemiológicos.

CAPS ad II – Serviço de atenção psicossocial para atendimento de pacientes com transtornos decorrentes do uso e dependência de substâncias psicoativas, com capacidade operacional para atendimento em municípios com população superior a 70.000.

Todos são serviços de atendimento diurno, exceto o CAPS III, que funciona 24 horas por dia. Além disso, os CAPS I, II, III, CAPS i II e CAPS ad II devem estar capacitados para o acompanhamento dos pacientes de forma intensiva, semi-intensiva e não intensiva (BRASIL, 2002).

Nos Centros de Atendimento Psicossocial medicamentos psicoativos são apenas para uso interno e doses supervisionadas pelas equipes aos pacientes vinculados ao serviço. A lista dos medicamentos do elenco da Farmácia Curitibana compõe a Relação Municipal de Medicamentos (REMUME) e fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos (RENAME) os quais possuem financiamento para aquisição através de licitação pública (FEDERHEN, 2014).

A dispensação dos psicofármacos está condicionada à prescrição originada em atendimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e deve estar de acordo com a portaria 344/98 do Ministério da Saúde. O último Protocolo



Integrado de Saúde Mental em Curitiba, data de 2002, elenca alguns medicamentos orais e injetáveis para uso em CAPS e que são de maior especificidade para este serviço, diferindo daqueles dispensados em outros pontos de atenção da rede municipal em que tenha a Farmácia Curitibana (FEDERHEN, 2014).

### 2.3 MICROPOLUENTES EMERGENTES

São definidos como poluentes orgânicos emergentes qualquer substância química natural ou sintética, que no perpassar de sua história não eram monitorados e também não eram considerados poluentes de risco. Percebe-se que essas substâncias, mesmo em baixas concentrações, oferecem risco a saúde humana e ao meio ambiente (FILHO *et al.*, 2007).

Assim, pode-se caracterizar como micropoluentes emergentes grupos de fármacos, produtos de beleza, produtos químicos industriais, pesticidas e os hormônios naturais e sintéticos. Essas substâncias são utilizadas no cotidiano da sociedade moderna e, por isso, suas concentrações aumentaram significativamente nos ecossistemas aquáticos nas últimas décadas (GHISELLI, 2006).

Estes produtos químicos orgânicos sintéticos foram desenvolvidos para o emprego de benefícios à sociedade, mas a sua ocorrência no meio ambiente pode causar riscos potenciais à saúde humana e aos ecossistemas aquáticos (FILHO *et al.*, 2007).

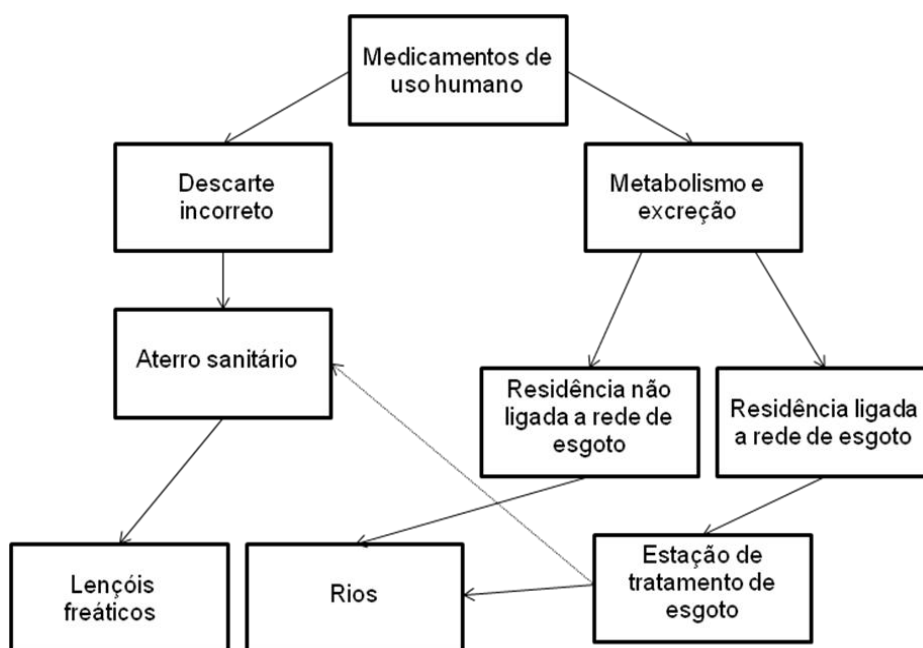
Nota-se que uma porcentagem significativa dos diferentes poluentes encontrados nos corpos de água superficiais ou subterrâneos é proveniente das águas residuais, das estações de tratamento de esgoto municipal ou industrial (WANG; CHEN; KANG, 2001).

Muitos compostos ainda não são considerados problemáticos na atualidade pelo desconhecimento de seus efeitos fisiológicos no ambiente e nos humanos, isso porque o desenvolvimento e evolução de compostos bioativos ocorrem de forma rápida, sendo que em muitos casos, os mecanismos de ação são novos para os sistemas biológicos (HESS, 2010).

Os fármacos, também chamados de drogas médicas, são produtos de diferentes categorias, os quais têm sido consumidos anualmente por toda a população mundial em grande quantidade, independente da classe econômica (TAMBOSI *et al.*, 2010).

Este grupo de composto é dividido em diferentes classes, tais como: os antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, anti-inflamatórios, antidepressivos, antiepiléticos, agentes quimioterápicos, as drogas contraceptivas e os reguladores endócrinos (FILHO *et al.*, 2007).

Para compreender a rota de entrada dos fármacos no ambiente, pode-se observar a FIGURA 1 que mostra como os resíduos de medicamentos chegam a águas superficiais e lençóis freáticos.



**FIGURA 1.** Rotas simplificadas da entrada de fármacos nos ambientes aquáticos.

Fonte: Kümmerer (2011)

São utilizados em diferentes formas pelo ser humano, como por exemplo, na forma inalável, ingerida por via oral, injetável e por infusões. Quando absorvidos pelo corpo, os fármacos são distribuídos no organismo. Assim após a absorção, uma parte da dose é biotransformada e posteriormente ocorre a eliminação do organismo, tanto do produto biotransformado, quanto da forma inalterada (TAMBOSI *et al.*, 2010; GHISELLI; JARDIM, 2007; COLAÇO *al et.*, 2014).

Investigações desenvolvidas sobre a presença de fármacos em matrizes aquosas têm sido realizadas em diversos países, entre eles pode-se citar Áustria, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha e Estados Unidos (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998; HEBERER, 2002). As matrizes mais pesquisadas são efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgoto (TERNES, 1998; STUMPF *et al.*, 1999; XIU-SHENG *et al.*, 2002; KOUTSOUBA *et al.*, 2003; BOYD, *et al.*, 2003; ANDREOZZI; MAROTTA; PAXEUS, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2003; HILTON *et al.*, 2003; PETROVIC *et al.*, 2003; TRENHOLM *et al.*, 2006; GÓMEZ *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2009), água de superfície (TERNES, 1998; HIRSCH *et al.*, 1999; STUMPF *et al.*, 1999; OLLERS *et al.*, 2001; TERNES; BONERZ; SCHMIDT, 2011; BOYD, *et al.*, 2003; HILTON *et al.*, 2003; WEIGEL; KALLENBORN; HÜHNERFUSS, 2004), contaminação em água potável (BOYD, *et al.*, 2003; PETROVIC *et al.*, 2003) em menor número, na água do mar (TRENHOLM *et al.*, 2006), estuários (THOMAS; HILTON, 2004) e sedimento de rios (LÖFFLER *et al.*, 2003). Trabalhos nos mostram que um número pequeno desses contaminantes é encontrado em água potável doméstica, provavelmente devido à carência de monitoramento e aos limites de detecção muito baixos para a análise de rotina.

A TABELA 1 apresenta um resumo de uma seleção de trabalhos publicados na literatura envolvendo a ocorrência de resíduos psicofármacos no meio ambiente nos últimos 15 anos.

**TABELA 1.** Ocorrência e níveis de psicofármacos encontrados no ambiente pelo mundo (continua).

<b>Fármaco detectado</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Matriz aquosa e local</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Diazepam	máx. 0,0235	Água potável	Itália	Zucatto <i>et al.</i> , 2000
	máx. 0,0012	Rio		
Diazepam	máx. 0,053	efluentes de ETE	Alemanha	Ternes <i>et al.</i> , 2001
	0,033	Rio/córrego		
Carbamazepina	0,002	água do mar	Alemanha	Weigel <i>et al.</i> , 2001

**TABELA 1.** Ocorrência e níveis de psicofármacos encontrados no ambiente pelo mundo (continuação).

<b>Fármaco detectado</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Matriz aquosa e local</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Fluoxetina	máx. 0,012	água de córrego	EUA	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
Carbamazepina	máx. 0,95 máx. 0,60	afluente de ETE efluente de ETE	Espanha e Croácia	Petrovic <i>et al.</i> , 2003
Carbamazepina	máx. 0,048	efluente de ETE	USA	Soliman <i>et al.</i> , 2004
Carbamazepina	máx. 1,68	afluente de ETE efluente de ETE	Suécia	Bendz <i>et al.</i> , 2005
Carbamazepina	máx. 0,0751	água de rio	Romênia	Moldovan <i>et al.</i> , 2006
Diazepam	máx. 0,0336			
Codeína	máx. 0,053			
Carbamazepina	máx. 0,145	efluente de ETE	Coréia e Estados Unidos	Trenholm <i>et al.</i> , 2006
Diazepam	máx. 0,274	afluente de ETE		
Carbamazepina	máx. 0,008	efluente hospitalar	Espanha	Gómez <i>et al.</i> , 2007
Carbamazepina	máx. 0,31 máx. 0,23	afluente de ETE efluente de ETE	Espanha	Gómez <i>et al.</i> , 2007
Fluoxetina	0,064	Rio	Espanha	Fernandez <i>et al.</i> , 2010
Carbamazepina	0,104			
Clorpromazina	máx. 0,018			
Flufenazina	máx. 0,018			
Fenitoína	máx. 0,009			
Carbamazepina	0,078	Rio	China	Daí <i>et al.</i> , 2015
Fluoxetina	0,0131	Rio	Austrália	Birch <i>et al.</i> , 2015
Carbamazepina	máx. 0,0002			
Tramadol	0,0013			
Venlafaxine	0,0138			
Codeína	0,005			

Fonte: A autora (2015)

Embora a preocupação em verificar a presença de fármacos no meio ambiente seja motivo de vários trabalhos científicos ao nível mundial, no Brasil existem poucos dados na literatura sobre a ocorrência dessas substâncias em amostras ambientais (RAIMUNDO, 2011; (GHISELLI; JARDIM, 2007; COLAÇO *et al.*, 2014; BÖGER *et al.*, 2015).

Em uma revisão de literatura foi possível ver os locais já estudados no país nesses últimos 15 anos. Somente oito estudos de quantificação de poluentes emergentes de origem farmacêutica foram realizados neste período no Brasil. Entre esses estudos só três fazem pesquisa de psicofármacos em matrizes aquosas (TABELA 2). Além disso, a região sul possui somente um estudo em águas residuais de hospitais, não havendo pesquisa em rios nesta região (BÖGER *et al.*, 2015).

**TABELA 2.** Psicofármacos encontrados em matrizes aquosas brasileiras.

Fármaco detectado	Conc. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Matriz aquosa e local	Procedimento analítico aplicado	Referência
Carbamazepina	0,12	Rio Monjolinho, São Carlos – SP	HPLC-MS	Campanha <i>et al.</i> , 2015
Bromazepam	0,14	Efluente do HU da UFSM, Santa Maria-RS	HPLC-MS	Almeida <i>et al.</i> , 2013
Carbamazepina	0,47			
Clonazepam	0,06			
Diazepam	0,58			
Lorazepam	0,05			
Carbamazepina	0,62	Rio Negro, Manaus-AM	HPLC-MS	Thomas <i>et al.</i> , 2014
Citalopram	0,07			
Amitriptilina	0,02			
Sertralina	0,16			

Fonte: Adaptado de BÖGER *et al.*,(2015)

## 2.4 EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NO MEIO AQUÁTICO

A presença de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Este efeito pode ocorrer em qualquer nível da hierarquia biológica, tais como célula, órgão, organismo, população e ecossistema, e pode ser observado em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ . Algumas drogas endócrinas ativas possuem um potencial biológico extremamente alto em baixas doses ao dia, assim é muito provável que esses compostos possam também afetar o meio ambiente em baixas concentrações. Sendo assim, os efeitos ambientais desses contaminantes são as interações deles com os receptores específicos de cada organismo (THIBAUT *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010).

Estudos revelam que o peixe zebra tem 86%, *Daphnia* sp 61% e algas verdes 35% dos genes comuns ao homem, genes esses responsáveis por sintetizarem alvos de ligação de fármacos no homem. A presença e a ausência prevista desses genes vão de encontro com dados experimentais publicados sobre o potencial de interação drogas - alvo específica em várias espécies (THIBAUT *et al.*, 2006; GUNNARSSON *et al.*, 2008).

Além disso, os alvos individuais de fármacos, especialmente enzimas, apresentaram-se bem conservados em várias espécies, sugerindo que os testes em organismos evolutivamente distantes seriam relevantes para determinadas drogas ( THIBAUT *et al.*, 2006; GUNNARSSON *et al.*, 2008).

O sistema endócrino dos animais pode ser afetado pelo sistema nervoso e vice-versa. Todos os animais, com exceção dos protozoários e esponjas, possuem sistema nervoso. Dentre os invertebrados, os artrópodes apresentam o seu sistema nervoso bem desenvolvido. Fármacos que tenham efeitos no sistema nervoso sejam no central e/ou periférico, podem induzir efeitos adversos em parâmetros como equilíbrio, causar tonturas, tremores, afetar o comportamento e vigilância. A alteração deste último pode fazer com que alguns animais fiquem mais vulneráveis a predadores (SUMPTER, 1998).

Para peixes machos da espécie *Gambusia holbrooki* expostos ao diazepam, em teste agudo de 96 h, foi observado mudanças comportamentais

anormais (letargia e movimentação anômala) e alteração na pigmentação (NUNES *et al.*, 2008).

A carbamazepina pode ser uma droga letal para peixes-zebra e produz alterações sub-letais em *Daphnia* sp. Em relação a organismos aquáticos, pode deduzir-se que a carbamazepina têm tendência prejudicial, visto que a maior parte dos dados é referente à toxicidade aguda em concentrações entre 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> (SANTOS *et al.*, 2010).

Nentwig *et al* (2003) realizaram testes de ciclo de vida e testes de reprodução com invertebrados, *Lumbriculus variegatus* e *Chironomus riparius*, para examinar efeito sub-letal de carbamazepina. Neste estudo, a carbamazepina inibiu formação de pupa de *Chironomus*, através de determinados mecanismos. Este medicamento pode adiantar o ciclo de reprodução e aumentar a quantidade de descendentes, sugerindo induzir efeitos estimulantes no desenvolvimento. Portanto, o investigador sugeriu o seu papel como um desregulador endócrino. A carbamazepina foi também definida como um inibidor de histona-desacetilases (HDAC). HDACs são importantes na regulação da expressão gênica (BEUTLER *et al.*, 2005).

Na TABELA 3, pode-se observar os valores encontrados na literatura de LC<sub>50</sub>, concentração das substâncias que matam 50% dos animais durante o período de observação em 24h, para psicofármacos. Entretanto, essa tabela nos alerta para os efeitos agudos sofridos pelos diversos organismos, às vezes, com doses muito mais altas ao encontrado no meio ambiente. O importante é notar que tais medicamentos podem se acumular no organismo lentamente por várias gerações e se manifestar em uma condição irreversível, que só é frequentemente notada, em descendências futuras, afetando a sustentabilidade populacional dos organismos aquáticos. Vários, e quase insignificantes efeitos, são notados a partir a primeira exposição. A exposição contínua a concentrações subterapêuticas de drogas durante o ciclo de vida de vertebrados aquáticos e invertebrados é a situação mais preocupante e com poucos estudos até o momento (SANTOS *et al.*, 2010).

**TABELA 3.** Experimentos de ecotoxicidade de LC<sub>50</sub> (24h) em diferentes animais.

Substância	24h LC <sub>50</sub> mg L <sup>-1</sup>				Referência
	Peixes ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> / <i>Lepomis macrochirus</i> )	Crustáceo ( <i>Artemia salina</i> )	Alga ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Micro crustáceo ( <i>Daphnia magna</i> )	
Amitriptilina	-	36,9	-	0,8	Calleja <i>et al.</i> , 1994
Anfetaminas	-	-	-	4,9	Calleja <i>et al.</i> , 1994
Carbamazepina	-	-	33,6	13,8	Calleja <i>et al.</i> , 1994.
Clorpromazina	6	14,5	100	-	Park, 2012
Diazepam	-	64,4	2,54	4,3	Coats <i>et al.</i> , 1976; Henrik Lilius, 1994
Fluoxetina	2	-	0,001	0,82	Brooks <i>et al.</i> , 2003
Fenobarbital	-	10000	-	1463	Calleja <i>et al.</i> , 1994
Lítio	-	4318	-	197	Calleja <i>et al.</i> , 1994
Paroxetina	2	-	-	-	FDA-CDER. 1996

Fonte: A autora (2015)

Sodré, Locatelli e Jardim (2009), em um estudo na capital do país, mostraram que alguns dos compostos estudados, quando comparados a outras regiões do planeta, apresentavam concentrações maiores. Além disso, os padrões de potabilidade da água no Brasil e em outros países são baseados na toxicidade isolada de compostos, critério que se mostra falho, quando se deveria levar em consideração a interação e/ou sinergia de compostos orgânicos, bem como a exposição contínua a estes, mesmo que em baixas concentrações.

As evidências observadas em estudos envolvendo moluscos, crustáceos, peixes, répteis, pássaros e alguns mamíferos têm sugerido que possíveis alterações na saúde humana envolvendo o sistema reprodutivo tais como câncer de mama e de testículo, além da infertilidade masculina, podem estar relacionadas à exposição à micropoluentes emergentes (CUNNINGHAM *et al.*, 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007). Alguns micropoluentes emergentes possuem efeito cumulativo e, em concentrações altas, são letais (CUNNINGHAM *et al.*, 2006).

Um ponto importante acerca da exposição ambiental por fármacos é que estes são idealmente planejados para que tenham boa estabilidade ou meia-vida prolongada. Tal fato, somado a outras propriedades físico-químicas,



conferem a este grupo elevada tendência a bioacumulação. Um percentual de 30% dos fármacos desenvolvidos é lipofílico, sedimentando-se em ambientes aquáticos ou transferindo-se para a fase biótica (GIL; MATHIAS, 2005).

## 2.5 HIDROGRAFIA DE CURITIBA

Curitiba é a capital do Paraná, um dos três Estados que compõe a Região Sul do Brasil. Em Curitiba existem cinco sub-bacias contribuintes da margem direita do rio Iguaçu (Bacia do Alto Iguaçu): sub-bacia do rio Passaúna, do rio Barigui, do rio Belém, do Ribeirão dos Padilhas e do rio Atuba (FIGURA 2). Existe também dentro do Município uma área de contribuição direta no rio Iguaçu denominada Bacia do Iguaçu. É importante destacar que, dessas bacias hidrográficas as únicas que nascem e possuem sua foz dentro do município são a do rio Belém e do ribeirão dos Padilhas. As demais possuem sua nascente em outros municípios e, em alguns casos, deságuam no rio Iguaçu fora do território de Curitiba, como a do rio Passaúna (SAMPAIO, 1998).



**FIGURA 2.** Sub-bacias hidrográficas do município de Curitiba

Adaptado de FORTUNATO (2006).

Embora a quantidade de recursos hídricos seja abundante, sua qualidade é comprometida devido a uma infra-estrutura de esgotamento sanitário ainda precária, ocupações irregulares nas margens dos rios, presença de lixo, assoreamento, entre outros (SAMPAIO, 1998).

#### 2.5.1 Sub-bacia do Passaúna

O rio Passaúna é afluente pela margem direita do rio Iguaçu. Nasce no Distrito de Marmeleiro em Almirante Tamandaré e possui 48,3 km de extensão. Divide o Município de Curitiba, na sua porção oeste, com os Municípios de Campo Magro e Campo Largo e deságua no rio Iguaçu no Município de Araucária (IAP, 2005).

No Município de Curitiba, a sub-bacia do rio Passaúna possui extensão territorial de 37,9 km<sup>2</sup>. A sua bacia hidrográfica abrange uma extensão territorial de cerca de 217 km<sup>2</sup> (IAP, 2005).

Em Curitiba estão contidos na sub-bacia do rio Passaúna, os bairros São Miguel, Augusta, Riviera, parte do Orleans, parte do São Braz, o Butiatuvinha e Lamenha Pequena (IAP, 2005).

#### 2.5.2 Sub-bacia do Barigui

A sub-bacia do rio Barigui está confinada entre as bacias do rio Atuba, Belém e do Ribeirão dos Padilhas a leste e o rio Passaúna a oeste. O rio Barigui nasce na Serra da Betara, próximo à divisa dos municípios de Almirante Tamandaré e Rio Branco do Sul, na cota aproximada de 1.080 metros. Possui uma extensão aproximada de 60 km entre suas nascentes e a foz do rio Iguaçu, a 870m de altitude, cortando o município de Curitiba por aproximadamente 45 km (IAP, 2005).

Sua bacia hidrográfica apresenta forma alongada e estreita com largura variando entre 4 e 9 km e padrão de drenagem predominante dendrítico. A área de drenagem da bacia do rio Barigui é de 279,11 km<sup>2</sup>, sendo 140,8 km<sup>2</sup> no Município de Curitiba (IAP, 2005).

A sub-bacia do rio Barigui faz divisa com os Municípios de Rio Branco do Sul, Almirante Tamandaré, Campo Largo, Araucária, Fazenda Rio Grande e Colombo (IAP, 2005).

Em Curitiba, ele inicia seu caminho pelo bairro Abranches, passando pelo Taboão, Pilarzinho, Vista Alegre, Cascatinha, Santo Inácio, até formar os Parques Tanguá, Tingui e Barigui. Depois ele continua percorrendo a cidade passando pela Cidade Industrial alcançando o Rio Iguaçu, na divisa com o Município de Araucária (IAP, 2005).

### 2.5.3 Sub-bacia do Belém

A sub-bacia do Rio Belém é uma das mais importantes, pois ocupa uma área de drenagem de 87,80 km<sup>2</sup>, equivalente a 20,32% da área total da cidade que é de 432km<sup>2</sup> (ANDREOLI, 2000).

Na sub-bacia do rio Belém existem quatro parques: o Parque São Lourenço – de drenagem superficial, o Bosque do Papa – trecho canalizado do rio, o Passeio Público e o Jardim Botânico. Outras áreas de preservação, de recreação e lazer para a comunidade também podem ser destacadas: a Ópera de Arame, a Pedreira Paulo Leminski, ambas nas proximidades do Parque São Lourenço; a Universidade Livre do Meio Ambiente – UNILIVRE e o Bosque do Alemão, próximo à nascente do rio Pilarzinho, tributário do rio Belém (IAP, 2005).

O rio Belém é um rio genuinamente curitibano com extensão de 17,13Km. Nasce no bairro Cachoeira, atravessa a cidade de norte a sul, percorrendo vários bairros da cidade até desaguar no rio Iguaçu, no bairro Boqueirão (IAP, 2005).

A sua nascente principal, no Bairro da Cachoeira, situa-se numa área pública, onde foi implantado o Parque Nascente do Belém, como forma de proteger a área e contribuir para a recuperação do rio. No seu percurso passa pelo Parque São Lourenço, depois pelo Bosque do Papa e começa a ser canalizado no Bairro Centro Cívico. No ponto onde ele reaparece ao lado da Rodoferroviária, podemos observar a foz de dois afluentes importantes que estão canalizados, o rio Ivo e o rio Juvevê. A foz do rio Belém encontra o rio

Iguaçu no bairro do Boqueirão, dentro do Município de Curitiba, atrás da estação de Tratamento de Esgoto da SANEPAR (ANDREOLI, 2000).

Na cidade a maior parte dos rios não possui nome, sendo muitas vezes confundidos com valetas a céu aberto. O rio Belém possui 46 afluentes e 12 sub-bacias, como é possível ver na FIGURA 3, sendo que os principais afluentes são: o rio Bigorrrilho, rio Ivo, rio Água Verde, rio Juvevê, rio Vila Guaíra e rio Areiãozinho (ANDREOLI, 2000).



**FIGURA 3.** Sub-bacia da bacia do rio Belém

**Fonte:** Adaptado de FORTUNATO (2006).

O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) realiza a avaliação da qualidade, através de análise e parâmetros físico-químicos e bacteriológicos desde maio de 1991, das águas de rios das Bacias do Altíssimo Iguaçu, bacia na qual o rio Belém está inserido. Atualmente monitora 68 trechos, em 39 rios, que foram agrupados em sete subsistemas, o rio Belém encontra-se no subsistema 3, que abrange os rios que drenam uma área de maior adensamento populacional (IAP, 2005).

O último relatório divulgado sobre a qualidade das águas em Curitiba e RMC-IAP, enquadra 83% das amostragens realizadas na sub-bacia do Belém como poluída (Classe 4) desde 1992, devido à presença de poluentes acima dos limites da Classe 2 (Fósforo, Nitrogênio amoniacal, DBO e *Escherichia coli*), bem como o baixo teor de Oxigênio. Outra parte da sub-bacia é classificada como “extremamente poluída”, nos últimos anos de monitoramento. Esta classe representa que parte da bacia está fora das classes de enquadramento da CONAMA, não atendem aos limites das classes para os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos. Os parâmetros físico-químicos extrapolam os limites da Classe 4 (IAP, 2005).

Os índices de qualidade da água (IQA) podem ser classificados em 7 grupos, comparáveis à classificação determinada pela Resolução CONAMA n°. 357, de 17 de março de 2005: Muito boa (Classe 1), Boa (Classe 2), Pouco poluída (Classe 3), Medianamente poluída (Classe 3), Poluída (Classe 4), Muito poluída (Fora de Classe), Extremamente poluída (Fora de Classe) (IAP, 2005).

Considerados os parâmetros ecotoxicológicos, as 3 estações do rio Belém apresentam toxicidade aguda para o organismo *Daphnia magna*. A conclusão desse relatório aponta o rio Belém, dentre os afluentes monitorados na margem direita do rio Iguaçu, como o mais impactado pela urbanização da cidade de Curitiba (IAP, 2005).

Os dados demográficos da sub-bacia do Rio Belém demonstram a existência de 184.363 domicílios regulares que correspondem a 539.622 habitantes. Os assentamentos espontâneos possuem 4.623 domicílios, os loteamentos clandestinos 581 domicílios e os assentamentos do Programa PROLOCAR 149 domicílios (IAP, 2005).

Na sub-bacia do Rio Belém praticamente, 100% dos domicílios são atendidos por rede de água. Conforme informação fornecida pela SANEPAR, o atendimento por rede de esgoto às moradias regulares é de aproximadamente 90% na bacia com a ETE Belém ao final dela (IAP, 2005).

#### 2.5.4 Sub-bacia Riberão dos Padilhas

Possui área de drenagem de 33,8 km<sup>2</sup> e abrange total ou parcialmente os seguintes bairros: Capão Raso, Xaxim, Pinheirinho, Sítio Cercado, Alto Boqueirão e Ganchinho. O ribeirão dos Padilhas possui 10,2 km de extensão, nasce no bairro Capão Raso próximo à Avenida Winston Churchill, que é o divisor de águas naquele ponto com a sub-bacia do Rio Barigui, e deságua no rio Iguaçu no bairro Ganchinho, em Curitiba (IAP, 2005).

#### 2.5.5 Sub-bacia do Atuba

O rio Atuba é junto com o rio Iraí um dos formadores do rio Iguaçu, do qual é afluente pela margem direita. A sua bacia hidrográfica abrange 128,6 km<sup>2</sup> de área de drenagem, sendo que no município de Curitiba a área de drenagem corresponde aproximadamente a 63 km<sup>2</sup>. Seu principal contribuinte no município é a sub-bacia do rio Bacacheri, com área aproximada de 30 km<sup>2</sup> (IAP, 2005).

O rio Atuba nasce em Colombo no Distrito de Boichininga, localidade que se situa entre os municípios de Almirante Tamandaré e Colombo. O rio está no limite do Município de Curitiba e Pinhais, e possui 29,5 km de extensão. Localizam-se, nesta sub-bacia, partes dos municípios de Almirante Tamandaré, Colombo, Curitiba e Pinhais. Nas cabeceiras da sub-bacia do rio Atuba encontra-se parte da formação geológica que constitui o Aquífero Karst, um dos mananciais abastecedores de água potável da Região Metropolitana de Curitiba (RMC) (IAP, 2005).

### 2.6 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

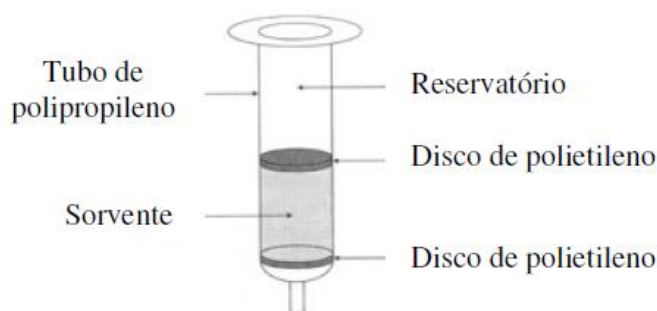
As baixas concentrações ambientais de fármacos (na faixa de ng L<sup>-1</sup> a µg L<sup>-1</sup> ou pg g<sup>-1</sup> a ng g<sup>-1</sup>) associadas a matrizes complexas (efluente e afluente de esgoto, água de superfície e sedimento) exigem investimento sobre o trabalho analítico, para determinação eficiente desses compostos (BILA; DEZOTTI, 2003).

Assim, o desafio é desenvolver e validar métodos analíticos que possam determinar baixas concentrações de fármacos e seus metabólitos em matrizes ambientais complexas.

A análise de fármacos compreende basicamente as etapas de extração e pré-concentração do analito, eliminação de interferentes, separação, detecção e quantificação dos analitos (LANÇAS, 2004).

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão sendo empregada no preparo de amostras complexas. Suas inúmeras aplicações somente são possíveis devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e mecanismos de separação. Na análise de amostras ambientais a SPE tem sido muito utilizada na extração e pré-concentração de fármacos (LANÇAS, 2004).

Essa técnica emprega sorventes recheados em cartuchos nas formas de discos ou seringa. A eluição da amostra ocorre por gravidade ou pressão com o auxílio de uma seringa ou bomba a vácuo. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50-500 mg de sorvente, com 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. O esquema básico de um cartucho de SPE está apresentado na (FIGURA 4) (LANÇAS, 2004).



**FIGURA 4.** Cartucho típico empregado em SPE

FONTE: LANÇAS (2014)

O sistema de extração em fase sólida pode ser realizado em linha (*on-line*) ou fora da linha (*off-line*). No sistema fora da linha a etapa de extração

e/ou pré-concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico (LANÇAS, 2004). Após o preparo a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor como qualquer outra amostra. Já no sistema em linha a etapa de extração e/ou pré-concentração é realizada em um sistema acoplado ao sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios (LANÇAS, 2004).

Entre os principais modos de operação na SPE pode se destacar:

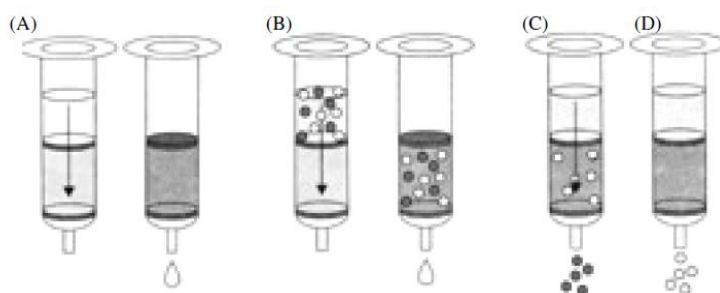
(a) concentração do analito, onde o objetivo principal é passar através do cartucho, um grande volume de amostra, a fim de aprisionar somente o analito;

(b) isolamento do analito (*clean-up*), no qual o objetivo é isolar o analito dos interferentes e não pré-concentrar os analitos;

(c) isolamento da matriz, onde a intenção é reter os interferentes da matriz e não o analito e

(d) estocagem da amostra muito usada para evitar o transporte de grandes volumes de amostras.

As etapas envolvidas na SPE (FIGURA 5) podem ter pequenas variações dependendo do modo de operação, mas basicamente são divididas em quatro etapas (LANÇAS, 2004):



**FIGURA 5.** Principais etapas empregadas em SPE, visando o isolamento de um composto

FONTE: LANÇAS (2014)

Primeiramente ocorre o condicionamento do cartucho (A) com a ativação do sorvente, com solvente adequado. Para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra, deixando os sítios ativos disponíveis, sendo que o material contido no cartucho não pode secar. A secagem pode



criar vários problemas, como caminhos preferenciais, comprometendo a separação.

A introdução da amostra (B) depende do volume de amostra ( $\mu\text{L}$  até L) que pode ser feita com pipeta, micropipeta ou seringa. A transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa e lenta para ter resultados reprodutíveis.

Após a introdução da amostra é necessária a limpeza da coluna (C) com solvente que é para retirar os interferentes, mas o solvente não deve possuir força para retirar o analito.

E na última parte (D) é ideal eluir com pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise.

As fases sólidas empregadas em SPE são similares aos da cromatografia líquida: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho (LANÇAS, 2004).

## 2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISES

A quantificação de fármacos em matrizes ambientais requer ferramentas analíticas sensíveis e eficientes para providenciar dados de confiança na separação, identificação e quantificação de várias moléculas (BILA; DEZOTTI, 2003). As técnicas cromatográficas mais utilizadas para análise de fármacos em amostra ambiental e biológica são a cromatografia líquida (LC) (TERNES, 1998; PETROVIC, 2014) e a cromatografia gasosa (BUCHBERGER, 2007). Sendo que a decisão entre usar a LC ou GC é usualmente baseada nas características físico-químicas do analito (BUCHBERGER, 2007).

Para cada técnica existem detectores bastante eficientes para uma detecção dos analitos. Para análises por LC os detectores mais comuns são o detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), detector por Arranjo de Diodos (DAD) e detector por Fluorescência (FL). Na GC

é o detector por ionização em chama (FID), detector de nitrogênio-fósforo (NPD) e detector de captura de elétrons (ECD)(HARRIS, 2008).

Além desses detectores pode-se destacar o uso do espectrômetro de massa (MS) e espectrômetro de massa em série (MS/MS), bastante utilizada nas duas técnicas cromatográficas (HARRIS, 2008).

A LC é uma técnica importante, pois a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para GC. A cromatografia líquida de alta eficiência usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas com partículas empacotadas muito pequenas, capazes de fornecer separações eficientes com altas resoluções (HARRIS, 2008).

A separação resulta de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida ou com líquido polar ou apolar ligado (chamada estacionária) que recheia o interior de uma coluna e uma fase móvel que atravessa a fase contida na coluna. Assim a fase móvel proveniente de um reservatório de solvente é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica. A análise inicia quando a amostra é introduzida no cromatógrafo por meio de uma válvula de injeção. A partir desta, a amostra é empurrada para a coluna pela fase móvel, onde ocorrerá a separação (HARRIS, 2008).

Após uma separação eficiente é necessário o uso de um método de detecção sensível. Para determinação de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{mg L}^{-1}$  o HPLC tem usado os detectores DAD, UV e/ou FL, no entanto, devido a diluição e a degradação dos fármacos, níveis muito baixos são esperados e assim para atingir limite de detecção na extensão de  $\text{ng L}^{-1}$  o uso de uma MS pode ser necessário (HARRIS, 2008).

Já a GC é um método de separação de componentes, que consiste de duas fases, onde uma permanece estacionária durante todo o processo (sólido ou líquido) e a outra se move (gás de arraste) através desta. Assim, a amostra é introduzida na coluna através de um injetor, onde o gás de arraste irá fluir e carregar a amostra, separando os componentes na coluna e estes terão sua

presença acusada e quantificada em detector disposto no final da mesma (HARRIS, 2008).

Segundo Moreira (2008), a metodologia de análise ideal deve ser rápida, exata, precisa, de fácil adaptação e consumir a menor quantidade de insumos possíveis. A maioria dos métodos para a determinação de micropoluentes em águas residuárias e superficiais tem utilizado a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC/MS/MS), que nos fornece uma maior sensibilidade de detecção. Apesar de tais métodos serem bastante eficientes na determinação de micropoluentes a níveis traços, o alto custo da instrumentação coloca esta técnica fora do alcance de muitos pesquisadores. Já a cromatografia líquida com detector de arranjo diodos (HPLC-DAD) é um sistema muito mais comum no meio laboratorial, embora pouco se tem publicado sobre métodos que o utilizem para a análise de rotina de fármacos e micropoluentes em matrizes ambientais.

## 2.8 LEGISLAÇÃO

Órgãos regulatórios internacionais como União Européia (EU), Agência de Proteção Ambiental do Norte da América (USEPA), Organização Mundial de Saúde (WHO) e Programa Internacional de Segurança Química (IPSC) publicam diretrizes e leis sobre matrizes ambientais. Emendas da USEPA na legislação sobre a qualidade da água potável obrigaram que fosse conhecido o potencial de atividade endócrina de um produto químico antes de o mesmo ser manufaturado, ou usado em processos que pudessem contaminar a água ou alimentos. Contudo, a legislação americana também não estabelece os limites de concentração para resíduos farmacológicos em corpos de água, somente para alguns resíduos como solventes, agrotóxicos, pesticidas, metais e materias radioativos (USEPA, 2013; BIRKETT; LESTER, 2003).

No Brasil, a legislação em vigor abrange a portaria do Ministério da Saúde nº2914/11 (padrões de potabilidade da água), a resolução CONAMA 357/05 (padrões de classificação de corpos de água) e a resolução CONAMA 430/11 (lançamento de efluentes) que não dispõem de valores limites sobre resíduos de fármacos, mas aborda parâmetros físico-químicos, metais,

solventes, agrotóxicos, pesticidas e contaminantes microbiológicos. Portanto, a preocupação está na possibilidade da remoção ineficiente destes compostos no tratamento de águas naturais para o abastecimento humano, bem como o impacto sobre a biota aquática (BÖGER *et al.*,2015).

A existência de legislação brasileira que estabeleça parâmetros para os micropoluentes farmacêuticos em matrizes aquosas é importante, porque isto refletirá diretamente na melhoria da qualidade da água com relação a este aspecto (BÖGER *et al.*,2015). Entretanto, para um serviço de qualidade e que consiga abranger a quantidade do volume de água tratada deve haver melhorias graduais no processo como um todo. Devem-se levar em conta os aspectos legais e institucionais vigentes, o planejamento, a operacionalização do sistema de gestão e monitoramento da qualidade da água, sempre acompanhado das peculiaridades e características econômicas de cada região ou território nacional (BRASIL, 2005).

Desde 1960, no Brasil, é utilizado o Índice de Qualidade das Águas (IQA) como uma ferramenta de síntese de um conjunto de variáveis ambientais ou parâmetros adequados, que resume em um único número o índice para facilitar o entendimento dos resultados (ZAGATTO *et al.*,1999; SILVA; JARDIM, 2006; SOUZA *et al.*, 2009). Atualmente, o IQA é o resultado de nove parâmetros (oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes fecais, nitrogênio total, temperatura, turbidez, resíduo total e pH), cada qual com sua respectiva importância (SOUZA *et al.*, 2009). Porém, a ferramenta apresenta limitações não contemplando a presença de uma série de substâncias como os medicamentos (SOUZA *et al.*, 2009; BRASIL, 2005).

Em alguns Estados brasileiros existe a complementação do IQA com o Índice de Qualidade das Águas para Abastecimento Público (IAP), que consiste na ponderação dos resultados do IQA com o ISTO (Índice de Substâncias Tóxicas Organolépticas); e o Índice de Proteção da Vida Aquática (IVA), composto pelo Índice de Parâmetros Mínimos para Proteção das Comunidades Aquáticas (IPMCA) e Índice do Estado Trófico (IET) (ZAGATTO *et al.*, 1999; BRASIL, 2005).

Frente a isso, a União Européia já apresenta métodos de monitoramentos destinados a avaliar a toxicidade crônica de certos produtos farmacêuticos e desreguladores endócrinos e, ainda, diretrizes que orientam e estabelecem níveis seguros de concentrações de substâncias farmacêuticas de uso veterinário no meio ambiente (ARIESE *et al.*, 2001). Porém, evidências são insuficientes para a implementação de legislação que estabeleça padrões e concentrações limites (BARKETT *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos, para a aprovação de novos medicamentos, é necessário um estudo ambiental para a USFDA (*United States Food and Drug Administration*), órgão que regulamenta a presença de substâncias farmacêuticas no meio ambiente. Contudo, em termos de água potável, assim como o Brasil, a USEPA não possui uma regulamentação oficial para monitoramento de produtos farmacêuticos no meio ambiente (KOT-WASIK *et al.*, 2006; USEPA, 2013).

No entanto, para os próximos anos, acredita-se que alguns destes micropoluentes de origem farmacêutica venham a ser incluídos em programas nacionais de monitoramento ou até mesmo que tenham seus limites e critérios de lançamento estabelecidos por instrumentos legais.

Este fato seria impulsionado, pelo avanço das pesquisas que atualmente vêm avaliando a ocorrência dos micropoluentes emergentes no meio ambiente, os seus potenciais efeitos negativos a biota aquática e aos seres humanos e também o uso de técnicas para remoção destes contaminantes durante os tratamentos de água e esgoto.

## 2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é a comprovação, pelo fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido são atendidos. A validação de métodos analíticos tem por finalidade garantir, por meio de estudos experimentais, que a metodologia atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Existem vários guias e documentos orientadores publicados nacional e

internacionalmente. Podemos citar o protocolo harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC Internacional), *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC); protocolos propostos pela *United States Food and Drug Administration* (FDA), *United States Pharmacopeia* (USP), *International Conference on Harmonization* (ICH), EURACHEM, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (BERNARDES; SOUZA, 2011).

Apesar da existência de muitos guias, não há um procedimento oficial padrão para análise de compostos como os fármacos em matrizes aquáticas, bem como uma legislação que aponte parâmetros para esses compostos considerados contaminantes emergentes nos ambientes aquáticos. Além disso, existem muitas divergências entre as recomendações e muitas vezes elas são muito vagas permitindo assim ao analista a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser utilizado.

No Brasil há duas agências credenciadoras responsáveis por verificar a competência dos laboratórios de ensaio, a ANVISA e o INMETRO. A ANVISA criou a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003, onde estão apresentados os parâmetros de validação e seus respectivos limites que garantam confiabilidade dos resultados obtidos por determinado método para a determinação de fármacos em produtos farmacêuticos. Já o INMETRO disponibiliza um documento guia mais abrangente para o procedimento de validação de métodos analíticos, o INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 2007, o qual sugere uma conduta de validação sendo aberta a interpretação e adaptação do analista de acordo com o método a ser usado, além de que este documento trás os parâmetros necessários para análise de traços.

Os parâmetros de validação utilizados neste estudo são descritos de forma detalhada a seguir.

### 2.9.1 Especificidade/Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de

componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI *et al.*, 2004).

Em cromatografia a seletividade é obtida na prática otimizando as condições cromatográficas: polaridade e pH da fase móvel, fluxo de eluição, temperatura da coluna, recheio e fabricantes de coluna (LANÇAS, 2004).

Concomitantemente são avaliados parâmetros cromatográficos como: resolução, retenção relativa, fator de capacidade, simetria do pico e número de pratos teóricos. Uma maneira qualitativa de avaliar a especificidade envolve a adição de padrão analítico a uma amostra com interferentes (BRASIL, 2003, INMETRO, 2007).

Seletividade e especificidade são definidas pelo ICH e ANVISA com o mesmo significado. Apesar de gerar certa confusão, deve-se utilizar apenas o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC. Um método de separação que produz uma resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo, exibe graus de preferência para o analito (RIBANI *et al.*, 2004, VESSMAN, 1996).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada constantemente. Caso a seletividade do método não seja assegurada, os demais parâmetros de validação ficam comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004, VESSMAN, 1996).

### 2.9.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003, ICH, 2005).

Esse parâmetro é estabelecido pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, cada uma em triplicata, sem a inclusão do ponto zero. Os dados obtidos são plotados num gráfico da concentração encontrada

pela resposta do detector. Para análise da linearidade há necessidade de tratamento estatístico da reta encontrada, determinando o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (recomendado menor que 2,0%) (ICH, 2005, SHABIR, 2003).

O coeficiente de correlação fornece uma estimativa da qualidade da curva, pois quanto mais próximo do valor um, menor é a dispersão dos resultados e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Os critérios mínimos aceitos pela ANVISA são de um coeficiente de correlação maior que 0,99, contudo o FDA preconiza um coeficiente de correlação maior que 0,999.

### 2.9.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, o INMETRO define limite de detecção como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O LQ é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O LD e LQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Neste estudo para determinação dos limites foi utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica.

### 2.9.4 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003, ICH, 2005).

A precisão pode ser considerada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída).



a) Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade é grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas dentro de um curto período de tempo, efetuada por um mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo método, em outras palavras é a maior diferença no nível de 95% de confiança entre dois resultados obtidos nas mesmas condições. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, de um mínimo de nove determinações (em três níveis de concentrações), de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de seis determinações para uma única concentração teste (BRASIL, 2003, ICH, 2005).

b) Precisão intermediária (precisão inter-corrída)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. A precisão intermediária deve ter um desvio padrão relativo menor ou igual a 5% (BRASIL, 2003, ICH, 2005). A precisão intermediária tem maior representatividade na variabilidade dos resultados do método em comparação a repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

### 2.9.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2007). Segundo Ribani (2004), os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são os materiais de referência, ensaios de recuperação, adição de padrão e comparação de métodos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois indica a quantidade de determinado analito recuperado no processo em relação à quantidade real contida na amostra (SILVA, 2010).

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na

amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor recuperação e detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação (SILVA, 2010).

Pelo fato de outros componentes da matriz interferirem na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados. Devido a esse fato nos cálculos do ensaio de recuperação também são considerados o efeitos no sinal dos analitos pela matriz. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 2.9.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações, quando não é afetada por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, indicando sua confiança (BRASIL, 2003, ICH, 2005).

A ANVISA recomenda alguns fatores que devem ser variados para cromatografia líquida: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, e variações na temperatura e fluxo da fase móvel. Porém, não determina quanto cada fator citado pode ser variado, mas que essa variação não é significativa para influenciar na corrida analítica e a quantificação. Contudo Green (1996), afirmou que a variação do solvente orgânico na fase móvel deve ser de  $\pm 2\%$ , que o pH da fase móvel deve ser variado  $\pm 0,1$  unidade e a variação da temperatura do forno da coluna deve ser de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Métodos que tiveram durante seu desenvolvimento analítico variações de marca, fornecedores e equipamentos sem alteração significativa dos resultados apresentam uma robustez intrínseca (RIBANI *et al.*, 2004).

Diante de tais fatos, como: o aumento no consumo de medicamentos, o escasso número de trabalhos de quantificação de resíduos de psicofármacos

no Brasil, metodologias analíticas muito caras e legislação insuficiente é possível observar que o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos exatos, precisos e de fácil reprodutibilidade para determinação de micropoluentes de origem farmacêutica em amostras aquosas é de grande valia. Após uma preparação de amostra com pré-concentração é possível ver que são ferramentas mais baratas quando comparadas a um sistema LC-MS, podendo apresentar sensibilidades diferentes para distintos comprimento de onda e boa seletividade, sendo que esta última pode ser obtida utilizando-se comprimentos de ondas específicos para cada resíduo, podendo monitorar vários simultaneamente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de resíduos de psicofármacos em uma sub-bacia hidrográfica da cidade e sua relação com a dispensação por Centros de Atenção Psicossocial em Curitiba-PR.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento de quais são os psicofármacos mais dispensados pelo serviço público municipal através dos CAPS.
- Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação desses resíduos de psicofármacos em matrizes aquosas por SPE-HPLC-DAD.
- Identificar a localização dos CAPS em relação a uma sub-bacia hidrográfica.
- Realizar a extração, concentração e quantificação desses resíduos de medicamentos encontrados como mais dispensados em um rio em Curitiba.
- Contribuir com as ações dos serviços de saúde pública e meio ambiente por meio dos dados obtidos.
- Verificar a influência da sazonalidade na presença de resíduos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi dividido em quatro etapas. A primeira etapa foi à identificação de quais foram os medicamentos mais utilizados nos CAPS estudados de Curitiba entre os anos de 2011-2014. A segunda etapa o desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação dos compostos estudados utilizando SPE e HPLC-DAD. Na terceira etapa do trabalho foi à validação da metodologia e por fim, na quarta etapa, foi aplicada a metodologia validada em amostras de águas da sub-bacia escolhida, para pesquisar os medicamentos estudados.

### 4.1 PRIMEIRA ETAPA: IDENTIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS MAIS DISPENSADOS NOS CAPS DE CURITIBA

A busca de informações sobre a dispensação contou com a colaboração de um grupo multiprofissional, na qual me inseri, do Programa de Educação pelo Trabalho para a Saúde (PET-Saúde) que contemplou o campo de atuação profissional no SUS. A coleta de dados para este trabalho recebeu autorização da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba (SMS), igualmente responsável pela indicação dos CAPS a serem estudados. Isto se deve ao fato de que o mesmo faz parte das atividades realizadas no PET-Saúde, desenvolvido por UFPR/SMS/MS-2013-2015, voltado para a Rede de Atenção Psicossocial (RAPS), o qual teve projeto de pesquisa atrelado e aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal do Paraná, sob o nº CAAE 38629314.0.0000.0102 e SMS sob protocolo 16/2015.

A pesquisa quantitativa foi realizada em dois Centros de Atenção Psicossocial (CAPS) em Curitiba-PR, que são pontos de referência dentro da Rede de Atenção Psicossocial (RAPS). Um desses locais foi caracterizado, nos anos de 2011 a 2013, como CAPS III voltado para a área de Álcool e outras Drogas (AD), especificamente para o público infanto-juvenil, porém, em 2014, passou a atender Transtornos Mentais em geral, mantendo a mesma faixa etária dos usuários atendidos. Já o outro CAPS de estudo (Centro Vida), enquadrava-se como CAPS II durante o período de 2011 a 2013 e passou para

a categoria CAPS III em 2014, sempre com o atendimento voltado aos Transtornos Mentais (TM) em geral para o público adulto.

Tratou-se de um estudo retrospectivo com uso de dados secundários. Foram utilizados os Livros de Registro Específico de Medicamentos Controlados de cada um dos dois CAPS pesquisados, para a coleta de dados referentes ao período de 2011 a 2014. Sendo que os medicamentos citados nos livros e, portanto, pesquisados se enquadravam como “Substâncias Sujeitas a Controle Especial” e/ou como “Psicotrópicos” de acordo com a Portaria nº 344 de maio de 1998 e suas atualizações. Foram consideradas a denominação comum brasileira (DCB), a forma farmacêutica e as concentrações dos medicamentos dispensados.

## 4.2 SEGUNDA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

### 4.2.1 Limpeza da vidraria

Todas as vidrarias utilizadas passaram por uma sequência de lavagens (10 vezes água da torneira, 3 vezes álcool etílico, 10 vezes água deionizada e 10 vezes água ultra pura).

Posteriormente as vidrarias foram colocadas em um recipiente contendo ácido nítrico (10 %). Em seguida foi realizado novamente a sequência de lavagens com diferentes tipos de água até a completa remoção do ácido nítrico e finalmente as vidrarias foram secas em estufa a 60°C e, quando volumétricas, secas ao ar.

### 4.2.2 Reagentes e consumíveis

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, adquiridos da J. T. Baker: acetonitrila e metanol grau HPLC (99,99 %). A água ultra pura utilizada foi obtida através de um sistema de purificação (Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA).

Para o preparo da solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram pesados 1,3600 g de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 99,0% J.T.Baker) em balança semi-analítica (OHAUS Adventure ProAV264P) e dissolvidos em 1000 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 3,50 com ácido ortofosfórico

(85% J.T.Baker), monitorado com o auxílio de pHmetro (Ohaus Starter 2100). Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica previamente calibrada e limpa.

As soluções de padrões estoque foram preparadas 100 mg L<sup>-1</sup> em metanol grau HPLC, pesando-se 1,00 mg dos padrões em balança analítica (Sartorius CP225D com precisão de ± 0,01 mg), e diluindo-os em 10 mL de metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sobre refrigeração a -4°C. A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho através da diluição em água. Os padrões estão apresentados na TABELA 4.

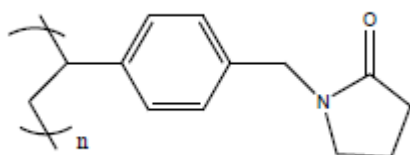
**TABELA 4.** Características dos padrões utilizados

Composto	Formula Molecular	Marca	Pureza	CAS <sup>1</sup>
Carbamazepina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	USP	99,7%	298-46-4
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	USP	100,13%	30-14-5
Cloridrato Clorpromazina	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> S.HCL	USP	100%	69-090-0

<sup>1</sup>CAS: Chemical Abstract Service.

#### 4.2.3 Desenvolvimento da extração em fase sólida

Para a concentração das amostras, foi utilizado um sistema *manifold* da Waters (WAT200608) operado com bomba de vácuo (Tecnal TE-0581). Os cartuchos usados foram os Strata-X® (Phenomenex) 200mg de 3mL. O cartucho Strata X® é composto por um monômero contendo dois grupos diferentes, um hidrofílico composto pelo grupo pirrolidona e outro lipofílico composto pelo grupo benzila. Sendo assim, ele tem a capacidade de reter analitos polares e não-polares. A FIGURA 6 apresenta o grupo ligante do cartucho Strata X®. Esses cartuchos garantem uma boa extração especialmente de analitos mais básicos, como fármacos de uso psiquiátrico.



**FIGURA 6.** Grupo ligante do cartucho Strata X®

A secagem dos cartuchos e dos extratos das amostras foi realizada com fluxo gentil de nitrogênio comercial (White Martins) sob aquecimento a 40 °C.

As condições dos parâmetros do SPE para os diferentes níveis do planejamento foram definidos com base em trabalhos relatados anteriormente na literatura (TABELA 5).

**TABELA 5.** Parâmetros e condições avaliados para o planejamento fatorial.

Analitos	Adsorvente (quantidade)	Tipo de matriz (volume de amostra)	Condicionamento	pH	Eluição	Refêrencia
CZ	Superclean ENVI-18, (500mg/3 mL) Supelco	esgoto (500 mL)	3mL metanol, 3 mL água MilliQ	5.0	8mL Acetona- de etila Acetato (1:1, v/v)	Lin <i>et al.</i> , 2009
CZ, DZ	LiChrolut EN (200mg/3 mL) Merck	esgoto (500 mL)	6mL metanol, 6 mL água MilliQ	7.0	3mL metanol- de etila acetato (1:1, v/v)	Castiglioni <i>et al.</i> , 2006
CZ	Oasis HLB (600mg/3 mL) Waters	esgoto (500mL)	3mL metanol, 3 mL água MilliQ	5.0	2mL metanol	Lin <i>et al.</i> , 2009
CZ, DZ, CP	Oasis HLB (200mg/6 mL) Waters	água superficial (300mL)	10mL metanol, 10 mL água MilliQ	5.0	2x3 mL metanol	Huerta- Fontelaa <i>et al.</i> , 2010
CZ, DZ, CP	Oasis HLB (200mg/6 mL) Waters	água superficial (2L)	32mL diclorometano 32 mL metanol, 32 mL água MilliQ	7.0	32mL diclorometano- metanol (70:30, v/v)	Madureira <i>et al.</i> , 2010
CZ	Oasis HCX (60 mg/3 mL) Waters	água superficial e esgoto (500mL)	3 mL acetona, 3 mL de metanol , 3 mL água MilliQ	2.0	3ml acetona	Camacho- Munoz <i>et al.</i> , 2009
CZ	Strata X (200mg/3mL) Allcrom	água superficial (50mL)	10 mL de metanol, 1 mL de água MilliQ	4.0	2 mL metanol, 1,5mL acetona, 1,5 mL acetona	Birch <i>et al.</i> , 2015

Fonte: A autora (2015)

#### 4.2.3.1 Otimização do pH

Para a avaliação do pH, que foi variado em 4,00, 6,50 e 8,00, foram realizadas triplicatas, condicionando os cartuchos com 5,00 mL de metanol e com 5,00 mL de água nos respectivos pHs, passando-se 200,0 mL de de uma solução contendo 1,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  CP, 1,28  $\mu\text{g L}^{-1}$  DZ e 1,13  $\mu\text{g L}^{-1}$  CZ com vazão da ordem de 3,0 mL min<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio ou/e ácido



clorídrico. A eluição foi realizada com 5,00 mL de metanol. Todos os experimentos de SPE os eluatos foram secos sob aquecimento a 40 °C e fluxo de N<sub>2</sub>. Foram reconstituídos com 1,00 mL de água ultrapura.

#### 4.2.3.2 Otimização da concentração, volume de amostra e solvente de condicionamento e eluição

A avaliação da concentração, volume de amostra e solvente de condicionamento e eluição foram realizadas via planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com triplicata do ponto central, para se calcular a estimativa do desvio. Foram condicionados os cartuchos com 5,00 mL do solvente a ser otimizado, com 5,00 mL de água no pH 4,0. Passando-se 100mL, 200 mL ou 300mL de amostra com vazão da ordem de 3,0 mL min<sup>-1</sup>. Fortificadas em 3 níveis diferentes. Os valores dos níveis do planejamento foram definidos com base na literatura sendo que as condições estudadas estão melhor apresentadas na TABELA 6.

**TABELA 6.** Fatores e níveis do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> testados para a recuperação de CP, DZ e CZ em água no pH 4,00 empregando cartuchos StrataX®.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
<b>Concentração</b>	1,21 µg L <sup>-1</sup> CP	2,42 µg L <sup>-1</sup> CP	3,63 µg L <sup>-1</sup> CP
	1,28 µg L <sup>-1</sup> DZ	2,56 µg L <sup>-1</sup> DZ	3,84 µg L <sup>-1</sup> DZ
	1,13 µg L <sup>-1</sup> CZ	2,26 µg L <sup>-1</sup> CZ	3,39 µg L <sup>-1</sup> CZ
<b>Volume de amostra</b>	100 mL	200 mL	300 mL
<b>Solvente de eluição</b>	Acetonitrila (ACN)	ACN:MetOH (1:1)	Metanol (MetOH)

Fonte: A Autora (2015)

Todos os experimentos de SPE os eluatos foram secos sob aquecimento a 40 °C e fluxo de N<sub>2</sub>. Foram reconstituídos com 1,00 mL de água ultrapura.

#### 4.2.3.3 Otimização do volume de reconstituição

O volume de reconstituição foi avaliado univariadamente em água ultrapura. Os cartuchos foram condicionados com 5,00 mL de acetonitrila (ACN) e com 5,00 mL de água no pH 4, passando-se 100, mL de amostra fortificadas 1,21 µg L<sup>-1</sup> CP, 1,28 µg L<sup>-1</sup> DZ e 1,13 µg L<sup>-1</sup> CZ com vazão da ordem

de 3,0 mL min<sup>-1</sup>. A eluição foi realizada com 5,00 mL de ACN e os eluatos secos sob aquecimento a 40 °C e fluxo de N<sub>2</sub>, e reconstituídos com 0,250 mL, 0,500 mL e 1,00 mL de água ultrapura em triplicata.

#### 4.2.4 Desenvolvimento do método cromatográfico

Para a análise dos compostos, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC-DAD). O cromatógrafo líquido que possui uma bomba quaternária integrada com unidade de desgaseificação alta performance (Agilent 1260 Infinity). A primeira etapa do desenvolvimento do método consistiu na obtenção do espectro de varredura na região do UV-Vis dos psicofármacos, para obtenção do melhor comprimento de onda a ser usado na quantificação dos resíduos.

Para a separação cromatográfica foram testadas duas colunas C18 XBridge da Water-BEH, (100 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula 5 µm) e Zorbax Eclipse Plus (100 mm x 4,6 x tamanho de partícula 5 µm). Os critérios de comparação entre as colunas foram os parâmetros cromatográficos obtidos para os psicofármacos tais como: tempo de retenção, fator de capacidade, eficiência da coluna (medida em número de pratos teóricos), resolução, fator caudal e, por fim tempo, de corrida.

Após definição da coluna inicial fez-se a seleção da fase móvel que apresentasse a melhor capacidade de eluição dos psicofármacos de forma resolvida dentro de um período de tempo aceitável para uma corrida analítica.

A escolha da fase móvel na análise cromatográfica depende de alguns fatores: a afinidade que esta apresenta com os analitos de interesse e a compatibilidade da coluna com o solvente escolhido é determinante para uma boa resposta cromatográfica. Foram testadas algumas fases móveis com base nos registros encontrados na literatura (TABELA 7, próxima página), na tentativa de se encontrar a que apresentasse melhor resposta para todos dos analito.

**TABELA 7.** Parâmetros cromatográficos encontrados na literatura para a quantificação dos medicamentos estudados.

	<b>ANVISA, 2010</b>	<b>Camacho- Munoz et al., 2009</b>	<b>Fernandez et al., 2010</b>	<b>ANVISA, 2010</b>	<b>Madureira et al., 2010</b>
<b>Fármacos</b>	CZ	CZ	CP, CZ	DZ	CZ e DZ
<b>Matrizes</b>	preparações farmacêuticas	água superficial	água superficial	-	águas superficiais
<b>Fase estacionária</b>	C18	C18	C18	C18	C18
<b>Dimensão de partícula</b>	5 µm	5 µm	5 µm	5 µm	5 µm
<b>Dimensões da coluna</b>	250 x4,6 mm	150x4,6 mm	150x4.4mm	150x4,6 mm	250 x4,0 mm
<b>Fase móvel</b>	Metanol:água (70:30, v:v)	ACN: tampão fosfato	0,04% ácido acético glacial: ACN	Água: ACN:Metanol (4:4:2, v:v:v)	Água (1,5 ml.L <sup>-1</sup> TEA e pH ajustado com ácido ortofosfórico 85%):ACN
<b>pH</b>	-	2	5,5	-	4,5
<b>Volume de injeção</b>	20 µL	15µL	20 µL	20 µL	20 µL
<b>Fluxo</b>	1 mL min <sup>-1</sup>	1 mL min <sup>-1</sup>	0.5 mL min <sup>-1</sup>	0,8 mL min <sup>-1</sup>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura</b>	-	30 °C		30 °C	-
<b>Deteção</b>	UV a 230 nm	DAD 300nm	MS	UV a 254 nm	DAD (DZ 254 nm, CZ 286 nm)
<b>Método de separação</b>	Isocrático	Gradiente	Gradiente	Isocrático	Gradiente
<b>LD</b>	-	0.016 µg L <sup>-1</sup>	0.9 ng L <sup>-1</sup>	-	3,8µg L <sup>-1</sup> CZ, 13,3 µg L <sup>-1</sup> DZ
<b>LQ</b>	-	0.054µg L <sup>-1</sup>	2,6 ng L <sup>-1</sup>	-	15,0 µg L <sup>-1</sup> CZ, 40,0 µg L <sup>-1</sup> DZ

FONTE: A autora (2015)

Para tanto foram avaliadas as diferentes combinações de soluções aquosas com solventes orgânicos para compor a fase móvel. As soluções aquosas testadas foram: tampão fosfato pH 3,0, 3,5, e 4,0. Após a escolha do

melhor tampão e pH verificou-se a influência da concentração do mesmo (0,05M, 0,01M e 0,1M).

Os solventes orgânicos utilizados para os testes foram acetonitrila e metanol, por serem encontrados facilmente no laboratório. Essas fases móveis foram eluídas em diferentes proporções na forma isocrática e gradiente. Juntamente com o desenvolvimento da fase móvel foram testados diferentes fluxos de 0,3 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, verificando a influência nos resultados cromatográficos, a pressão do sistema, o consumo de fase móvel e o tempo de análise. A temperatura do forno foi variada de 25 a 30°C e os parâmetros cromatográficos foram monitorados para obtenção dos melhores resultados.

Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software OpenLab EZChrom Elite.

#### 4.3 TERCEIRA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os critérios apresentados nesse trabalho tiveram como principal referência as orientações do INMETRO DOQ-CGCRE-008, porque esse documento trás os parâmetros necessários para análises de traços, e a Resolução ANVISA RE n° 899, de 29 de maio de 2003.

##### 4.3.1 Seletividade

No desenvolvimento de método envolvendo a análise de vários compostos presentes em uma matriz complexa, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou coeluição de interferentes com os analitos de interesse, além de quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes na amostra.

Assim foram preparados dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração foram três para proporcionar uma comparação válida com os modelos estatísticos. As amostras foram fortificadas com CZ (500 µg mL<sup>-1</sup>), DZ (500 µg mL<sup>-1</sup>) e CP (500 µg mL<sup>-1</sup>). Com as áreas dos picos foi possível aplicar os testes  $F_{(95\% \text{confiança})}$  (*Snedecor*) de homogeneidade de

variâncias e o teste  $t_{(95\% \text{confiança})}$  (*Student*) de comparação de médias para verificar se a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo.

#### 4.3.2 Linearidade

Neste trabalho as curvas analíticas foram realizadas em triplicata em HPLC-DAD a partir da diluição das soluções estoque nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CZ (DAD 286 nm) e DZ (DAD 254 nm) e 1, 2, 5, 10, 20, 35, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CP (DAD à 254 nm). A análise dos dados foi com ajuda de um software estatístico (Origin®).

#### 4.3.3 Limites de detecção e de quantificação

A estimativa do LD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad (1)$$

Onde “s” é o desvio padrão do intercepto (coeficiente linear) com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. E “S” é a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular) (BRASIL, 2003).

Já o LQ pode ser calculado com uma relação de 10 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (2)$$

#### 4.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da determinação da precisão intermediária e repetibilidade, mediante a injeção de soluções padrões de CZ, DZ nas concentrações de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e como limite

inferior para CP  $110 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em triplicata em três dias diferentes para a precisão intermediária e em um mesmo dia para a repetibilidade.

Os resultados foram avaliados através do desvio padrão relativo e de ANOVA (one way), por ser mais que dois conjuntos de dados. Nos ensaios de precisão intermediária foi realizado o teste estatístico ANOVA (one way) comparando o desempenho do método em dias diferentes, em cada nível de concentração separadamente. Já na repetibilidade a comparação foi feita entre os 3 níveis de concentração. A análise estatística foi obtida com ajuda do software Excel®.

#### 4.3.5 Exatidão

Neste trabalho, a exatidão teve como objetivo avaliar a eficiência do SPE em amostras de água ultra pura (200mL). Nos estudos de recuperação, as amostras de água foram fortificadas em três níveis de concentração (50, 500,  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em triplicata para CZ e DZ. Para CP o menor nível de concentração avaliado foi  $110 \mu\text{g L}^{-1}$ . Após aplicação do processo de extração em fase sólida, as amostras foram avaliadas no método cromatográfico citado.

#### 4.3.6 Robustez

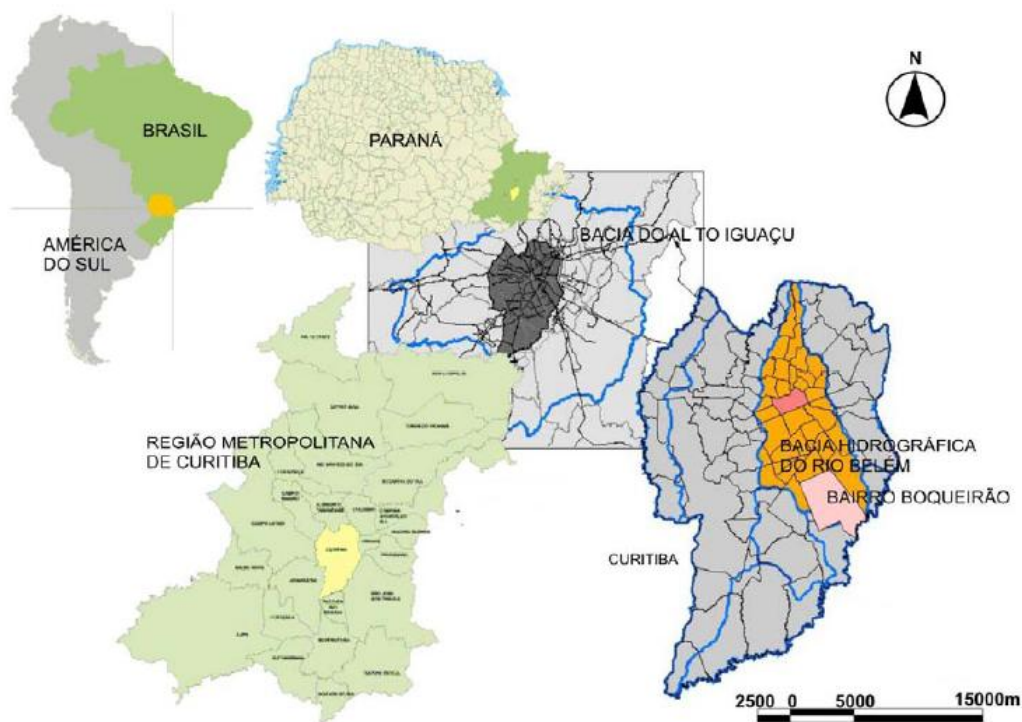
Para a realização deste ensaio foi feita mudanças no fluxo (0,3; 0,4; 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ ), temperatura (25, 30 e  $35^{\circ}\text{C}$ ), pH da solução de tampão fosfato ( $\pm 0,1$ ) e variações intrínsecas como lotes e marcas de fabricantes diversas. Os resultados obtidos no método modificado foram comparados com aqueles obtidos no método original. O método é considerado robusto quando os limites de precisão, exatidão e seletividade permanecem dentro dos critérios de aceitação após as modificações.

Em nossos ensaios, a resolução entre os picos cromatográficos foi utilizada para avaliar a seletividade, enquanto que o ensaio de recuperação, na avaliação da precisão e da exatidão do método frente às modificações. Além disso, o fator de cauda foi avaliado para verificar o desempenho do método frente a cada mudança realizada.

Os ensaios foram realizados pela injeção de uma triplicata de uma solução de trabalho contendo padrões nas concentrações  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de CP, DZ e CZ. A ferramenta estatística para analisar os resultados foi o desvio padrão relativo (DPR%).

#### 4.4 QUARTA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

O local de estudo foi escolhido através da localização geográfica dos CAPS estudados. O CAPS III se localiza na rua Cel. Hoche Pedra Píres, 475 no bairro Portão e o CAPS Centro Vida na rua Nunes Machado, 1796 no Bairro Rebouças. Esses dois CAPS se localizam sobre a sub-bacia hidrográfica do Belém, então o rio escolhido para o estudo foi o rio principal da sub-bacia: o rio Belém (FIGURA 7), apontado pelo IAP (2005) como o mais impactado pela urbanização de Curitiba.



**FIGURA 7.** Localização da sub-bacia hidrográfica do rio Belém

Fonte: Fortunato (2006).

As coletas de amostras de água ocorreram nas áreas da nascente, 5,4km da nascente e foz do rio. Os pontos de coleta foram selecionados pela acessibilidade aos locais (FIGURA 8).



Próximo a nascente

Parque São Lourenço

Próximo a foz

**FIGURA 8.** Pontos de coletas

NOTA: Fotos elaboradas pela autora (2015)

A nascente se localiza no norte da cidade, no bairro Cachoeira. Sua foz esta no sul do município, no bairro Boqueirão, sendo tributário da margem direita do rio Iguaçu. Seu talvegue principal desenvolve-se segundo a orientação Norte-Sul, cortando regiões de alto grau de densidade populacional como bairros periféricos das Zonas Norte e Sul e a Zona Central da cidade de Curitiba. Nesta sub-bacia encontra-se o centro da cidade e mais 35 bairros parcialmente ou totalmente inclusos. Entre esses bairros se encontram o Portão e o Rebouças (SAMPAIO, 1998; SAUER, 2008).

As coordenadas dos pontos de coletas podem ser visualizadas na TABELA 8. O primeiro ponto de amostragem foi 500m da nascente, perto ao Parque Municipal Nascentes do Belém. O segundo ponto foi no Parque São Lourenço se localizando a 5,4km da nascente. Por fim, o terceiro ponto foi realizado na foz do rio, próximo a Estação de tratamento de esgoto ETE-Belém.

**TABELA 8.** Coordenadas dos pontos de coleta na Bacia do Rio Belém.

Pontos de amostragem	Latitude	Longitude
Ponto 1	25° 21' 158" S	49° 16'210" W
Ponto 2	25° 23' 258" S	49° 16'007" W
Ponto 3	25° 30'473" S	49° 12'925" W

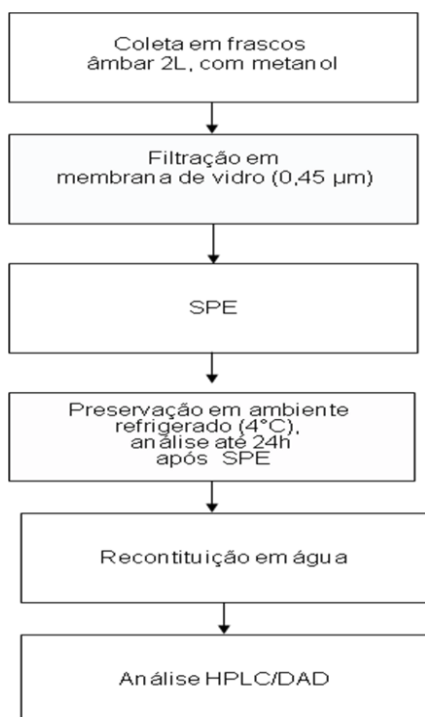
#### 4.1.1 Coletas e processamento das amostras

As amostras foram coletadas em frascos âmbar de 2L, aos frascos foram previamente adicionados 1 mL de metanol por litro de amostra a fim de promover uma prévia desinfecção e assim evitar possível degradação



biológica. Foram filtradas utilizando filtro de fibra de vidro GF3 de 55 mm e 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Macherey Nagel) e o pH das amostras foi acertado para 4,0.

Cada amostra foi dividida em dois balões volumétricos de 500 mL. Um foi encaminhado para realização do SPE “*in natura*”. O SPE foi realizado seguindo as melhores condições avaliadas. O outro balão foi fortificado com 10  $\mu\text{L}$  de cada padrão dos psicofármacos estudados, em sequência foi também realizado o SPE de acordo com as melhores condições avaliadas. Os cartuchos foram guardados em um refrigerador de 4°C até o dia posterior, em que foram reconstituído em 1mL de água ultra pura e analisados no método proposto de HPLC-DAD. O fluxograma de trabalho pode ser observado na FIGURA 9.



**FIGURA 9.** Fluxograma de trabalho após coletas

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MEDICAMENTOS MAIS DISPENSADOS NO CAPS EM CURITIBA

No CAPS voltado ao atendimento do público adulto, atualmente CAPS III, os medicamentos mais utilizados durante o período de 2011 a 2014, para um total de registro de saída de 2450 unidades farmacêuticas, foram: Haloperidol Decanoato 50mg/ml injetável (26,98% - registro de saída de 661 unidades); Diazepam 5mg comprimido (18,73% - registro de saída de 459 unidades); Biperideno Lactato 5mg/mL injetável (12,82% - registro de saída de 314 unidades); Carbamazepina 200mg comprimido (10% - registro de saída de 240 unidades); e outros psicofármacos (31,47%).

Em relação ao CAPS responsável pelo atendimento voltado ao público infante-juvenil, os resultados dos psicofármacos mais usados durante o período de 2011 a 2014, para um total de registro de saída de 8447 unidades foram: Cloridrato de Clorpromazina comprimido 100mg (28,22% - registro de saída de 2384 unidades); Cloridrato de Clorpromazina comprimido 25mg (23,45% - registro de saída de 1981 unidades); Diazepam 5mg comprimido (9,86% - registro de saída de 833 unidades), Carbamazepina 200mg (8,81% - registro de saída de 745 unidades) e outros psicofármacos (29,66% - registro de saída de 2505 unidades).

Avaliando, em conjunto, os registros de utilização de medicamentos de ambos os CAPS, verificou-se que os medicamentos mais utilizados durante o período de 2011 a 2014, em relação ao total de registro de saída de 10897 unidades, foram: Cloridrato de Clorpromazina comprimido 100mg (23,41% - registro de saída de 2551 unidades); Cloridrato de Clorpromazina comprimido 25mg (18,54% - registro de saída de 2020 unidades); Diazepam 5mg comprimido (11,86% - registro de saída de 1292 unidades); Carbamazepina 200mg (9,08% - registro de saída de 985 unidades) (TABELA 9).

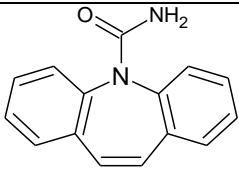
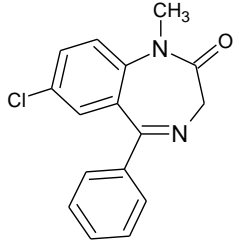
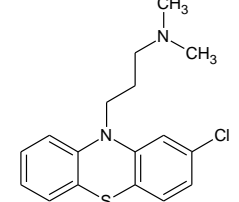
**TABELA 9.** Relação medicamentos mais utilizados nos CAPS e sua classe terapêutica.

Medicamentos identificados	Classe terapêutica	Classificação/Porcentagem
Clorpromazina	Antipsicótico	1º lugar/41,95%
Diazepam	Ansiolítico	2º lugar/11,86%
Carbamazepina	Anticonvulsivante	3º lugar/9,08%

### 5.1.1 Carbamazepina

A carbamazepina (CZ) é um pó cristalino branco ou amarelado inodoro que apresenta polimorfismo, sendo praticamente insolúvel em água e solúvel metanol (TABELA 10). Seu espectro de absorção no ultravioleta entre 200 e 400 nm apresenta máximo de absorção em 285 nm (ANVISA, 2010). É um medicamento utilizado como é um anticonvulcionante para crises tonicoclônicas generalizadas, parciais simples e complexas (BRUNTON *et al.*, 2006).

**TABELA 10.** Propriedades físico-químicas dos medicamentos estudados.

Fármaco	Estrutura	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	Log K <sub>ow</sub>
CZ		236,27	7,0	2,45
DZ		284	3,3	2,63
CP		284,76	9,2	4,18

FONTE: BANKDRUG, 2015

Após a administração oral ela é absorvida lentamente, seu pico plasmático está entre duas e quatro horas. Sua via metabólica predominante envolve a conversão em 10-11 epóxido, sendo este metabólito mais ativo que o composto original. O 10-11 epóxido é então biotransformado em compostos inativos, que são excretados na urina principalmente com glicuronídeos (MOFFAT *et al.*, 2004).

Porém a Carbamazepina também é inativada por conjugação e hidroxilação, o responsável por isso é o citocromo P450. A cinética da Carbamazepina é complexa, influenciada por sua hidrossolubilidade limitada e pela capacidade de aumentar sua conversão em metabólitos ativos por ação das enzimas oxidativas hepáticas. O fármaco se distribui rapidamente por todo tecido e aproximadamente 75% do medicamento se liga a proteínas plasmáticas (BRUNTON *et al.*, 2006).

Cerca de 25% da dose é excretada na urina na forma de metabólito di-hidroxi, em conjunto com 2% como o 10,11-epóxido e inferior a 10% como fármaco inalterado. Outros metabólitos identificados na urina incluem vários monohidroxi e trihidroxicarbamazepina isômeros carbamazepina-N-glucuronídeo. Além disso, também pode se encontrar nas fezes 30% da dose sendo eliminada (MOFFAT *et al.*, 2004).

### 5.1.2 Diazepam

O diazepam (DZ) pertence ao grupo farmacológico dos benzodiazepínicos, por possuir na sua estrutura o núcleo que os caracteriza (TABELA 10). É composto de um anel benzênico, fundido a um composto diazepínico de sete membros, com característica anelar. Em virtude dos benzodiazepínicos possuírem um substituinte 5 – aril (Anel C) e um anel 1,4 diazepina, passaram a ser denominados de 5 – aril – 1,4 benzodiazepina (BRUNTON *et al.*, 2006). Seu espectro de absorção no ultravioleta na faixa de 230 nm a 350 nm exibe máximos de absorção em 242 nm, 254 nm e em 284 nm (ANVISA, 2010).

O diazepam ainda é um dos benzodiazepínicos mais comumente usados em todo o mundo. Seus efeitos estão relacionados à sua ação quase exclusiva no sistema nervoso central. Os mais marcantes são a sedação, a hipnose, relaxamento muscular, amnésia e atividade anticonvulsivante (BRUNTON *et al.*, 2006).

As suas vias de administração são diversas, mas principalmente a oral. A administração por via oral é de absorção variável, podendo demorar até duas horas para atingir a concentração plasmática ideal (BRUNTON *et al.*, 2006).

De todos os benzodiazepínicos, o Diazepam possui uma das mais altas solubilidades lipídicas, o que confere ao fármaco um grande volume de distribuição. Essa característica o permite atravessar rapidamente a barreira hemato-encefálica, assim como distribuir-se aos tecidos gordurosos periféricos, apresentando uma meia vida superior a 24 horas (MOFFAT *et al.*, 2004).

Possui, portanto, dois modelos compartimentais de distribuição, que são: o compartimento sanguíneo central e o periférico composto de gordura e músculo. No plasma, 95% apresentam-se combinados às proteínas sanguíneas. No sistema nervoso central, que é o seu principal local de ação, o nível desejado da droga é rapidamente atingido, tendo em vista que a região é altamente vascularizada (BRUNTON *et al.*, 2006).

O diazepam sofre biotransformação pelo sistema de oxirredutases do citocromo P-450, que promovem N-desmetilação, produzindo, um metabólito ativo, o nordiazepam. Este, por sua vez, é hidroxilado, formando oxazepam, que sofre imediata glicuronidação através de um processo de conjugação. Há ainda a possibilidade de hidroxilação do diazepam pelo citocromo P-450, formando o temazepam, que possui atividade metabólica de menor intensidade. Esses metabólitos exibem limitada atividade farmacológica, uma vez que são rapidamente conjugados e excretados. Até 3% do diazepam pode ser excretado como fármaco inalterado (LARINI, 1993).

### 5.1.3 Clorpromazina

A clorpromazina (CP) é um protótipo dos compostos fenotiazínicos, que além de sua ação antipsicótica, atua como anti-histamínico anticolinérgico e

bloqueador dos receptores alfa- adrenérgicos. Apresentam como forma geral a estrutura da fenotiazina, sendo moléculas tricíclicas com dois anéis benzênicos ligados por átomo de enxofre e outro de nitrogênio (TABELA 10). Um grupo acceptor de elétrons, como o cloro, na posição 2 é essencial para atividade antipsicótica (LARINI, 1993).

Os compostos neurolépticos apresentam um absorção irregular principalmente quando administrados por via oral, pois sofrem efeitos de primeira passagem, o que diminui a biodisponibilidade. Esses compostos são altamente lipossolúveis e apresentam alto grau de ligação com as proteínas plasmáticas (BRUNTON *et al.*, 2006).

A meia-vida desse composto é 24 horas (BRUNTON *et al.*, 2006). Alguns autores calculam que existem teoricamente 168 produtos de biotransformação para clorpromazina, resultantes de reações de hidroxilação, N-oxidação, mono e bidesmetilação, oxidação da cadeia lateral, formação de sulfóxidos e conjugação com UDPGA e PAPS. Contudo, apenas 10 a 12 produtos ocorrem em concentrações significativas no organismo humano (LARINI, 1993). Metabólitos hidrofílicos são excretados na urina, parte na bile. A maioria dos fármacos oxidados são metabolicamente inativos (BRUNTON *et al.*, 2006).

Porém, alguns dos metabólitos, já isolados, são ativos, em particular 7-hidroxiclorpromazina, embora menos do que o fármaco de origem. Cerca de 20 a 70% de uma dose oral é excretada na urina na forma de metabólitos, na sua maioria conjugados, com 5% da dose como o sulfóxido dimetil, e menos de 1% como fármaco inalterado (MOFFAT *et al.*, 2004).

Cerca de 5% da dose é eliminado nas fezes na forma de metabólitos que tem sido detectados na urina até 18 meses após a interrupção do tratamento em longo prazo (MOFFAT *et al.*, 2004).

## 5.2 DESENVOLVIMENTO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Para a determinação desses resíduos farmacêuticos foi necessário estabelecer uma metodologia de pré-concentração, porque se faz necessário para essa espécie de analitos em nível de traços. Assim, neste trabalho

empregaram-se os cartuchos Strata X® e foram selecionados metanol e acetonitrila para avaliação do condicionamento e eluição, carregamento da amostra na faixa de 100 a 300 mL, diferentes volumes reconstituição e faixa de pH de 4,0 a 8,0 a partir de dados compilados de trabalhos da literatura. A matriz do planejamento experimental contendo as recuperações de CZ, DZ E CP em cada ensaio realizado é mostrado a seguir.

### 5.2.1 Otimização do pH

Para o teste do pH foram testados três diferentes escalas: pH 4, pH 6,5 e pH 8, em triplicata. Como mostra a TABELA 11, a melhor recuperação obtida foi em pH 4, sendo assim todos os outros testes foram realizados em pH 4.

**TABELA 11.** Otimização do pH

Escalas de pH	Recuperação de CZ (%)	Recuperação de DZ(%)	Recuperação de CP (%)
4	61,1%±6,73*	57,5%±1,39*	36,7%±7,55*
6,5	77,8%±1,28*	73,7%±0,83*	-
8	78,2%±0,43*	73,1%±7,22*	-

\* DPR. Desvio Padrão Relativo

Para pH 6,5 e 8,0 só foi possível observar bandas de eluição referentes aos analitos CZ e DZ, sendo possível recuperar em pH 6,5 a CZ (77,8%) e o DZ (73,7%) e em pH 8,0 a CZ (78,2%) e DZ (73,1%). Apenas em pH 4,00 foi possível observar a eluição de todos os analitos, com boas taxas de recuperação de 61,1% CZ, 57,5% DZ, e de 36,7% para CP. A redução do pH, assim como na cromatografia, garante a prevalência de uma espécie do analito no meio, que deve ser preferencialmente não ionizada, de modo a melhorar a interação dos analitos com a fase sólida dos cartuchos e assim elevar a taxa de recuperação.

Esta mudança de pH foi realizada visando um único procedimento de extração para compostos com diferentes características físico-químicas, buscando a maior eficiência de extração para ambas as classes. Uma consideração importante é que essa modificação do pH durante a extração

pode ser estendida para análise de outros grupos ácidos e básicos que geralmente são analisados priorizando um determinado grupo de compostos em detrimento de outro.

### 5.2.2 Otimização da concentração, volume de amostra e solvente de condicionamento e eluição.

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial  $2^3$ , avaliando-se os volumes de amostra (100mL, 200 mL ou 300mL) solventes de condicionamento e eluição (ACN e metanol) e fortificação (em 3 níveis diferentes), em porcentagem de recuperação, podem ser observados na matriz do planejamento TABELA 12.

**TABELA 12.** Resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^3$  avaliando os efeitos do solvente de condicionamento/eluição ( $S_{\text{cond./eluiç.}}$ ), do volume da amostra ( $V_{\text{amostra}}$ ) e da concentração (Conc.) na recuperação dos analitos CZ, DZ e CP.

Variáveis				Recuperação (%)		
Ensaio	$S_{\text{cond./eluiç.}}$	$V_{\text{amostra}}$	Conc.	CZ	DZ	CP
1	-	-	-	91,43	81,02	32,98
2	+	-	-	89,95	76,22	22,2
3	-	+	-	88,81	80,63	12,39
4	+	+	-	88,42	78,76	18,88
5	-	-	+	77,35	73,67	11,03
6	+	-	+	149,87	139,06	36,86
7	-	+	+	78,55	74,21	6,188
8	+	+	+	77,18	59,31	7,659
PC	0	0	0	90,90	85,37	17,51
PC	0	0	0	91,37	85,18	17,37
PC	0	0	0	90,61	85,47	17,03
Média do PC				90,96	85,34	17,30
Estimativa do desvio padrão (s) do PC				0,384	0,147	0,242

NOTA: Condicionamento e Eluição: (-) 5 mL ACN, 5 mL H<sub>2</sub>O; (+) 5 mL MeOH, 5 mL H<sub>2</sub>O, (0) 5 mL ACN:MeOH (1:1), 5 mL H<sub>2</sub>O; Volume da amostra: (-) 100 mL, (+) 300 mL, (0) 200 mL; Concentração: (-) 1,13 µg L<sup>-1</sup> CZ, 1,28 µg L<sup>-1</sup> DZ, 1,21 µg L<sup>-1</sup> CP, (+) 3,39 µg L<sup>-1</sup> CZ, 3,84 µg L<sup>-1</sup> DZ, 3,63 µg L<sup>-1</sup> CP, (0) 2,26 µg L<sup>-1</sup> CZ, 2,56 µg L<sup>-1</sup> DZ, 2,42 CP .



Avaliando-se os resultados obtidos, observa-se que a melhor recuperação foi conseguida no ensaio seis. Então esses ensaios convergem para o emprego de metanol na eluição, com 100 mL de amostra e mantendo os analitos na maior concentração avaliada. A fim de avaliar, portanto, qual é o ensaio que apresenta as melhores condições para pré-concentração dos resíduos dos medicamentos e a influência dos fatores estudados na resposta, o cálculo dos efeitos do planejamento foi realizado como mostrado na TABELA 13.

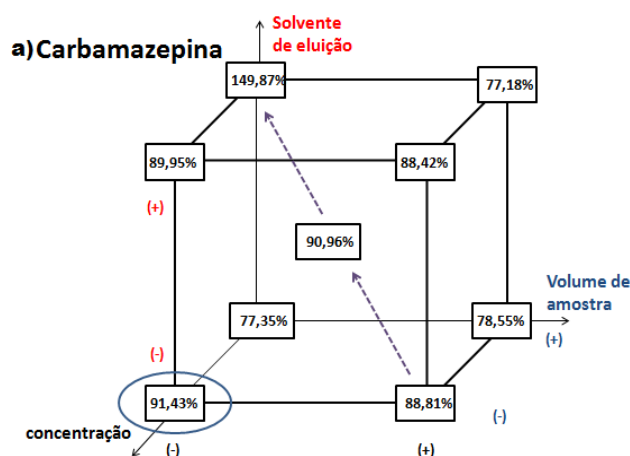
**TABELA 13.** Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial  $2^3$ .

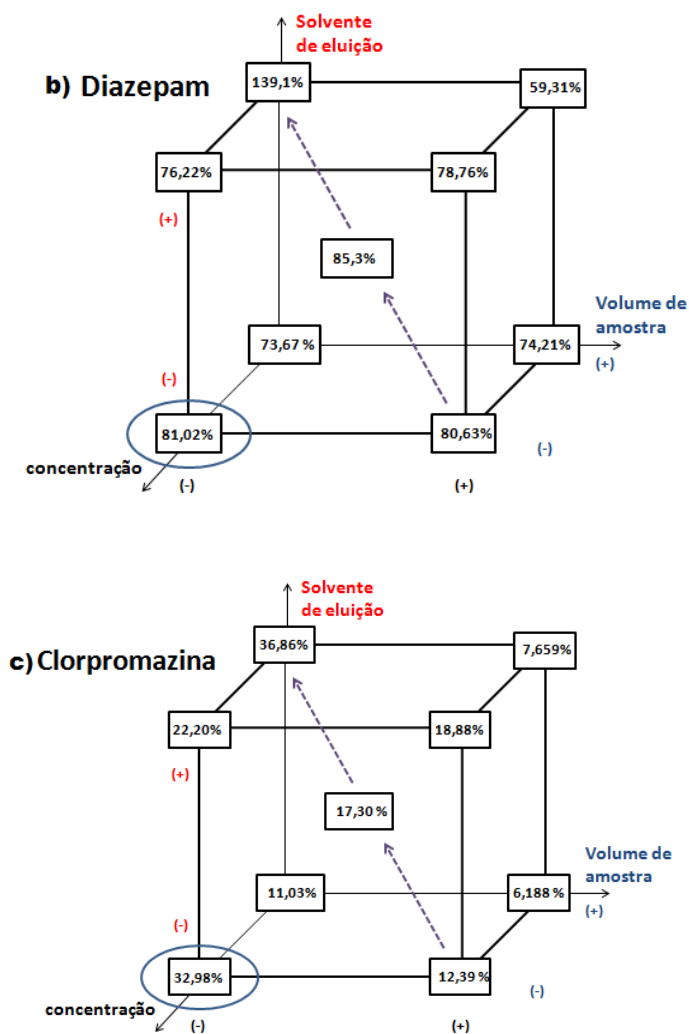
Analitos	txs	Efeitos						
		Principais			Interação			
		S <sub>eluição</sub>	V <sub>amostra</sub>	C	SxV	SxC	VxC	SxVxC
<b>CZ</b>	1,65	17,32	-18,91	6,09	-18,32	18,25	-16,84	-18,74
<b>DZ</b>	0,633	10,96	-19,26	29,62	-19,34	14,29	-20,34	-20,81
<b>CP</b>	1,04	5,77	-14,49	-24,71	-1,77	7,90	-2,53	-10,40

NOTA: txs: Estimativa do desvio padrão com 95% de confiança.

Com base nas estimativas do desvio padrão para cada analito (obtido via triplicata do ponto central), com 95% de confiança ( $t_{(v=2, 95\% \text{confiança})} = 4,303$ ), apresentadas também na TABELA 13, todos os efeitos se mostraram significativos. Isso porque todos os valores dos efeitos em módulo são maiores que o as estimativas do desvio padrão do ponto central. Como todos os efeitos de terceira ordem (SxVxC) revelaram-se significativos na pré-concentração dos analitos estudados, esses fatores não podem ser avaliados individualmente.

Então, para uma melhor visualização, as FIGURA 10 a, b e c, apresenta a interpretação geométrica para cada analito.





**FIGURA 10.** Interpretações geométricas para CZ, DZ E CP dos efeitos significativos do planejamento  $2^3$ .

Na FIGURA 10 é possível observar que as melhores recuperações para todos os analitos foram obtidas mantendo-se o nível (+) de solvente de eluição (metanol), (-) de volume de amostra (100mL) e (+) de concentração maior (seta ascendente), correspondente ao ensaio 6 como comentado anteriormente, seguindo uma tendência de aumento na recuperação.

Embora seja desejável atingir níveis de recuperação próximos de 100%, maximizando a sensibilidade da técnica, é provável que níveis de recuperação acima de 70% não comprometam a integridade da técnica. Um intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos está entre 70 e 120% (PURDIE *et al.*, 2009). Sendo assim, as recuperações da CZ (149,87%) e DZ (139,1%) estão acima de 120% e a de CP abaixo de 70%.

Apesar disso, para CP e CZ outra linha de tendência pode ser observada (seta descendente), indicando o ensaio com todas as variáveis no nível (-) que também apresenta boas recuperações para os analitos que não evidenciaram essa mesma tendência (valores de recuperação circulos).

Ainda, as recuperações de SPE nas condições do ponto central se mostraram favoráveis para CZ e DZ, somente para a CP que foi muito baixa (17,30%). A CP a qual a maior recuperação foi de 34,6% se faz necessário reavaliar futuramente a metodologia desenvolvida para sua pré-concentração.

Com base nessas considerações, optou-se por trabalhar no nível (-) para todas as variáveis, uma vez que proporciona uma boa recuperação para todos os analitos. Logo, as condições de trabalho escolhidas foram as de concentração de  $1,13 \mu\text{g L}^{-1}$  para CZ,  $1,28 \mu\text{g L}^{-1}$  para DZ e de  $1,21 \mu\text{g L}^{-1}$  para CP, 100,0 mL de volume de amostra e acetonitrila como solvente de eluição, mantendo o pH igual a 4,00 como otimizado previamente.

### 5.2.3 Otimização do volume de reconstituição

Após otimização do pH, concentração, volume de amostra e solvente de eluição foi avaliado univariadamente o volume de reconstituição, variado em 0,25 mL, 0,50 mL e 1,00 mL. A recuperação dos analitos é possível observar na TABELA 14.

**TABELA 14.** Otimização do volume de reconstituição

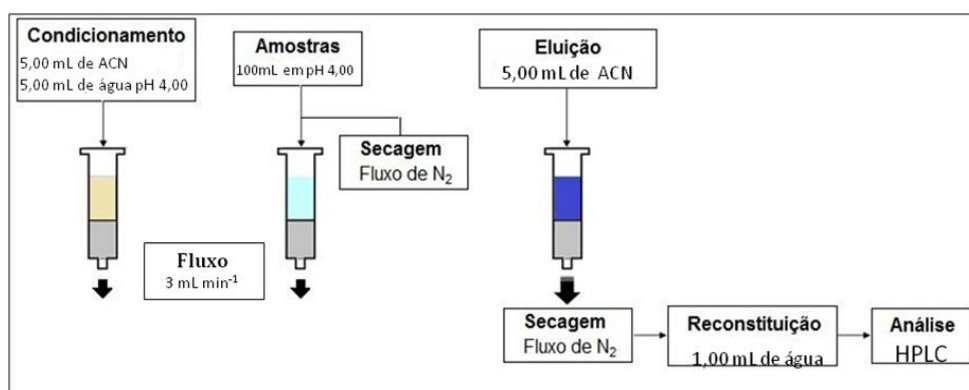
Volume de reconstituição (mL)	Recuperação de CZ (%)	Recuperação de DZ (%)	Recuperação de CP (%)	Fator de concentração
<b>1,00</b>	82,5% $\pm 1,55^*$	80,0% $\pm 3,67^*$	34,64% $\pm 8,77^*$	100x
<b>0,50</b>	64,0% $\pm 2,57^*$	69,3% $\pm 5,87^*$	28,7% $\pm 7,78^*$	200x
<b>0,25</b>	63,3% $\pm 1,08^*$	57,5% $\pm 3,66^*$	22,3% $\pm 5,32^*$	400x

\* DPR. Desvio Padrão Relativo

A recuperação foi mais significativa para a reconstituição com 1,00 mL para todos os analitos, apesar de reduzir o fator de pré-concentração devido à

maior diluição, e foi de 82,5% para CZ, 80,0% DZ, 87,2% e de 34,64% CP. A reconstituição com 0,500 mL forneceu recuperações inferiores para todos os analitos, sendo de 64,0% para CZ, 69,3% DZ e de 28,7% para CP. O mesmo ocorreu na reconstituição com 0,250 mL sendo as recuperações iguais a 63,3% para CZ 57,5%, DZ 22,3% e de 22,3% CP.

Dessa forma, as melhores condições de pré-concentração (FIGURA 11), considerando as melhores recuperações para a maioria dos analitos, foram obtidas pelo condicionamento com 5,00 mL de acetonitrila e 5,00 mL de água pH 4,00, fluxo de 3 mL min<sup>-1</sup>, 100 mL de amostra em pH 4,00, eluição com 5,00 mL de acetonitrila e reconstituição com 1,00 mL de água.

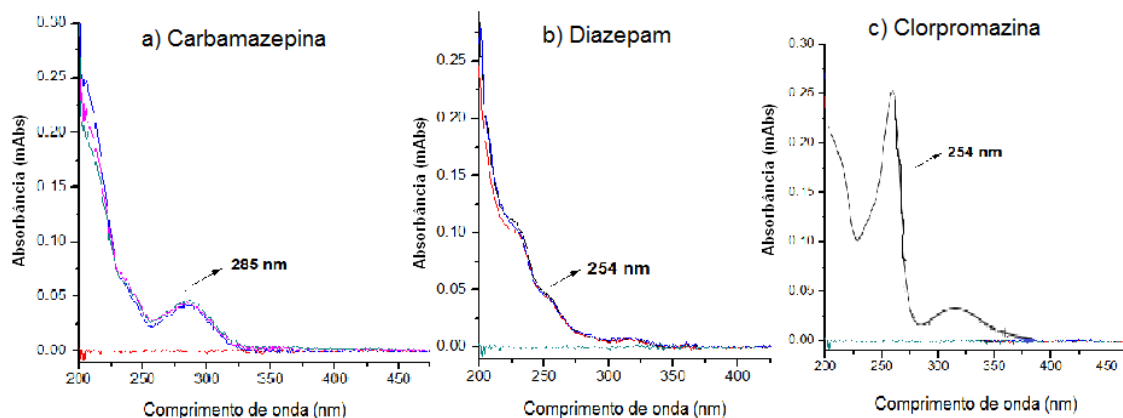


**FIGURA 11.** Melhores condições de pré-concentração selecionadas.

**FONTE:** Adaptado de AMARAL (2015).

### 5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Na obtenção do espectro de varredura na região do UV-Vis dos psicofármacos, para obtenção do melhor comprimento de onda a ser usado na quantificação dos resíduos foram selecionados os comprimentos de onda para CZ 286 nm, para DZ e CP 254 nm (FIGURA 12).



**FIGURA 12.** Espectro de UV-Vis para: a) CZ, b) DZ de 1 mg L em metanol:água (60:40 v:v) e c) CP 1 mg L em acetonitrila: tampão fosfato 0,01 M pH 3,50 (25:75 v:v).

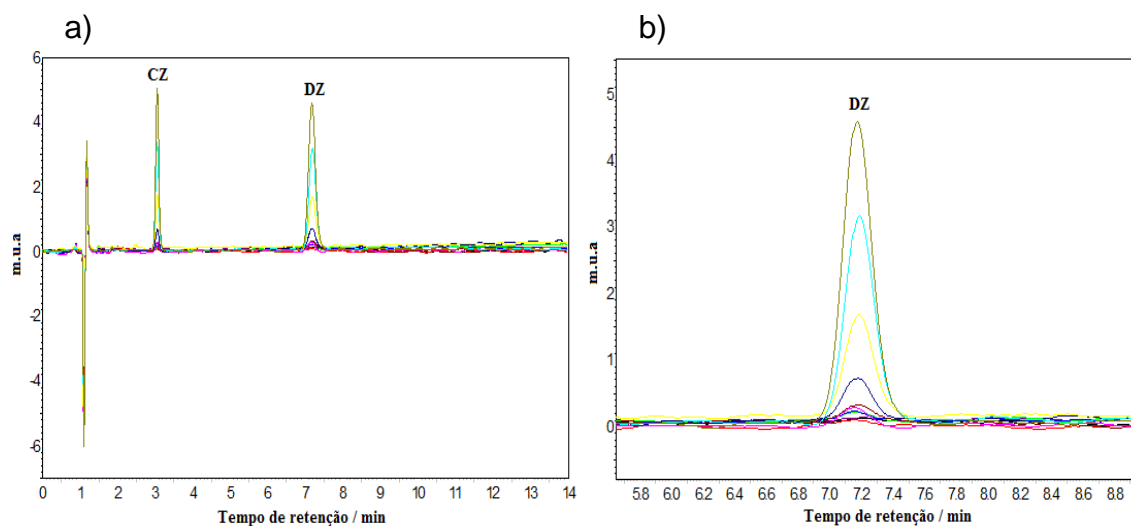
A escolha do melhor sistema cromatográfico foi baseada na maior área dos picos e o menor tempo de corrida. A coluna que apresentou melhores resultados foi a XBridge, porque os parâmetros cromatográficos avaliados foram superiores TABELA 15. Tendo em vista que é uma coluna que apresenta uma nova tecnologia de partícula híbrida de sílica (polietoxisilano), o que produz melhores resultados principalmente para compostos com caráter básicos, com é o caso da CZ.

**TABELA 15.** Tempo de retenção e média das áreas em diferentes concentrações e nas diferentes colunas testadas.

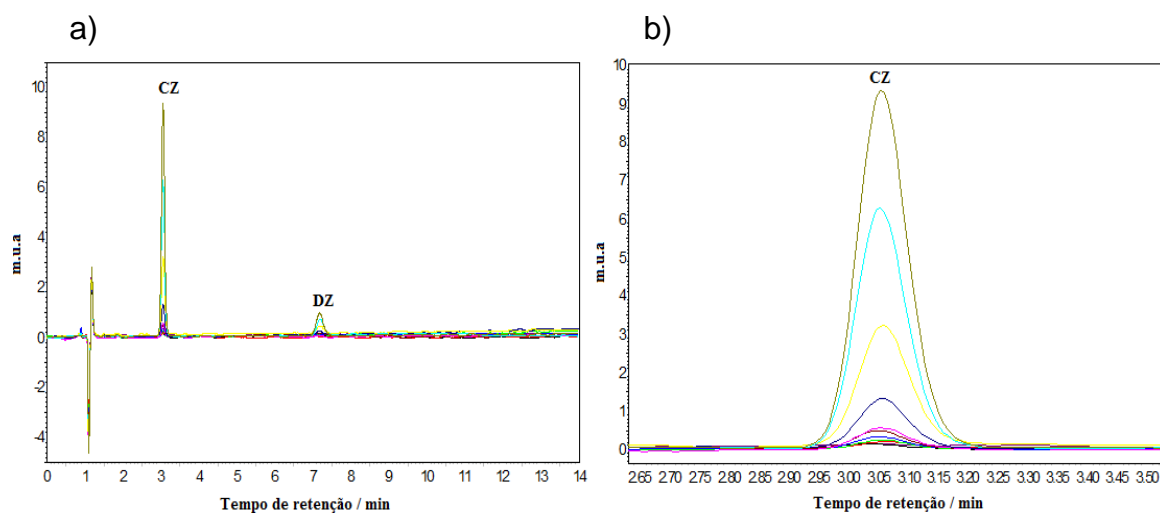
Concentração	Média das áreas ( $\pm$ DPR)					
	CZ		DZ		CP	
	Zorbax Eclipse	XBridge	Zorbax Eclipse	XBridge	Zorbax Eclipse	XBridge
<b>Fase movél</b>	metanol:água (60:40, v:v)		metanol:água (60:40, v:v)		acetonitrila:tampão fosfato 0,01 M pH 3,50 (25:75 v:v)	
<b>Tempo de retenção (min)</b>	3,05	1,46	7,19	3,07	25,0	22,5
<b>50 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	4523 $\pm$ 5,7	1178,5 $\pm$ 4,3	6013 $\pm$ 6,4	11162 $\pm$ 9,9	-	-
<b>100 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	7596 $\pm$ 12,4	24209,5 $\pm$ 11,5	9275 $\pm$ 10,3	22877 $\pm$ 24,1	6048 $\pm$ 3,4	14681 $\pm$ 12,3
<b>500 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	409942 $\pm$ 8,3	125805,0 $\pm$ 5,8	42961 $\pm$ 4,3	117591 $\pm$ 7,6	28372 $\pm$ 9,2	88389 $\pm$ 9,2
<b>1500 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	119676 $\pm$ 8,6	369309 $\pm$ 3,8	127350 $\pm$ 5,3	319064 $\pm$ 2,3	164586 $\pm$ 7,3	276122 $\pm$ 12,4

\*DPR = Desvio Padrão Relativo

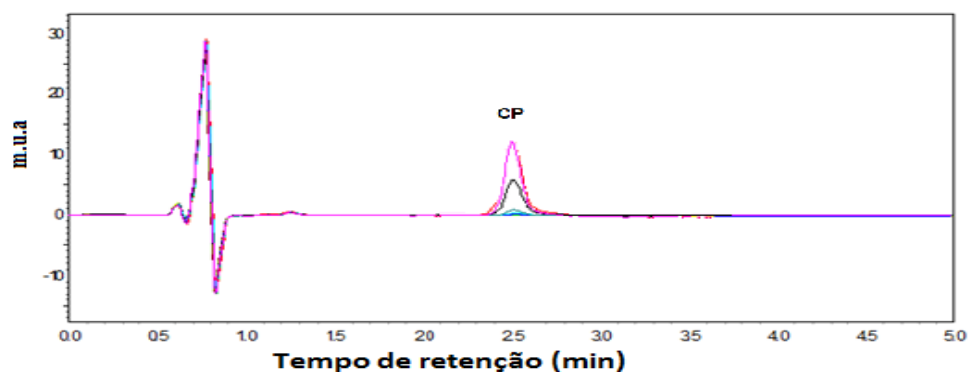
Nas FIGURAS 13, 14 e 15 (próxima página) é possível ver um exemplo dos cromatogramas obtidos para CZ, DZ e CP na coluna Zorbax Eclipse, foi necessário um maior tempo de corrida para a separação. Além disso, as áreas dos picos foram menores, diminuindo a sensibilidade da separação como já visto na TABELA 15.



**FIGURA 13.** a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm na coluna Zorbax Eclipse; b) Ampliação da banda de eluição do DZ na coluna Zorbax Eclipse.



**FIGURA 14.** A) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm na coluna Zorbax Eclipse; B) Ampliação da banda de eluição da CZ na coluna Zorbax Eclipse.



**FIGURA 15.** Cromatograma para o padrão de CP obtido por eluição isocrática (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm na coluna Zorbax Eclipse.

Nos cromatogramas as diferenças encontradas entre as colunas com o mesmo tipo de recheio (C18) podem ser melhores entendidas se analisadas as seguintes características: porcentagem de carbono ligado (quanto maior a quantidade de carbono ligado mais hidrofóbica é a coluna, maior retenção de fármacos com caráter lipofílico), área superficial (quanto maior a área, maior eficiência de transferência de massa), tamanho do poro, substrato da partícula (podendo ser sílica ultra-pura ou híbrido de sílica), presença do “*endcapped*” e sua eficiência na blindagem dos silanóis (HARRIS, 2008).

Na TABELA 16 podemos observar as especificações fornecidas pelo fabricante de cada coluna testada.

**TABELA 16.** Características físicas dos recheios das colunas testadas.

Modelo da coluna	Tamanho de partícula	Diâmetro da coluna	Comprimento	Diâmetro do poro	Área superficial	Carbono total	<i>Endcapped</i>
Zorbax Eclipse	5 $\mu$	100 mm	4,6 mm	80 Å	180 m <sup>2</sup> /g	10%	sim
XBridge	5 $\mu$	100 mm	2,1 mm	130 Å	185 m <sup>2</sup> /g	18%	sim

Após a definição da coluna e do comprimento de onda de análise, iniciou-se o desenvolvimento da fase móvel, de modo a obter um cromatograma adequado em relação aos parâmetros cromatográficos dos psicofármacos. Foram testadas várias combinações de acetonitrila e metanol com soluções tampões de diferentes valores de pH.

Concentrações de metanol e água (60:40, 70:30, v:v) foram testadas para todos analitos, e a CP apresentou muita afinidade com esta fase móvel, provavelmente saindo no volume morto. Porém, para CZ e DZ metanol e água (60:40, v:v) apresentou uma boa separação. A diferença de comportamento cromatográfico dos fármacos se deve às diferentes características químicas dos grupos ionizáveis dos mesmos, a estrutura química dos medicamentos estudados é possível ver na TABELA 10.

Para a CP, após consulta na literatura (TABELA 7), a composição da fase móvel foi de uma mistura acetonitrila: tampão fosfato. Após testes para verificar qual a melhor concentração de tampão fosfato e pH, a melhor condição obtida foi utilizando a fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 0,01 M pH 3,50. Assim, diversas proporções foram testadas com acetonitrila (60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15 v:v) com outros analitos diferentes que se tinha disponível no laboratório (fluoxetina, haloperidol, carbamazepina e diazepam) para observar se não ocorriam coeluições.

A melhor condição obtida foi utilizando a fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 0,01 M pH 3,50 (25:75 v:v), a qual não apresentou distorção nas bandas de eluição dos diferentes analitos testados juntos. Permitindo assim o monitoramento desses fármacos pela mesma metodologia sem que houvesse interferência. Esta proporção de fase móvel, acetonitrila: tampão fosfato 0,01 M pH 3,50 (25:75 v:v), também garantiu a separação de CZ e DZ, o que em maiores proporções de acetonitrila (na fase móvel) elas coeluiram. Isso inviabilizaria o monitoramento desses fármacos quando presentes nas amostras reais. Porém, essa fase móvel não foi escolhida para DZ e CZ porque perderam muito em sensibilidade, pois suas áreas foram menores quando comparadas ao método do metanol e água (60:40 v:v).

Uma vez definido o melhor comprimento de onda, a fase móvel e a coluna com os melhores parâmetros cromatográficos o passo seguinte foi a otimização do sistema, fazendo pequenas adequações em cada variável testada de modo a obter as melhores condições de análise para combinação dos fármacos, melhorando o desempenho analítico.



Foram testados diferentes fluxos da fase móvel variando de 0,2 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup> acarretou em aumento significativo da retenção dos fármacos, aumentando o tempo de corrida, fato indesejado, uma vez que procura-se corridas cromatográficas mais rápidas com boa eficiência. Em fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> houve um aumento da pressão do sistema e um consumo maior de solventes sem que houvesse ganho efetivo em tempo de análise.

Além disso, em fluxos acima de 0,5 mL min<sup>-1</sup> a CZ sai muito próximo ao tempo morto, porque é o primeiro analito a sair em tempo inferior a 1 minuto. Então o fluxo escolhido foi 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

A corrida cromatográfica foi feita no modo isocrático, o tempo de corrida foi 8 minutos para o método metanol e água e 35 minutos para acetonitrila:tampão fosfato 0,01 M pH 3,50, isso porque, como já mencionado anteriormente, todos os psicofármacos testados saíram neste método, e para garantir uma separação eficiente de todos os analitos foi necessário aumentar o tempo de corrida.

As temperaturas de forno avaliadas foram: 25, 30, 35 °C. Os psicofármacos não sofreram influências significativas em seus parâmetros cromatográficos com o aumento da temperatura. Portanto, a temperatura escolhida foi 30°C. O volume de amostra injetado foi de 15µL. Desta maneira as melhores condições obtidas para os analitos de interesse podem ser observadas na tabela abaixo (TABELA 17).

**TABELA 17.** Condições cromatográficas selecionadas.

	<b>CZ e DZ</b>	<b>CP</b>
<b>Coluna</b>	Waters XBridge 100mmx 2,1 mm, tamanho de partícula 5µm	
<b>Fase móvel</b>	metanol:água (60:40, v:v)	acetonitrila:tampão fosfato 0,01M pH 3,50 (25:75 v:v)
<b>Comprimento de onda</b>	286 nm/254 nm	254 nm
<b>Fluxo da fase móvel</b>	0,4 mL min <sup>-1</sup>	
<b>Temperatura de forno</b>	30°C.	
<b>Volume de injeção</b>	15µl	

### 5.3.1 Avaliação da estabilidade das soluções padrões

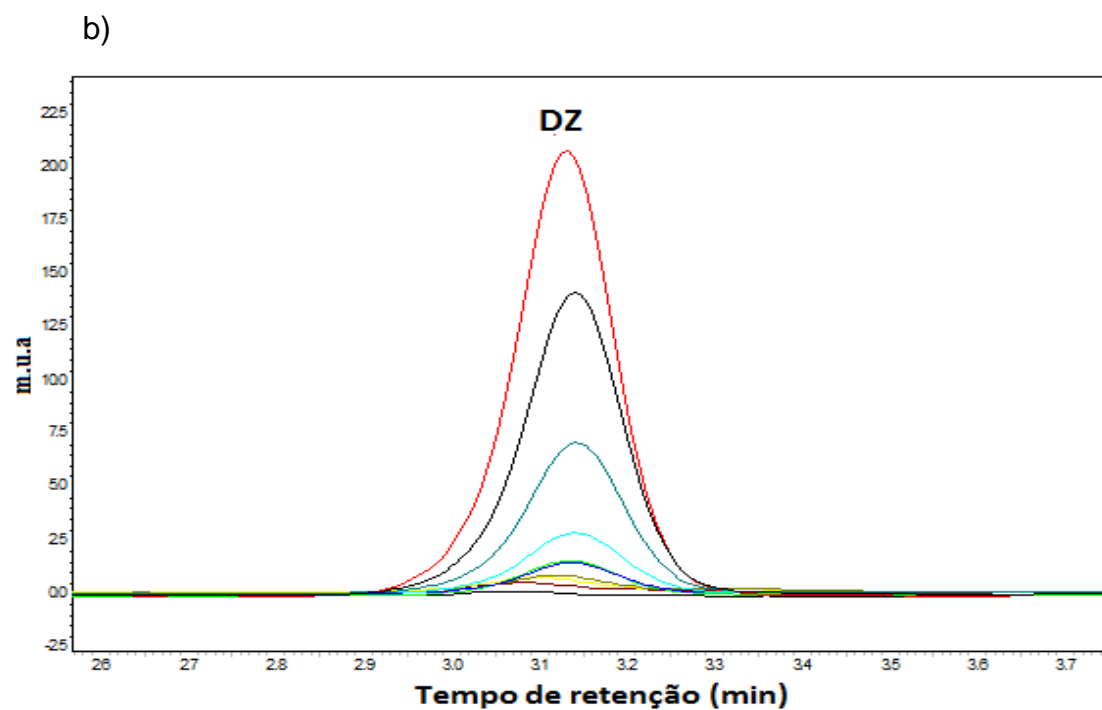
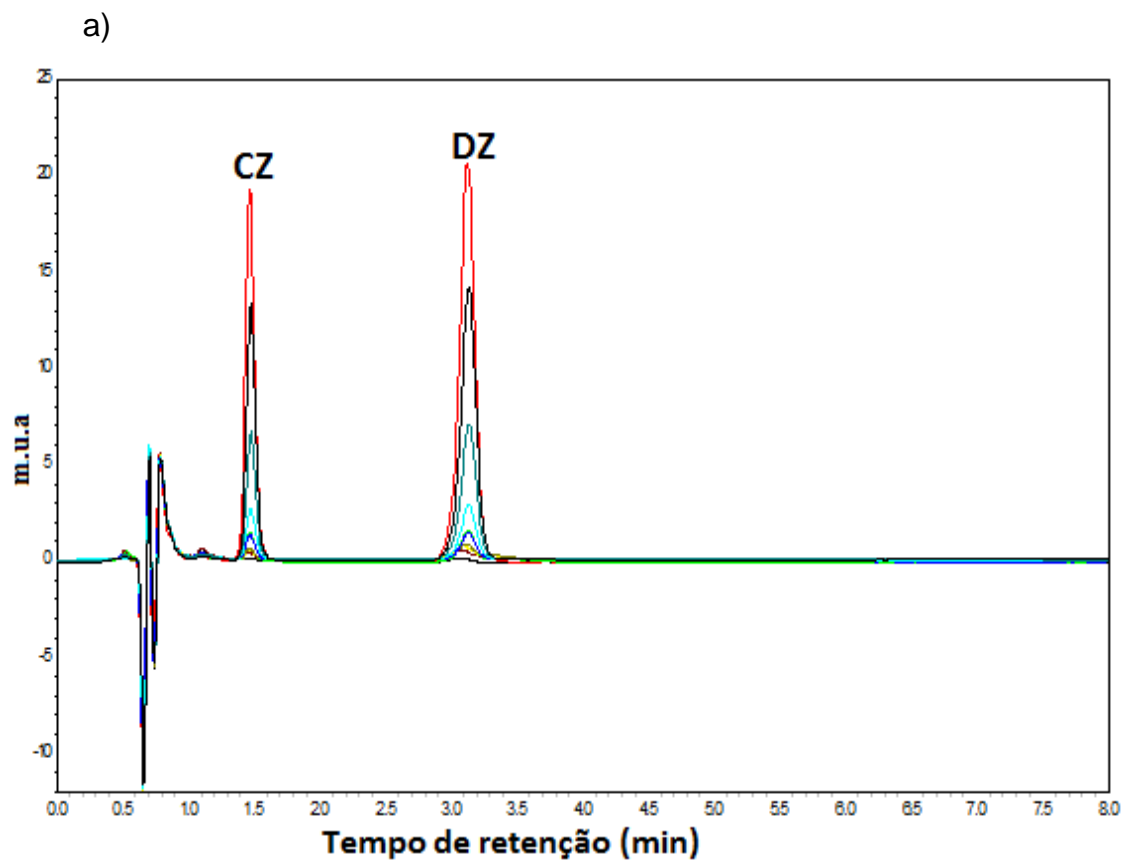
As soluções de padrões estoque foram preparadas na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sobre refrigeração a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ . A avaliação da estabilidade dos fármacos em solução apresentou-se estável por mais de dois meses. As amostras foram injetadas semanalmente ( $n=7$ ) e tiveram uma diferença na recuperação inferior a 1%.

## 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

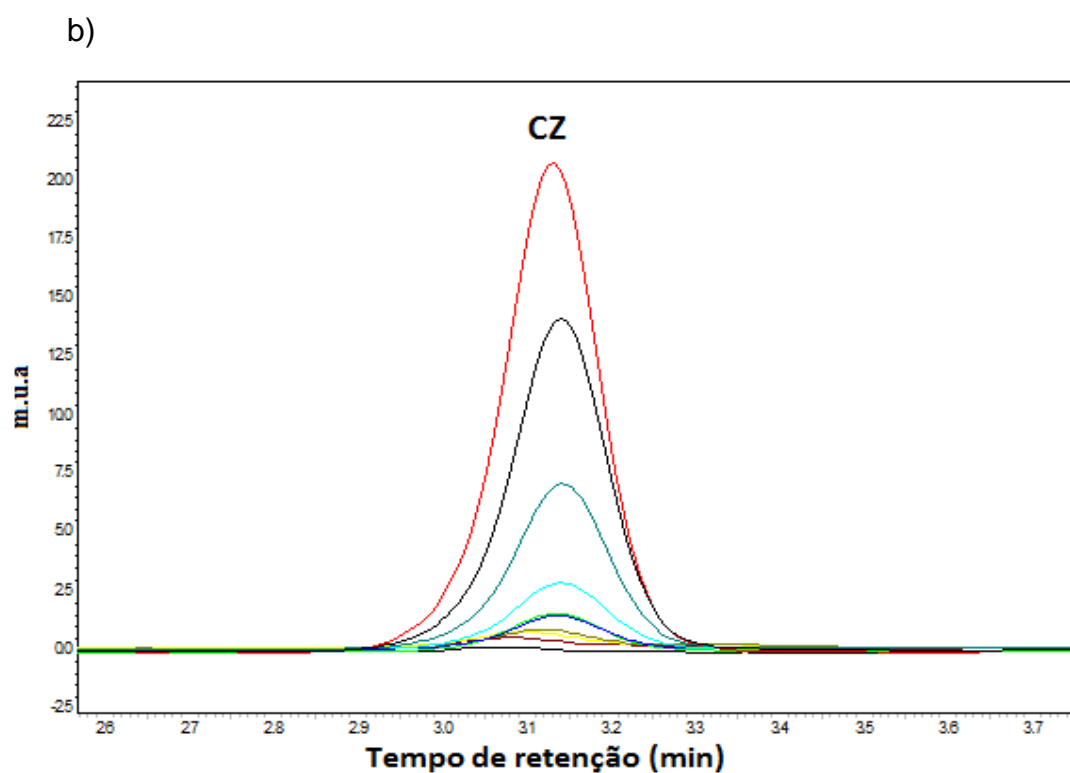
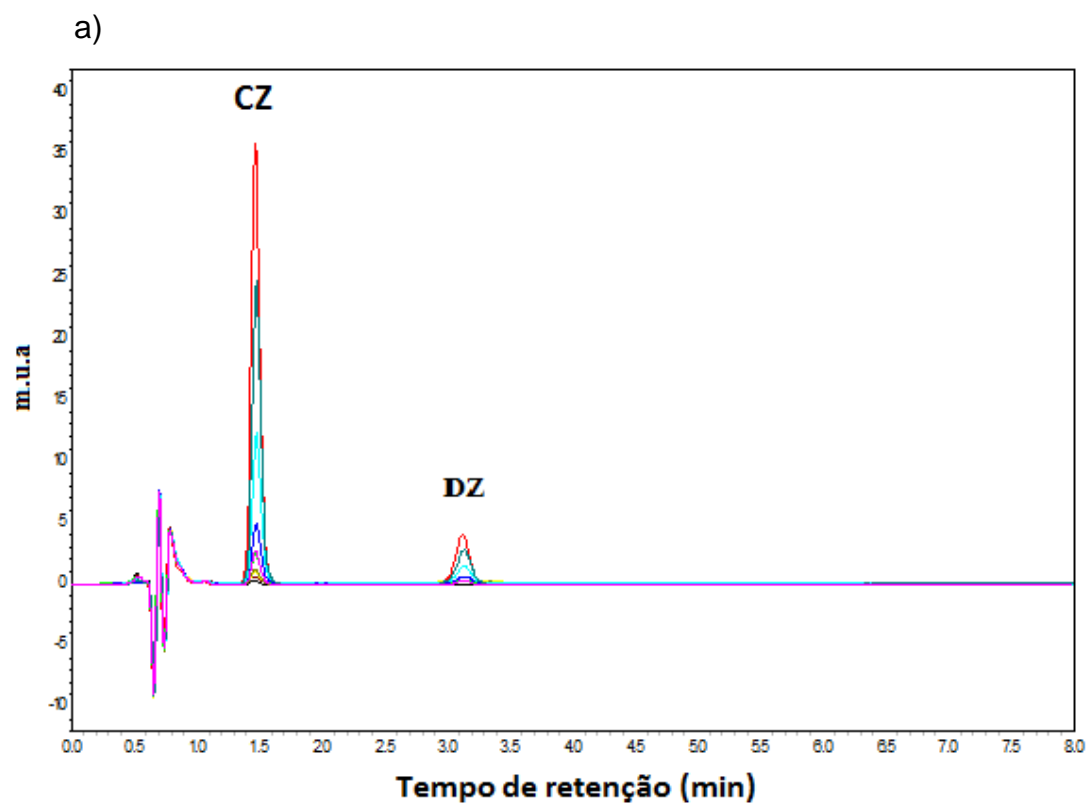
### 5.4.1 Seletividade

A técnica utilizada nesse trabalho para quantificação dos compostos é seletiva, pois a análise foi realizada monitorando-se pelos tempos de retenção e a absorção em determinados comprimentos de onda nos cromatogramas das espécies dos padrões e não se observou nenhuma coeluição.

As FIGURAS 16 e 17, na página seguinte, mostram os cromatogramas obtidos na padronização da CZ e do DZ nas melhores condições de monitoramento por UV-DAD, a 286 nm para a primeira e a 254 nm para o segundo. Como pode ser visto pela maior intensidade das bandas de eluição dos analitos nos comprimentos de onda mencionados, o que está de acordo com a literatura. Observou-se uma boa separação dos picos cromatográficos, sendo que os tempos de retenção foram de 1,467 minutos e 3,073 minutos respectivamente.

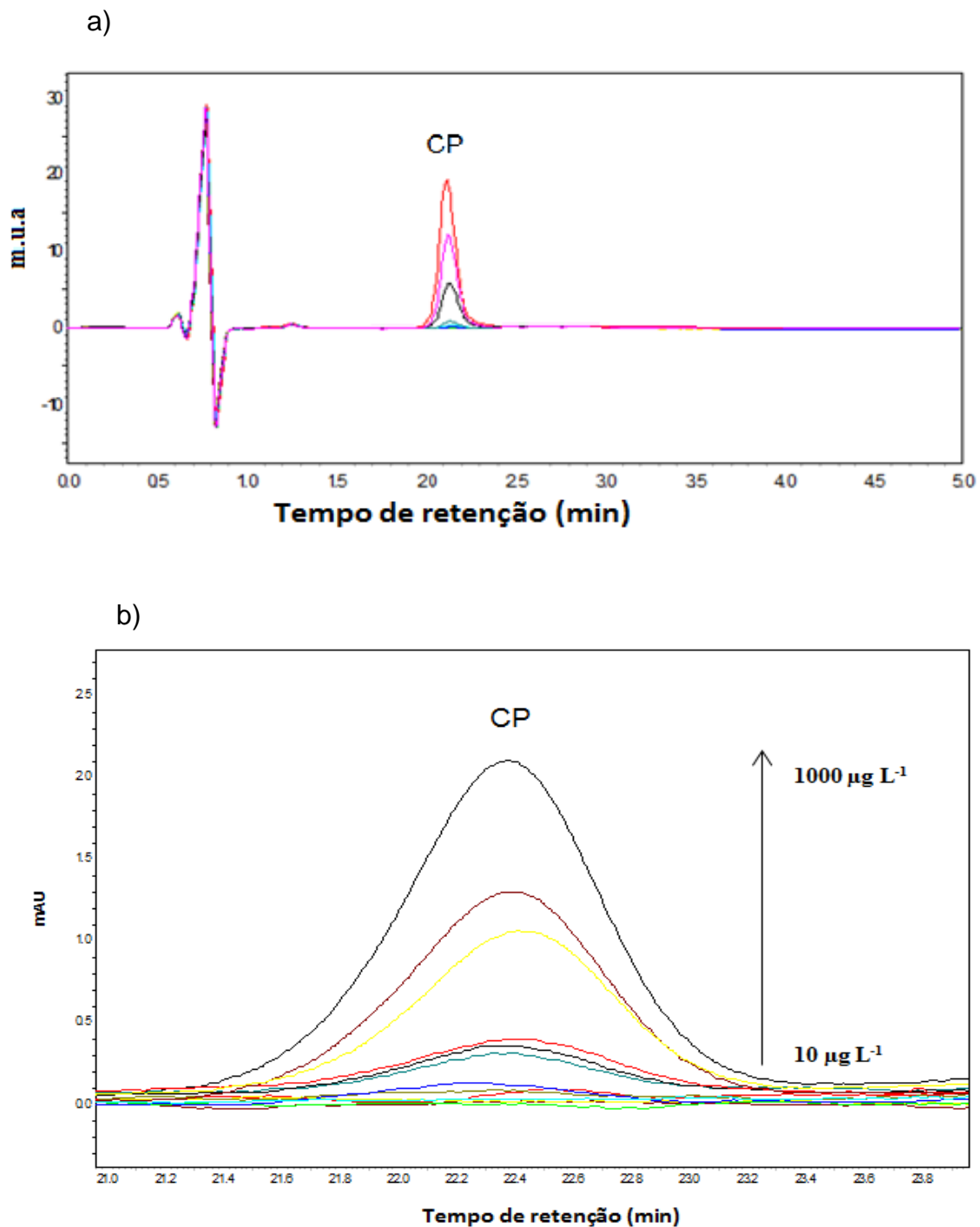


**FIGURA 16.** a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; b) Ampliação da banda de eluição do DZ.



**FIGURA 17.** a) Cromatogramas para os padrões de CZ e DZ obtidos por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; b) Ampliação da banda de eluição da CZ.

As FIGURAS 18a e 18b representam os cromatogramas obtidos na padronização da CP, com detecção UV-DAD em 254 nm. O tempo de retenção foi de 22,33 minutos.



**FIGURA 18.** a) Cromatogramas para o padrão de CP obtidos por eluição isocrática (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm; b) Ampliação da banda de eluição da CP.

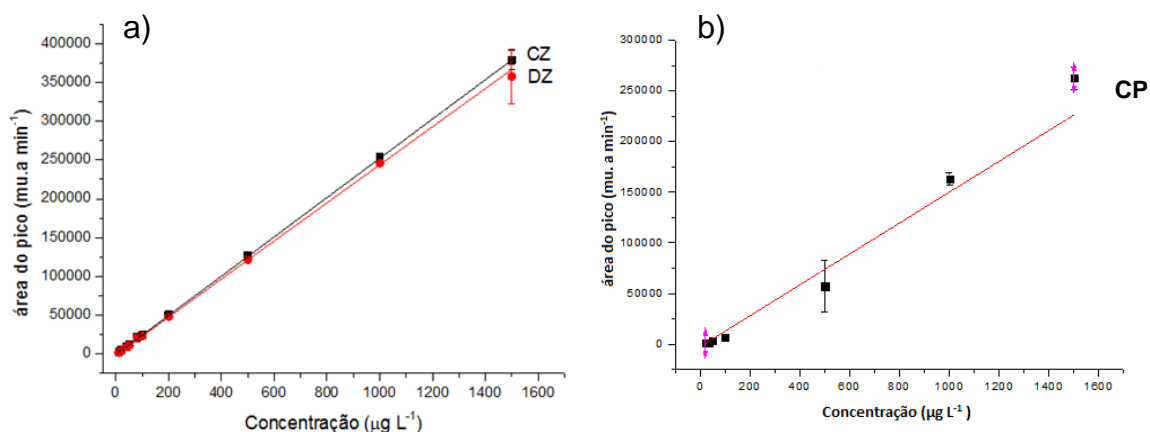
Na validação a seletividade também foi analisada pela comparação entre dois grupos de amostras, um com a matriz (água de rio) e o outro sem, ambos os grupos com a mesma concentração do analito de interesse. Depois de obtidas as áreas dos cromatogramas foram calculadas seus desvios-padrão e realizado o teste  $F_{(v=2, 95\% \text{confiança})}$ , para verificar a interferência da matriz nas concentrações dos analitos. O valor de  $F_{\text{encontrado}}$  para todos os analitos ( $F_{\text{encontrado}}$  para CZ:1,02 , DZ:0,15 e CP: 2,3) foram menores que o  $F_{\text{crítico}}$ , ou seja, as variâncias podem ser consideradas iguais, isto é, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo.

Sendo assim, os desvios-padrão dos grupos de testes podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição  $t_{(v=2, 95\% \text{confiança})}$  de *Student*. Através desta ferramenta estatística foi possível ver que o  $t_{\text{encontrado}}$  é maior que o  $t_{\text{crítico}}$ , isso significa que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio. Este efeito já era esperado, porque se trata de uma matriz aquosa complexa (água de rio), que sofreram com a interferência da matriz devido à presença de substâncias não removidas na etapa de pré-concentração. Assim, seria interessante estabelecer uma etapa prévia de *clean up* das amostras.

Contudo, o maior desvio padrão relativo (DPR) obtido foi de 2,45% para CZ, 4,36% para DZ e 7,29% para CP valor consideravelmente baixo no caso de análise ambiental, evidenciando a capacidade do método proposto em determinar os analitos, por calibração externa, mesmo na presença de elevada interferência.

#### 5.4.2 Linearidade

Neste trabalho, a padronização externa foi empregada para a quantificação dos compostos de interesse nas amostras de água em triplicata, e a avaliação da linearidade dos métodos, a partir das curvas analíticas para cada componente, bem como a sensibilidade, estimada de acordo com o coeficiente angular da reta (FIGURA 19).



**FIGURA 19.** Curvas analíticas médias para CZ e DZ (a) e CP (b).

Analisando os parâmetros das curvas analíticas é possível perceber uma boa linearidade para CZ, DZ e CP, que apresentaram coeficientes de correlação ( $r$ ) superiores a 0,9998 como é recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Também é possível avaliar a sensibilidade dos métodos através dos coeficientes angulares das equações da reta obtidas ( $b_{CZ} = 253,04$ ,  $b_{DZ} = 245,24$ ,  $b_{CP} = 177,99$ ). CZ e DZ apresentaram sensibilidades próximas sendo que o método desenvolvido é levemente mais sensível para CZ. Os valores obtidos para os parâmetros de mérito para as respectivas curvas analíticas estão apresentados na TABELA 18.

**TABELA 18.** Parâmetros da regressão das curvas analíticas obtidas para CZ, DZ e CP por HPLC-DAD à 286 nm, 254 nm e 254 nm respectivamente e principais parâmetros de mérito.

Parâmetros	CZ	DZ	CP
Coefficiente Linear (a)	-761,71	-1352,02	-4699,20
Coefficiente Angular (b)	253,04	245,24	177,99
Coefficiente de Determinação (R)	0,9998	0,9998	0,9998

#### 5.4.3 Limites de detecção e de quantificação

Os Limites de Quantificação (LQ) foram estimados de acordo com recomendações do INMETRO, o qual considera o LQ como a menor

concentração que pode ser quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão, usualmente considerando-se variações máximas de 20% (INMETRO, 2007).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003) os limites de detecção e quantificação podem ser calculados com base em parâmetros da curva analítica, sendo a razão entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva de regressão multiplicada por 3 no caso de LD e por 10 quando LQ.

Aplicando este critério, foram obtidos os limites de detecção de 6,27; 13,0 e 58,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CZ, DZ e CP respectivamente. O limite de quantificação foi de 20,9; 43,5 e 167,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CZ, DZ e CP respectivamente.

Com a aplicação do fator de pré-concentração (100x) para 100 mL de amostra reconstituída em 1mL no SPE, podemos recalculer LD e o LQ do método proposto para os analitos, que podem ser observados na TABELA 19 .

**TABELA 19.** Limites de detecção e quantificação encontrados para o método proposto.

Limites	CZ	DZ	CP
Detecção ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,0627	0,13	0,583
Quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,209	0,435	1,677

Os valores de LQ encontrados para os fármacos estão próximos aos valores relatados por outros estudos que utilizam instrumentação semelhante (CAMACHO-MUNOZ *et al*, 2009; MADUREIRA *et al*, 2010; TERNES, 1998; CABEZA, 2012) para a determinação destes psicofármacos em amostras de rio.

#### 5.4.4 Ensaio de precisão

##### a) Repetibilidade (precisão intra-corrida)

Considerando os dados obtidos a partir das nove soluções analíticas no mesmo dia (triplicata de três concentrações diferentes), o método demonstrou repetibilidade. Esses ensaios apresentaram um desvio padrão relativo de até



6,06% para CZ, 3,64% para DZ e 1,93% para CP o que pode ser visto na TABELA 20.

**TABELA 20.** Áreas médias obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$  no mesmo dia.

<b>Compostos</b>	<b>Concentração <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Área média</b>	<b>*DPR(%)</b>
<b>CZ</b>	50	10763,33	6,06
	500	107661,0	0,64
	1000	207574,7	0,45
<b>DZ</b>	50	11920,33	1,34
	500	108628,7	3,64
	1000	218436,3	2,15
<b>CP</b>	110	14532,62	0,86
	500	80953,67	1,93
	1000	161989,7	1,38

\* DPR. Desvio Padrão Relativo

O INMETRO (2007) determina um coeficiente de variação máximo de 20%. Já a ANVISA (BRASIL, 2003), preconiza que os coeficientes de variação não devem ser superiores a 5% para a determinação de fármacos em medicamentos. No entanto, para a determinação destes compostos em matrizes mais complexas, como soro, sangue ou plasma, se aceita um valor de até 15%. Assim, de acordo com os valores determinados, o método utilizado é preciso, pois todos os compostos estudados apresentam desvio-padrão relativo menor que 6,06%.

#### b) Precisão intermediária (precisão inter-corrída)

Os dados obtidos a partir da triplicata de três níveis de concentrações, em três dias diferentes mostraram um desvio padrão relativo (DPR%) aceitável, como visto no tópico anterior, para todos os analitos (TABELA 21, na próxima página) (BRASIL, 2003).

**TABELA 21.** Áreas médias obtidas e desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  em três dias diferentes.

<b>Compostos</b>	<b>Concentração <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Área média</b>	<b>*DPR(%)</b>
<b>CZ</b>	50	10645,11	3,87
	500	108133,9	0,82
	1000	208274,7	1,56
<b>DZ</b>	50	11684,56	6,61
	500	116479,4	0,24
	1000	226161,9	0,21
	110	15781,67	7,85
<b>CP</b>	500	79965,33	2,88
	1000	161866,8	1,38

\* DPR. Desvio Padrão Relativo

Além do desvio padrão relativo, todos os resultados desse ensaio foram também avaliados estatisticamente por ANOVA (one way) com 95% de confiança. Foi avaliado o conjunto de dados das análises da concentração versus concentração (repetibilidade) e a concentração versus os dias diferentes (precisão intermediária). E todos os  $F_{\text{encontrado}}$  para todos os analitos foram menores que o  $F_{\text{crítico}}$ , confirmando que os conjuntos de resultados analisados no mesmo dia e em dias diferentes não tiveram diferença significativa.

#### 5.4.5 Ensaio de exatidão

No presente estudo, a exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação. Foi utilizado um volume de 200 mL de amostras de água que foram previamente fortificadas em três níveis de concentrações diferentes com todos os compostos. As amostras fortificadas foram posteriormente extraídas de acordo com o procedimento de extração SPE e avaliadas no método cromatográfico citado. As análises foram realizadas em triplicata. As médias das menores taxas de recuperação obtidas foram para CP (TABELA 22, na próxima página).

**TABELA 22.** Recuperações obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Compostos	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)	*DPR (%)
<b>CZ</b>	50	98,25	3,87
	500	89,66	0,82
	1000	85,84	1,56
<b>DZ</b>	50	98,37	6,61
	500	92,66	3,67
	1000	89,67	3,87
	110	47,54	4,44
<b>CP</b>	500	64,65	2,88
	1000	63,58	5,38

\* DPR. Desvio Padrão Relativo

#### 5.4.6 Ensaio de robustez

Os parâmetros de robustez avaliados (fluxo, temperatura, pH da solução de tampão fosfato e diferentes lotes de fabricantes) mostraram que o método consegue suportar pequenas e deliberadas variações sem que haja mudanças significativas na recuperação dos resíduos e na eficiência cromatográfica.

Os valores dos desvios padrões relativos das áreas encontrados tanto para o CZ, DZ e CP na concentração de trabalho, estão dentro da variação do próprio método. Portanto, pode-se afirmar que as mudanças provocadas não interferiram na recuperação do método.

Ao analisar a TABELA 23, pode-se perceber que a variável que mais interferiu na retenção dos analitos é o fluxo, porém essa variação ocorreu quase que na mesma proporção para todos os analitos, sem que houvesse prejuízo significativo na eficiência cromatográfica, com uma pequena alteração na eficiência devido à mudança do número de pratos teóricos, pela mudança no tempo de retenção. As demais variáveis (temperatura, pH da solução de tampão fosfato e diferentes lotes de fabricantes) não apresentaram mudanças significativas nos cromatogramas.

**TABELA 23.** Áreas médias obtidas e o desvio-padrão relativo referente às injeções de triplicatas de padrões de 50/110, 500 e 1000 µg L<sup>-1</sup> no mesmo dia.

Parâmetros avaliados	Modificação	Média das áreas (± DPR)*		
		CZ	DZ	CP
Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	0,3	130873,6±1,25*	135036,0±2,4*	76372,1±2,57*
	0,4	136697,2±0,87*	123560,2±0,34*	78226,8±1,5*
	0,45	88685,6± 2,45*	96447,3±1,56*	77143,3±3,57
	25	98320,3±2,84*	108252,6±3,54*	-
Temperatura (°C)	30	99766,2±0,44*	110425,3±0,57*	-
	35	99668,0±1,34*	109733,3±1,66*	-
	3,4	-	-	80388±5,45*
pH da solução de tampão fosfato 0,01 M	3,5	-	-	79651±2,88*
	3,6	-	-	82822±4,61*

Além dessas variáveis, foram avaliadas colunas de diferentes fabricantes com a mesma especificação, concentração da solução tampão fosfato e pH da amostra como citadas e discutidas no desenvolvimento do método cromatográfico e da extração em fase sólida.

## 5.5 ANÁLISE DE AMOSTRA DO RIO

Após o desenvolvimento da metodologia e validação do método foi realizado um monitoramento da ocorrência desses compostos no rio e nos locais já mencionados anteriormente no município de Curitiba-PR. Um total de 16 amostras foram analisadas, cada dia de coleta foi amostrado três matrizes aquosas diferentes (nascente, 5Km da nascente e foz). As coletas foram realizadas, no ano de 2015, em quatro datas diferentes: a primeira no dia 12 de maio, a segunda no dia 1º de junho, a terceira no dia 6 de julho e a quarta no dia 20 de outubro. Todas as amostras após coletadas foram filtradas, concentradas e analisadas conforme os procedimentos descritos anteriormente. Os seguintes compostos foram investigados nas amostras: CZ, DZ e CP. Foi possível avaliar as amostras do rio e amostras fortificadas com os analitos em questão.

### 5.5.1 Amostras do rio Belém fortificadas

Após aplicação do processo de extração em fase sólida nos parâmetros selecionados anteriormente estimou-se a quantidade dos analitos em cada amostra real analisada empregando a curva analítica cromatográfica construída. As taxas de recuperação obtidas para as amostras fortificadas com  $2,42 \mu\text{g L}^{-1}$  CP,  $2,56 \mu\text{g L}^{-1}$  DZ e  $2,26 \mu\text{g L}^{-1}$  CZ estão apresentadas na TABELA 24.

**TABELA 24.** Recuperação dos analitos em amostra real fortificada nos três diferentes pontos de coleta do rio Belém.

Amostra	Característica	Recuperação (%) $\pm$ DPR*		
		CZ	DZ	CP
Ponto 1	Nascente	65,83 $\pm$ 7,00	61,00 $\pm$ 6,76	66,00 $\pm$ 3,54
Ponto 2	5 km da nascente	73,67 $\pm$ 2,75	57,16 $\pm$ 2,31	117,04 $\pm$ 7,3
Ponto 3	Foz	43,45 $\pm$ 8,33	40,50 $\pm$ 7,76	nd*

\*DPR = Desvio Padrão Relativo; \*n.d. = não detectado

Apesar da técnica de SPE desenvolvida ter-se mostrado viável para a determinação dos fármacos de interesse, na análise de amostras da água do rio o efeito de matriz se manifestou de forma intensa, em função da presença de substâncias não removidas na etapa de pré-concentração, as quais podem apresentar sinais de intensa absorção na mesma região dos analitos influenciando nas respostas cromatográficas, o que pode ser demonstrado pelos diferentes desvios apresentados na TABELA 24.

Esse efeito de matriz, também conhecido como "aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz", é usado para explicar as taxas de recuperação que excederem 100% e a baixa precisão de resultados. A CP apresentou uma recuperação acima de 100% o que mostra que este resíduo de medicamento está interagindo com a matriz e carregando algum interferente junto no SPE. Apesar disso, o maior desvio obtido foi de 7,76%, o qual em se tratando de análise ambiental pode ser considerado baixo, mostrando que o método proposto foi capaz de determinar o analitos de interesse mesmo na presença de elevada interferência (PURDIE *et al.*, 2009).

Existe, portanto, um grande efeito de matriz nessas amostras, uma vez que grande parte dos compostos orgânicos, tipicamente substâncias húmicas, apresentarem bandas de absorção na região do ultravioleta (PURDIE *et al.*, 2009). Em alguns casos não foi sequer possível visualizar as bandas de eluição para CP nas amostras fortificadas, como ocorreu nas amostras coletadas à 5 km da nascente e na foz. Isso provavelmente porque a quantidade que foi fortificada para este psicofármacos foi baixa. Visto que sua melhor recuperação no desenvolvimento da metodologia do SPE foi 36,86% (TABELA 12), que sua corrida cromatografia é de 22,33 minutos (FIGURA 17) em uma matriz ambiental complexa, esses fatores corroboram para a não detecção do mesmo.

### 5.5.2 Amostras do rio Belém não fortificadas

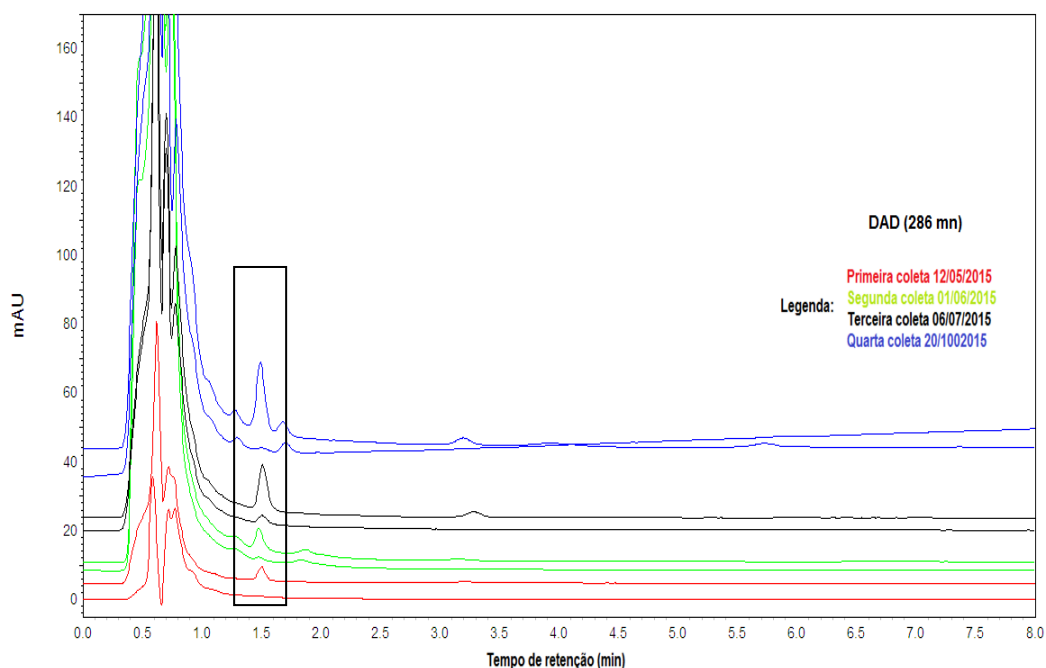
A metodologia desenvolvida foi aplicada para quantificação dos resíduos em três pontos do rio Belém. Os resultados obtidos no ponto um (nascente do rio) são apresentados na TABELA 25.

**TABELA 25.** Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 1 (próximo a nascente).

Resíduo	Concentração média do Ponto 1 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	1° coleta	2° coleta	3° coleta	4° coleta
<b>CZ</b>	<LQ	<LQ	0,3708	nd*
<b>DZ</b>	<LQ	<LD	nd*	nd*
<b>CP</b>	nd*	nd*	nd*	nd*

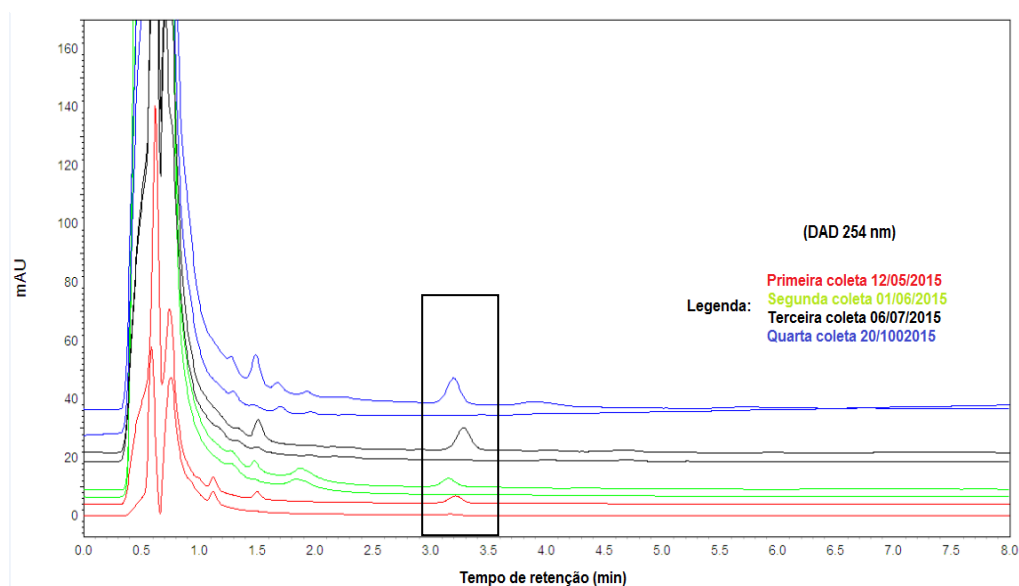
\*n.d. = não detectado

A CZ foi encontrada abaixo do limite de quantificação ( $0,209 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em praticamente todas as coletas realizadas na nascente do rio, somente na terceira coleta foi encontrada uma concentração acima do limite de quantificação  $0,3708 \mu\text{g L}^{-1}$ . Isso também é possível observar na FIGURA 20, em 1,5 minutos de corrida, na terceira coleta (primeira linha preta), como destacado.



**FIGURA 20.** Cromatogramas obtidos das quatro coletas da nascente (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para CZ.

O DZ na primeira coleta foi encontrado abaixo do limite de detecção ( $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e na segunda abaixo do limite de quantificação ( $0,435 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Na FIGURA 21 observar-se os cromatogramas com monitoramento (254nm) para DZ das quatro coletas obtidos para a nascente do rio. A CP não foi detectada em nenhuma amostra da nascente.



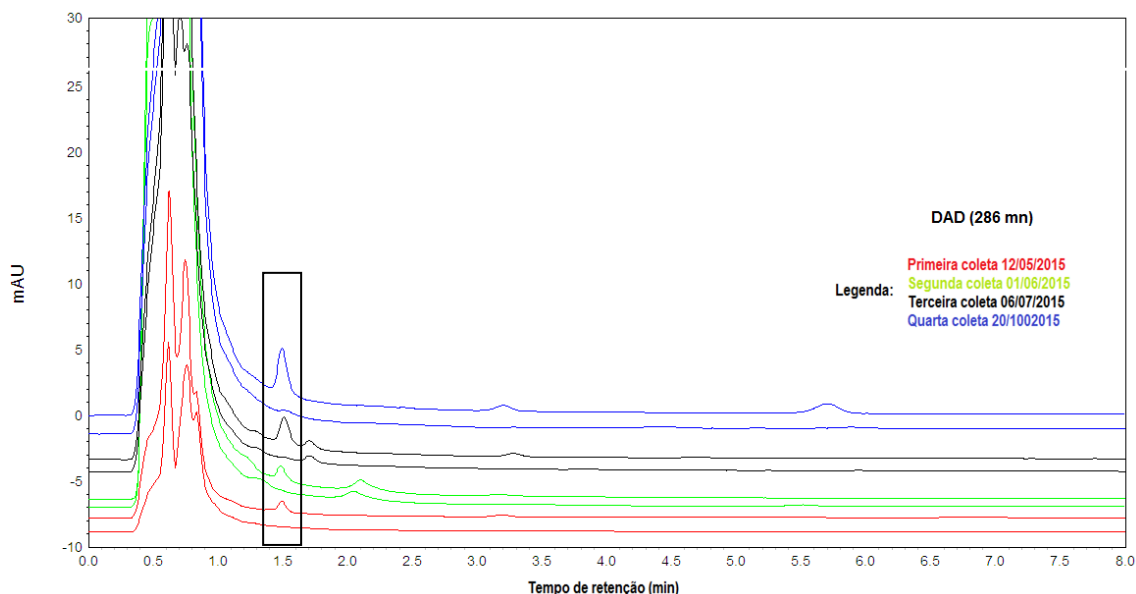
**FIGURA 21.** Cromatogramas obtidos das quatro coletas da nascente (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para DZ.

Os resultados obtidos no ponto dois (5 km da nascente) são apresentados na TABELA 26. Onde podemos ver que em todas as coletas foram encontrados resíduos de CZ abaixo do limite de quantificação  $0,209 \mu\text{g L}^{-1}$ . Na FIGURA 22 é possível ver os cromatogramas para monitoramento em 286 mn. A CP não foi detectada novamente. O DZ foi encontrado abaixo do seu limite de detecção ( $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

**TABELA 26.** Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 2 (5 km da nascente).

Resíduo	Concentração média do Ponto 2 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	1° coleta	2° coleta	3° coleta	4° coleta
<b>CZ</b>	<LQ	<LQ	<LQ	nd*
<b>DZ</b>	<LD	nd*	nd*	nd*
<b>CP</b>	nd*	nd*	nd*	nd*

\*n.d. = não detectado



**FIGURA 22.** Cromatogramas obtidos das quatro coletas no ponto 2 (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para CZ.

Os resultados obtidos no ponto três (foz) são apresentados na TABELA 27. Podemos observar que esse ponto de coleta sofre com maior contaminação por possui maior quantidade de matéria orgânica, ou seja, o efeito de matriz deste local do rio é mais acentuado. Contudo, foi possível

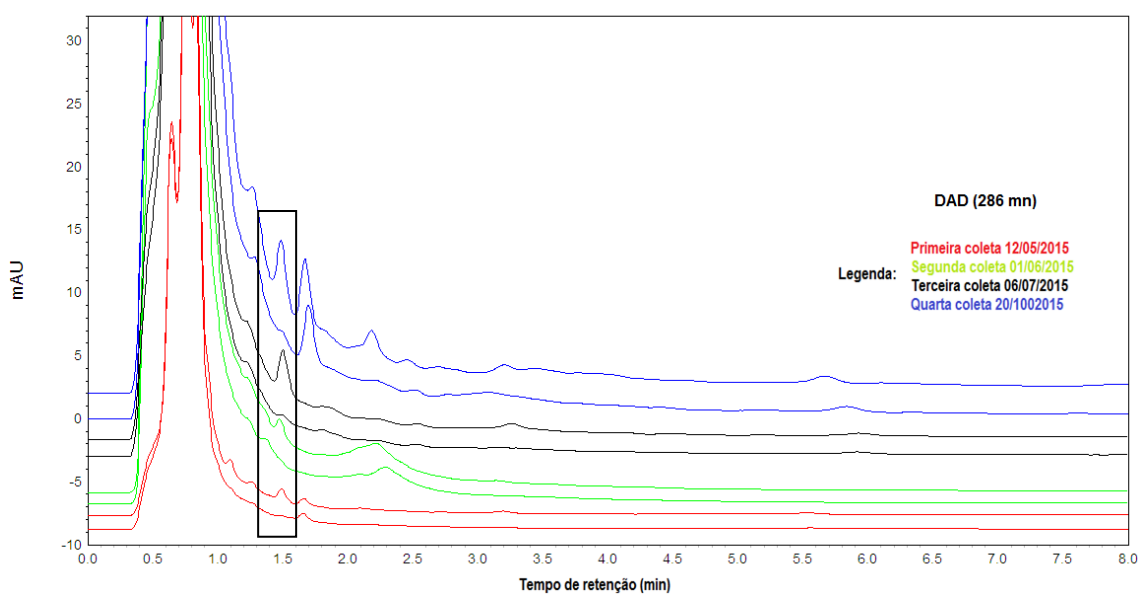


quantificar CZ e DZ nas matrizes aquosas do final do rio. Os cromatogramas obtidos nessas amostras estão apresentados nas FIGURAS 23 abaixo, para CZ e nas FIGURAS 24 e 25 para DZ e CP respectivamente, na página seguinte. Para CP a destaque foi na segunda coleta, única vez em que esse resíduo foi detectado.

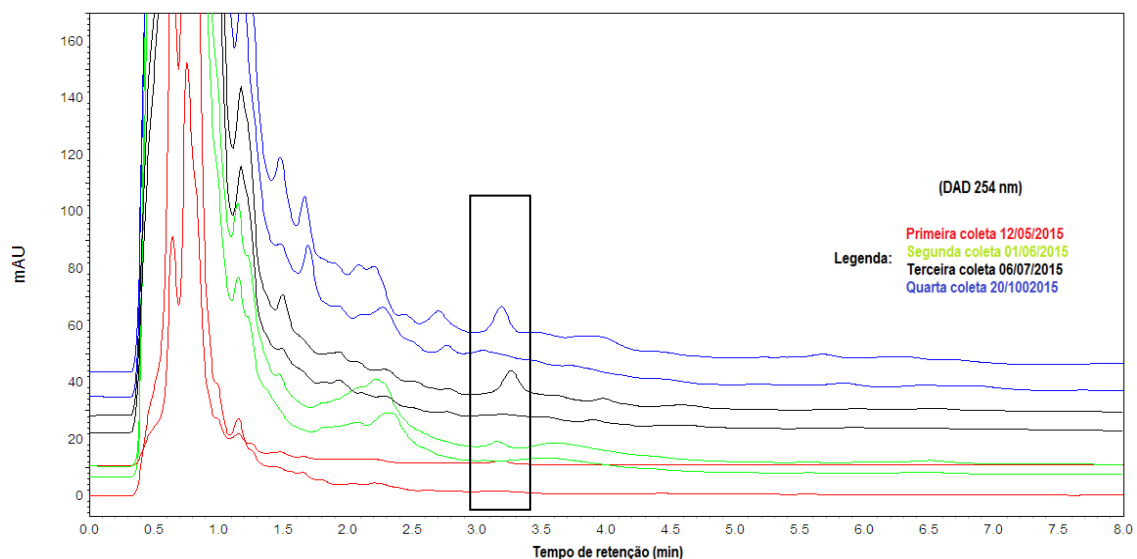
**TABELA 27.** Média de concentração dos resíduos encontradas em cada coleta no Ponto 3 (Foz).

Resíduo	Concentração média do Ponto 3 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	1° coleta	2° coleta	3° coleta	4° coleta
<b>CZ</b>	<LD	0,8559	<LQ	nd*
<b>DZ</b>	<LD	0,7632	nd*	nd*
<b>CP</b>	nd*	<LQ	nd*	nd*

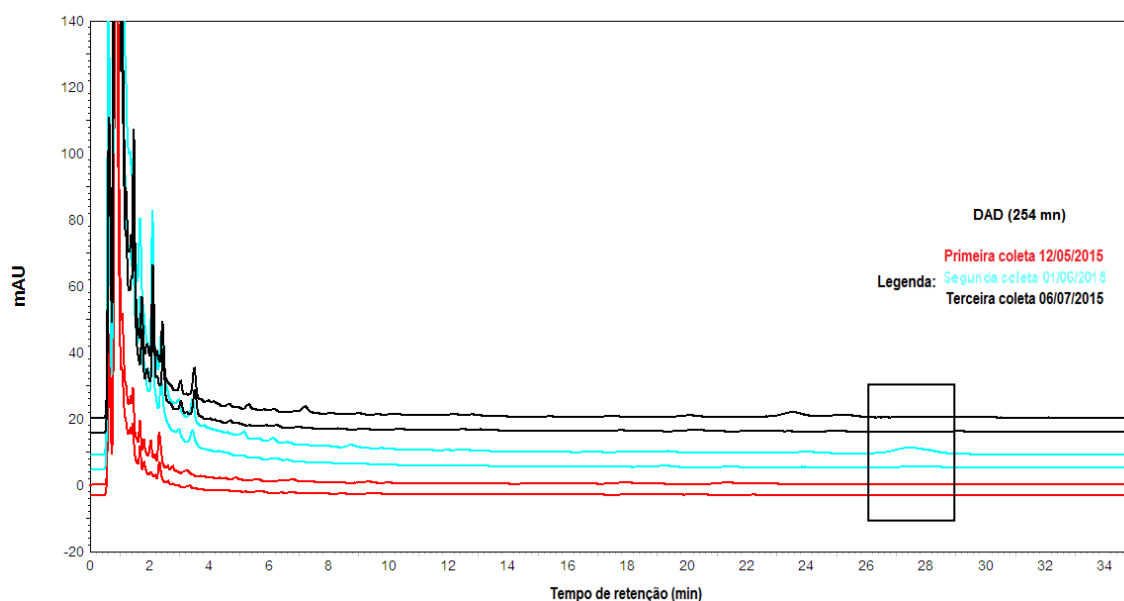
\*n.d. = não detectado



**FIGURA 23.** Cromatogramas obtidos das quatro coletas da foz (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 286 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para CZ.



**FIGURA 24.** Cromatogramas obtidos das quatro coletas da foz por eluição isocrática (metanol:água, 60:40, v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para DZ.



**FIGURA 25.** Cromatogramas obtidos das três primeiras coletas da foz (acetonitrila: tampão fosfato 0,05M pH 3,5, 65:35: v:v) e detecção DAD à 254 nm; A primeira linha são as amostras naturais e a segunda linha são amostras fortificadas. O destaque na figura para CP na segunda coleta.

Observa-se que na segunda coleta (1º de junho), final do outono e começo do inverno, quando o município de Curitiba apresentou dias secos com poucas precipitações, foi possível quantificar CZ ( $0,8559 \mu\text{gL}^{-1}$ ) e DZ ( $0,7632 \mu\text{gL}^{-1}$ ) na matriz aquosa do final do rio Belém (INMET, 2015).

Ademais nesta segunda coleta foi o único momento em que a CP foi encontrada abaixo do limite de quantificação ( $1,677 \mu\text{gL}^{-1}$ ). Entretanto, devido a diluição, a degradação dos fármacos e esses baixos níveis encontrados, para confirmar os resultados seriam necessários realizar uma análise confirmatória com métodos de detecção mais sensíveis como, por exemplo: detecção por massa (MS) (HARRIS, 2008).

No entanto, a aplicação dessa tecnologia sofisticada e cara ainda não está disponível em todos os laboratórios. Sendo assim, o método analítico apresentado em um único passo de pré-concentração (SPE), seguido por uma cromatografia líquida de alto desempenho com análise por *diodo array detector* (HPLC-DAD), demonstrou que esta metodologia é muito útil para o rastreamento de amostras farmacêuticas em águas poluídas.

Pelos resultados das tabelas acima, verifica-se que o ponto três, que é a foz do rio, apresenta maior contaminação orgânica, visto pela presença de vários picos de substâncias desconhecidas no começo da corrida. Além disso, a diferença entre as três coletas também foram evidenciadas. Visto que as coletas foram realizadas com pluviosidade semelhante (no mínimo 72h sem chuva forte antes de cada coleta), as diferenças podem ter ocorrido pelas coletas terem acontecido em estações climáticas diferentes, ocorrendo assim uma grande variação climática entre as três coletas (HEBERER, 2002; BOXALL, 2004).

As duas primeiras coletas ocorreram nos meses de maio e junho, na estação do outono, onde temos temperaturas mais quentes que o inverno, o que pode favorecer a decomposição dos resíduos, isso porque a atividade bacteriana é mais favorecida em temperaturas maiores além de pouquíssimos dias de chuva (CASTIGLIONI *et al.*, 2006). Na segunda em junho, onde podemos identificar a presença de todos esses resíduos na foz do rio, e nas proximidades da nascente a presença de CZ e DZ. A terceira coleta foi realizada no inverno, em julho, onde somente a CZ foi possível quantificar e os outros resíduos foram detectados abaixo de seu limite de detecção. Na última coleta em novembro, na primavera, não foi detectado nenhum medicamento. Essa estação do ano em Curitiba é marcada por muita chuva e clima quente, o

que desfavorece a detecção dos resíduos (INMET, 2015). Os valores de concentração encontrados para a CZ no rio são compatíveis com resultados reportados em trabalhos de natureza similar, como pode ser verificado na TABELA 2. Isso leva-nos a pensar sobre a qualidade das águas dos rios da cidade.

Segundo a SANEPAR (2015), Curitiba tem 65% das residências da cidade ligadas à rede de esgoto corretamente e sobre a sub-bacia do Belém é 90% (IAP, 2005). Porém este valor também pode estar sendo negligenciado, porque as moradias irregulares não entram nesta contagem. O rio Belém é um rio urbano, da nascente a foz, ele se encontra dentro da cidade, o que contribui muito para sua poluição. Além do que, ao correr suas margens se observa muitas moradias irregulares e invasões, usando o rio como depósito de lixo e descarte de esgoto.

Com esses resultados pode-se observar que em relação ao monitoramento da qualidade das águas dos rios a cidade ainda tem muito a avançar. Conforme o Ministério do Meio Ambiente, apenas nove unidades da Federação possuem sistemas de monitoramento considerados ótimos ou muito bons, cinco possuem sistemas bons ou regulares e treze apresentam sistemas fracos ou incipientes. O Paraná tem um ponto de água monitorado a cada 1000 km<sup>2</sup>, o que é considerado bom (ANA, 2012).

O monitoramento da qualidade das águas no país é muito incipiente e com escassez de dados, conseqüentemente, há uma dificuldade na geração de índices de qualidade das águas ou até mesmo para a aplicação do Índice de Qualidade de Água (IQA), tornando assim, uma avaliação detalhada mais difícil e criando uma lacuna em relação às informações que poderiam contribuir nas tomadas de decisão de preservação e/ou revitalização dos rios (ANA, 2012).

Além disso, pelo fato do IQA ser adotado como avaliador de qualidade das águas na maioria dos estados brasileiros, deve-se atentar que o diagnóstico quanto à deterioração dos corpos d'água monitoradas podem ser bem mais críticos do que como apresentado, pois não se consideram os parâmetros que contemplam as milhares de substâncias potencialmente tóxicas lançadas no ambiente, como os psicofármacos (ANA, 2013).

A dificuldade ou incompleta remoção de muitos micropoluentes emergentes, devido às propriedades físico-químicas (baixa degradabilidade), coloca o sistema de suprimento de água potável em risco (BILA; DEZOTTI, 2003).

A presença de CZ em todas as partes do rio pode estar relacionada ao perfil de consumo de medicamentos da população, visto que um dos fatores que influenciam o potencial de uma droga atingir o ambiente é volume de produção e padrões de consumo (HEBERER, 2002). Corroborando com esses pensamentos anteriores, a CZ foi um dos medicamentos mais dispensados nos CAPS estudados de acordo com o levantamento feito.

Não foi possível a quantificação da CP, um dos fatores que pode ter contribuído, além da interferência da matriz e seu longo tempo de corrida, é a quantidade de medicamento que é eliminado inalteradamente na excreção do fármaco que é 1% diferente da CZ que é 10% (MOFFAT *et al.*, 2004).

Se fossemos estimar superficialmente a quantidade em massa dos medicamentos estudados que iriam para o meio ambiente, idealizando que todos os indivíduos atendidos pelos CAPS não tivessem esgoto ligado à rede. Poderíamos calcular em gramas a quantidade de CZ, DZ e CP dispensada pelos dois CAPS estudados (unidades farmacêuticas vezes dosagem do fármaco) teríamos 197 g, 305,6 g e 6,64 g respectivamente. Imaginando que a excreções de todos os indivíduos se comportaria conforme a literatura, não se levando em consideração diferenças biológicas. A quantidade de CZ que iria para o rio Belém seria 19,7 g (calculando que 10% é excretado como fármaco inalterado), de DZ seria 0,1938 g (calculando que 3% é excretado como fármaco inalterado) e de CP seria 3,05 g (calculando que 1% é excretado como fármaco inalterado). Por esta suposição seria lógico encontrar mais CZ na água do rio do que CP, apesar de ser o medicamento mais dispensado.

O CAPS presta um serviço regionalizado, porque é um dos fundamentos do SUS, ou seja, a regionalização dos serviços implica na delimitação de uma base territorial para o sistema de saúde, que leva em conta a divisão político administrativa da cidade, mas também contempla a delimitação de espaços territoriais específicos para a organização das ações de saúde, subdivisões ou

agregações do espaço político-administrativo. Sendo assim, as pessoas que foram usuárias desses dois CAPS estudados moravam na região sobre a sub-bacia do rio Belém, porque esses bairros se localizam sobre ela. Moradias em que não tem ligação à rede de esgoto corretamente acabam descartando seus resíduos em rios ou córregos desta sub-bacia que são afluentes do rio principal, o Belém. O rio Belém é tributário da margem direita do rio Iguaçu, o qual é uma das bacias usadas para o abastecimento de água do município de Araucária e União da Vitória, como informado no site das prefeituras de cada cidade (ARAUCÁRIA. Prefeitura municipal, 2015; UNIÃO DA VITÓRIA. Prefeitura municipal, 2015)

Devido à importância frente à Saúde Pública destas substâncias e sob o ponto de vista ecotoxicológico é essencial averiguar suas ocorrências nos sistemas aquáticos superficiais, mesmo que ainda não seja contemplada em legislações ambientais brasileiras.

É necessário que haja mais pesquisas nessa área e que outros estudos futuros venham a contribuir para o estabelecimento de parâmetros legais dos resíduos de fármacos em matrizes aquosas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Através da identificação dos medicamentos mais dispensados nos CAPS, pelos Livros de Registro Específico de Medicamentos Controlados no período de 2011 a 2014, foi possível escolher os medicamentos que seriam investigados na água do rio como contaminantes emergentes.

Com esse levantamento foi possível desenvolver um método SPE-HPLC-DAD que possibilitou a análise dos psicofarmacos mesmo diante da complexidade das amostras, em que foi possível isolar e concentrar os analitos de interesse, garantindo ainda resultados com taxas de recuperação satisfatórias.

Para a otimização dos parâmetros experimentais foi usada a tradicional técnica univariada e também a multivariada e estas com as suas vantagens e desvantagens forneceram resultados importantes sobre as variáveis que iriam interferir no resultado do estudo, permitindo assim uma otimização adequada e eficiente dos analitos estudados. Saliendo a importância de analisar as interações entre as variáveis na análise multivariada e também a facilidade de interpretação dos resultados na análise univariada.

Os dois métodos desenvolvidos apresentaram resultados adequados para os parâmetros validados. Dada a complexidade da matriz e os baixíssimos níveis de concentração, os valores de recuperação, precisão e exatidão observados estão plenamente dentro dos intervalos aceitos por fontes bibliográficas que tratam do assunto. Adicionalmente, são bons os limites de detecção e quantificação por SPE, considerado o volume de amostra consumido de apenas 100 mL. No entanto, esta metodologia otimizada aliada a detectores mais sensíveis pode ser usada para melhorar a detectabilidade do método. Além disso, para trabalhos futuros seria interessante estabelecer uma etapa prévia de *clean up* das amostras, para diminuir a interferência da matriz nas amostras.

A aplicabilidade do método foi demonstrada através da análise de amostras aquosas coletadas em diferentes regiões da cidade de Curitiba, no rio Belém possibilitando a detecção e quantificação de dois psicofarmacos estudados em algumas dessas amostras. Medicamentos esses que se encontram entre os mais dispensados pelos CAPS estudados.

Com esta informação podemos refletir que as matrizes aquosas do país acabam recebendo substâncias nocivas diversas, como os poluentes emergentes, entre eles os medicamentos, cujos efeitos ambientais e aos seres vivos são pouco conhecidos.

Considerando o pequeno número de trabalhos brasileiros que tem como finalidade a análise de fármacos em matrizes ambientais, este trabalho espera ter chamado a atenção para estes compostos ainda pouco conhecidos e estudados como contaminantes no meio ambiente e que este possa ser um incentivo a novos pesquisadores.



## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.A.A.; BRENNER, C.G.; 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, p. 2349–2355, 2013.

AMARAL, BIANCA. **Avaliação de métodos de pré-concentração em fase sólida para determinação de atrazina e seus metabólitos empregando-se métodos espectroscópicos multivariados**. 112 f. Dissertação (Mestrado). Curitiba (PR)- Universidade Federal do Paraná. 2014.

ANA. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil. Brasília, 2013. Disponível em: <[http://arquivos.ana.gov.br/institucional/spr/conjuntura/webSite\\_relatorioConjuntura/projeto/index.html](http://arquivos.ana.gov.br/institucional/spr/conjuntura/webSite_relatorioConjuntura/projeto/index.html)>. Acesso em: 22/07/2014.

ANA. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil. Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. - Brasília: ANA, SPR, 2012. Disponível em: [http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/Panorama\\_Qualidade\\_Aguas\\_Superficiais\\_BR\\_2012.pdf](http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/Panorama_Qualidade_Aguas_Superficiais_BR_2012.pdf). Acesso em: 12/02/ 2015.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F.N.; Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba - RMC. In: 9º SILUBESA - Simpósio Brasileiro De Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: 2000 abr. p.196-205.

ANDRADE, L. N. AUTODEPURAÇÃO DOS CORPOS D'ÁGUA. **Revista de Biologia USP**, v. 5, p. 16–19, 2010.

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, F.; PAXEUS, N. Pharmaceuticals in STP e effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere**, v. 50, p. 1319-1330, 2003.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Aumenta em 161% o consumo de medicamentos controlados no Brasil**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13/9/2015.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa: 44% dos remédios controlados vendidos são para transtornos mentais e de comportamento**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/07/anvisa-44-dos-remedios-controlados-vendidos-sao-para-transtornos-mentais-e-de-comportamento>>. Acesso em: 11/12/2015.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório SNGPC**. Brasília, 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio\\_2009.pdf](http://www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio_2009.pdf)>. Acesso em: 14/8/2014.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARAUCÁRIA. Prefeitura de municipal. **Dados gerais**. Disponível em: <<http://www.araucaria.pr.gov.br/araucaria/dados-gerais/>>. Acesso em: 02/11/2015.

ARIESE, F.; WILFRIED, H. O. E.; DICK, T. H. M.; SIJM, C. Natural and synthetic organic compounds in the environment a symposium report. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, n. 1, p.65-80, 2001.

DRUGBANK. **Drug e drug target database**. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 02/11/2014.

BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 195-204, 2005.

BEUTLER A.S.; LI, S.; NICOL, R.; WALSH, M.J. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases". **Life Science**, v. 76, p. 3107-15, 2005.

BERNARDES, A.C.M ; SOUZA, S.V.C. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos proposto pela ANVISA (REN ° 899 de 2003) com o documento orientativo do INMETRO e do protocolo Internacional harmonizado pela AOAC Internacional, ISO e IUPAC. **Revista analítica**, nº 51, Ano 9, p.66-77, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003. SBQ. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422003000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 12/8/2014.

BIRCH, G.F.; DRAGE, D.S.; THOMPSON, K.; EAGLESHAM, G.; MUELLER, J.F. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v.97, p. 56–66, 2015.

BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. **Endocrine disrupters in waswater and sludge treatment processes**, 1ªed, IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC:USA. 2003.

BÖGER, B.; TONIN, T. F.; ZAMORA, P. G. P.; WAGNER, R.; GOMES, E. C. Micro-poluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do

Brasil – Uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**, v.37, n.3, p. 725-739, 2015.

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **The Science of the Total Environment**, v. 311, p. 135 –149, 2003.

BOXALL, A.B.A. The environmental side effects of medication. **EMBO Reports**, v.5, n.12, p.1110-1116, 2004.

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. 129–39, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PORTARIA n. 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.

**Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 maio. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO n. 899 de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

**Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. de 2003.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**. , Brasília, DF, n 53, p. 58-63, 18 mar. de 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO n. 430, de 25 de setembro de 2003. 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 **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**. , Brasília, DF, n 92, p. 89, 12 mai. de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 3.088, de 23 de dezembro de 2011. Institui a Rede de Atenção Psicossocial para pessoas com sofrimento ou transtorno mental e com necessidades decorrentes do uso de crack, álcool e outras drogas, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**. , Brasília, DF, n 96, p. 37-38, 21 mai. de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade

da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil.**, Brasília, DF, p. 22, 21 jun. de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 336/GM, 19 de fevereiro de 2002. Define e caracteriza as modalidades dos Centros de Atenção Psicossocial na rede SUS. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil.**, Brasília, DF, 19 fev. de 2002.

BRASIL. Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente. PORTARIA n. 020/92, 12 de maio de 1992. Caracteriza bacia do rio Iguaçú. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil.**, Brasília, DF, 12 mai. de 1992.

BROOKS, B.W.; TURNER, P.K.; STANLEY, J.K.; WESTON, J.J.; GLIDEWELL, EA.; FORAN, C.M.; SLATTERY, M.; LA POINT, T.W.; HUGGETT, D.B. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. **Chemosphere**, v.52, n.1, p. 153-142.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman.** 11° ed. McGraw Hill, 2006.

CABEZA, Y.; CANDELA, L.; RONEN, D.; TEIJON, G. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239, p. 32– 39, 2012.

CALLEJA, M.C.; PERSONNE, G.; GELADI, P. Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. **Archives of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 26, p. 69-78, 1994.

CAMACHO-MUNOZ, D.; MARTIN, J.; SANTOS, L. J.; APARICIO, I.; ALONSOE, E.; An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. **Journal of Separation Science**, v.32, p.3064-3073, 2009.

CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; POMATI, F.; *et al.* Removal of pharmaceutical in sewage treatment plants in Italy. **Environmental, Science & Technology**, v.40, n.1, p.357-363, 2006.

COATS, J.R.; METCALF, R.L.; LU, P.Y; BROWN, D.D.; WILLIAMS, J.F; HANSEN, L.G. Model Ecosystem Evaluation of the Environmental Impacts of the Veterinary Drugs Phenothiazine, Sulfametazine, Clopidol and Diethylstilbestrol. **Environmental Health Perspectives**, vol. 18, p. 167-79, 1976.

COLAÇO, R.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GOMES, E.C. Poluição por resíduos contendo compostos farmacologicamente ativos: aspectos ambientais, geração

a partir dos esgotos domésticos e a situação do Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v. 35, n. 4, p.:539-548, 2104.

CAMPANHA, M.C.; AWAN, A.T.; DE SOUSA, D.N.; GROSSELI, G.M.; MOZETO, A.A.; FADINI, P.S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n.10, p. 7936-47, 2015.

CURITIBA. Prefeitura de municipal. **Dados gerais**. Disponível em: <<http://www.curitiba.pr.gov.br/>>. Acesso em: 02/11/2015.  
CUNNINGHAM, V.L.; BUZBY, M.; HUTHCINSON, T.; MASTROCCO, F.; PARKE, N.; RODEN, N. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. **Environmental Science & Technology**, v.40, p. 3456–62, 2006.

DAI, G.; WANG, B.; HUANG, J.; DONG,R.;DENG, S.; YU, G. Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in the Beiyun River of Beijing, China. **Chemosphere**, n. 119, p. 1033–1039, 2015.

ÉBOLI. G.B. 2003. Mercado de Medicamentos no Brasil. **FEPAFAR**. Disponível em: <[http://www.femeba.org.ar/fundacion/quienessomos/Novidades/congreso\\_genéricos/eboliauditorio1630hs.pdf](http://www.femeba.org.ar/fundacion/quienessomos/Novidades/congreso_genéricos/eboliauditorio1630hs.pdf)>. Acesso em: 04/04/2014.

FDA-CDER. FOOD AND ADMINISTRATION. Retrospective review of ecotoxicity data submitted in environmental assessments, FDA Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, MD, USA. 1996. Disponível em <<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/>>. Acesso em: 02/11/2015.

FEDERHEN, C.; BRAND, M.; PATRIOTA, B.; MORISHITA, L.; GOMES, E. Perfil de utilização de medicamentos controlados em um centro de atenção psicossocial (CAPS) adulto para transtornos mentais de Curitiba/PR. In: **2º Congresso Paranaense de Saúde Pública**, 2014, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 2014.

FENAFAR.FEDERAÇÃO NACIONAL DE FARMACEUTICOS.**O consumo de medicamentos no Brasil**. Minas Gerais, 2015. Disponível em: <<http://www.fenafar.org.br/fenafar/crf/item/7966-o-consumo-de-medicamentos-no-brasil-a-tenue-linha-entre-o-remedio-e-o-veneno-por-rilke-novato>>. Acesso em: 23/09/2015.

FENSTAD, A. A; JENSSEN, B. M.; MOE, B.; et al. DNA double-strand breaks in relation to persistent organic pollutants in a fasting seabird. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 106, p. 68–75, 2014.

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Erratum to “Ecotoxicology of human pharmaceuticals” [Aquatic Toxicology 76 (2006) 122–159]. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 2, p. 207–207, 2006.

FERNÁNDEZ, C.; GONZÁLEZ-DONCEL, M.; CARBONELL, J. G.; TARAZONA, J.V. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.543–551, 2010.

FILHO, R. W. R.; BARREIRO, J. C.; VIEIRA, E. M.; CASS, Q. B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Ambi-agua**, v. 2, n. 3, p. 54–61, 2007. Disponível em: <<http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/article/viewFile/68/268>>. Acesso em: 15/8/2014.

FORTUNATO, R. A. **Subsídios a prevenção e controle das inundações urbanas: Bacia hidrográfica do rio Belém município de Curitiba- PR**. 217f. Dissertação [Mestrado em Construção Civil] - UFPR, Curitiba, PR, 2006.

GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. Uso de drogas psicotrópicas no Brasil: pesquisa domiciliar envolvendo as 107 maiores cidades do país. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 13, p. 888–95, 2005.

GHISELLI, G. **Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 187 f. Tese [Doutorado em Química] – Instituto de Química da UNICAMP, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000398476.pdf>>. Acesso em: 14/8/2014.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes Endócrino no Ambiente. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GIL, E. D. S.; MATHIAS, R. O. Classificação e riscos associados aos resíduos químicos- Farmacêuticos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 87-93, 2005.

GÓMEZ, J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGUERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, p. 993– 1002, 2007.

GÓMEZ, M.J.; AGUERA, A.; MEZCUA, M.; HURTADO, J.; MOCHOLÍ, F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography–tandem mass spectrometry in wastewater. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 314-320, 2007.

GUNNARSSON, L.; JAUHAINEN, A.; KRISTIANSSON, E.; NERMAN, O.; LARSSON, D. G. J. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental Science & technology**, v. 42, n. 15, p. 5807–13, 2008.. .

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v.68, n.9, p. a305-a309, 1996.

HALLING-SORENSEN, J. B.; NORS N. S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.;HOLTEN L.H.C.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review. **Chemosphere**, v. 36, n.2, p. 357-393, 1998.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7° ed. LTC, 2008.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5–17, 2002.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466–485, 2007.

HESS, S. C. Interferentes hormonais no ambiente: um risco à saúde pública. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo Do Pinhal**, v. 7, n. 3, p. 311–329, 2010.

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

HILTON, M. J.; THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **A**, v. 1015, p. 129–141, 2003.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M.T.; VENTURA, F. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. **Journal of Chromatography**, v. 1217, p. 4212-4222, 2010.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos analíticos, INMETRO. Rio de Janeiro, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Disponível em <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)> Acesso em: 15/8/2014.

IAP. INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ - Monitoramento da qualidade das águas dos rios da Região Metropolitana de Curitiba, no período de 2002 a 2005. 2005.Disponível em: < [www.pr.gov.br/meioambiente/iap](http://www.pr.gov.br/meioambiente/iap)>Acesso em: 20/03/14.

INMET. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Número de Dias com Precipitação Maior ou Igual a 1 mm (dias). 2015. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 02/11/2015

JESUS, P.R.C. As palavras e seus efeitos na Propaganda de Medicamentos no Brasil. -uma análise semiótica, midiática e ética. UNISANTA/Santos. Centro Universitário Municipal de São Caetano do Sul. 2004. Disponível em: <[http://www.cit.sc.gov.br/propaganda/pdfs/artigos/propaganda\\_de\\_medicamentos.pdf](http://www.cit.sc.gov.br/propaganda/pdfs/artigos/propaganda_de_medicamentos.pdf)> Acesso: 04/02/2014.

JONES, O. A; LESTER, J. N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 163–7, 2005.

KOUTSOUBA, V.; HEBERER, T.; FUHRMANN, B.; SCHMIDT-BAUMLER, K.; TSIPI, D.; HISKIA, A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 51, p. 69 -75, 2003.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KOT-WASIK, A.; DEBSKA, J.; NAMIES'NIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 557-568, 2006.

KÜMMERER, K. Emerging Contaminants versus Micro-pollutants. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 39, n. 10, p. 889–890, 2011.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: editora RiMa, 2004.

LARINI, L. **Toxicologia**. 2º ed. Editora Manoele LTDA., 1993.

LEITE, G. DE S.; AFONSO, R. J. DE C. F.; AQUINO, S. F. DE. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 734–738, 2010..

LIU, J.-L.; WONG, M.-H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environment international**, v. 59, p. 208–24, 2013.

LIN, A. Y.-C.; TSAI, Y.-T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3793-3802, 2009.



LÖFFLER, D.; TERNES, T. A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 133–144, 2003.

MADUREIRA, T.V.; ROCHA, M.J.; CASS, Q.B.; TIRITAN, M.E. Development and optimization of HPLC-DAD method for the determination of diverse pharmaceuticals in estuarine surface waters. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 3, p. 176-182, 2010.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; WATTS, J. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, 2004.

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

MOREIRA, D. S. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica por Cromatografia/Espectrofotometria de massas para Avaliação da Ocorrência de Perturbadores Endócrinos em Mananciais de Abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte**. 124 f. Dissertação (Mestrado). Ouro Preto (MG)-Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 336/GM, de 19 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, fev 1988.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Reforma Psiquiátrica e política de Saúde Mental no Brasil. Documento apresentado à Conferência Regional de Reforma dos Serviços de Saúde Mental : 15 anos depois de Caracas. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Relatorio15\\_anos\\_Caracas.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Relatorio15_anos_Caracas.pdf)> Acesso em: 03/11/2015

NENTWIG, G.; OETKEN, M.; OEHLMANN J. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates: the example of carbamazepine and clofibric acid. In: KUMMERER, K. **Pharmaceuticals in the environment**, 2003.p. 195-196.

NUNES, B.; GAIO, A. R.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 2, p. 341–54, 2008.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **La situation pharmaceutique dans le monde**. 1990. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16222f/s16222f.pdf>>. Acesso em: 14/8/2014.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório sobre a saúde mental no mundo** .2001. Disponível em: <<http://www.abebe.org.br/wp-content/uploads/oms2001.pdf>>. Acesso em: 12/12/2015

OLLERS, S.; SINGER, H. P.; FASSLER, P.; MULLER, S. R. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. **Journal of Chromatography A**, v. 911, p. 225–234, 2001.

PARK, J. Pharmaceuticals in the Environment and Management Approaches in Korea. **Korea Environment Institute**, 2012. Disponível em: <<http://webbook.me.go.kr/DLi-File/007/150647.pdf>>. Acesso em: 02/11/2015.

PETROVIC, M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 1, p. e25–e33, 2014.

PETROVIC, S.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, 2003.

PHILIPPI, J. A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri-SP: Manole, 2005.

PURDIE, E. L.; YOUNG, F. M.; MENZEL, D.; CODD, G. A. A method for acetonitrile-free microcystin analysis and purification by high-performance liquid chromatography, using methanol as mobile phase. **Toxicon**, n.54, p. 887-890, 2009.

RAIMUNDO, C.C.M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 172 f. Tese [Doutorado em Química] – Instituto de Química da UNICAMP, São Paulo, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. A. P.; AUGUSTO, L.; SILVA, M. Modificações nos padrões de consumo de psicofármacos em localidade do Sul do Brasil Modifications in psychotropic drug use patterns in a Southern Brazilian city. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 107–114, 2006.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 97–115, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307000908>>. Acesso em: 14/8/2014.

RODRIGUES, I.; QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; CELA, R. Determination of drugs in sewage water by gas

chromatography-mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 265-274, 2003.

SANEPAR. **Plano diretor do sistema de abastecimento integrado de Curitiba, 2011**. Disponível em:<  
[http://site.sanepar.com.br/sites/site.sanepar.com.br/files/rel\\_Relatorios\\_Trimestrais2014\\_12\\_13.pdf](http://site.sanepar.com.br/sites/site.sanepar.com.br/files/rel_Relatorios_Trimestrais2014_12_13.pdf)> Acesso em: 14/8/2014.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da bacia do rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo dessa fauna**. 175 f. Dissertação (Mestrado). São Carlos (SP)- Universidade Federal de São Carlos. 1988.

SANTOS, L. H. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M.C. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of hazardous materials**, v. 175, n. 1-3, p. 45–95, 2010.

SAUER, C. E. A análise ambiental legal de uma bacia hidrográfica com o recurso fotográfico: o caso do rio bacacheri em Curitiba - PR. **Caminhos de geografia**, v. 9, n. 25, P. 57-63, 2008.

SCHRANK, G.; OLSCHOWSKY, A. O centro de atenção psicossocial e as estratégias para inserção da família. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 42, n. 1, p. 127-32, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v.987, n.1-2, p.57-66, 2003.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1-4, p. 57–67, 2009.

SILVA, J. C. C. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação de Microcistina - LR e Agrotóxicos em Águas Superficiais, utilizando as Técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa Acopladas a Espectrometria de Massas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, MG, 2010.

SILVA, G. S.; JARDIM, W. F. Um novo índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática aplicado ao rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia SP. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 689-694, 2006.

SOUZA, M. E. T. A.; LIBANIO, M. Proposta de Índice de Qualidade para Água Bruta afluente a estações convencionais de tratamento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 4, 2009.

SOLIMAN, M. A.; PEDERSEN, J. A.; SUFFET, I. H. Rapid gas chromatography–mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1029, p. 223–237, 2004.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disruptors--environmental impacts. **Toxicology letters**, v. 102-103, p. 337–42, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022275>>. Acesso em: 12/08/2014.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135–41, 1999.

TAMBOSI, J. L.; YAMANAKA, L. Y.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. DE F. P. M.; SCHRÖDER, H. F. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 411–420, 2010.

TERNES, T.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, D.R.;SERVOS,M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 81–90, 1999.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 175–185, 2001.

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

TORRES, N. H.; HELOÍSA, J.; AMÉRICO, P.; et al. Farmacos no ambiente - Revisão. **Revista de estudos ambientais**, v. 14, n. 4, p. 67–75, 2012.

TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; HOLADY, J. C.; REXING, D. J.; SNYDER, S. A. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, p. 1990–1998, 2006.

THIBAUT, R.; SCHNELL, S.; PORTE, C. The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an in-vitro study. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 16, p. 5154–60, 2006.

THOMAS, K. V.; HILTON, M. J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436-444, 2004.

THOMAS, K.V.; SILVA, F.M.A.; LANGFORD, K.H.; SOUZA, A.D.L.; NIZZETO, L. WAICHMAN, A.V. Screening for Selected Human Pharmaceuticals and Cocaine in the Urban Streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Jawra**, v. 50, n.2, p.302-308, 2014

UNIÃO DA VITÓRIA. Prefeitura de municipal. **Dados gerais**. Disponível em:< <http://uniaodavitoria.pr.gov.br/> >. Acesso em: 02/11/2015

USEPA- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Water. 2013. Disponível em:< <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/ppcp/index.cfm>>. Acesso em: 24/06/ 2015.

VERENITCH, S. S.; LOWE, C. J.; MAZUMDER, A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1116, n. 1-2, p. 193–203, 2006.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.8-10, p.867-869, 1996

WANG, G.-S.; CHEN, H.-W.; KANG, S.-F. Catalyzed UV oxidation of organic pollutants in biologically treated wastewater effluents. **Science of The Total Environment**, v. 277, n. 1-3, p. 87–94, 2001.

WEIGEL, S.; BESTER, K.; HUHNERFUSS, H. New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 151–161, 2001.

WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 183–195, 2004.

XIU-SHENG, M.; KOENIG, B. G.; METCALFE. C. D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 139–147, 2002.

ZAGATTO, P. A.; LORENZETTI, M. L.; LAMPARELLI, M. C.; SALVADOR, M. E.; MENEGON, J.R.N.; BERTOLETTI, E. Aperfeiçoamento dos índices de qualidade das águas. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 11, p. 111-126. 1999.

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