

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/11/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-
LINE E LC-MS/MS E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING
NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL
(EXPOSOMA)**

ARARAQUARA
2020

CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-
LINE E LC-MS/MS E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING
NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL
(EXPOSOMA)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química, área de concentração
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de
Lima Gomes

Coorientadora: Dr.^a Bianca Ferreira da Silva

ARARAQUARA
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M298d Marasco Júnior, César Augusto
Determinação de fármacos como contaminantes em águas residuárias utilizando preparo de amostra on-line e LC-MS/MS e aplicação da técnica MRM-Profiling na avaliação de compostos de relevância ambiental (exposoma) / César Augusto Marasco Júnior. – Araraquara : [s.n.], 2020
161 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Coorientador: Bianca Ferreira da Silva

1. Preparo de amostras (Química). 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de massa. 4. Fármacos. 5. Esgotos - Aspectos ambientais. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO PREPARO DE AMOSTRA ON-LINE E LC-MS/MS, E APLICAÇÃO DA TÉCNICA MRM-PROFILING NA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE RELEVÂNCIA AMBIENTAL (EXPOSOMA)"


AUTOR: CÉSAR AUGUSTO MARASCO JÚNIOR

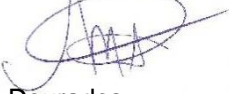
ORIENTADOR: PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

COORIENTADORA: BIANCA FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual) 
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a MARIA VALNICE BOLDRIN (Participação Virtual) 
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MAGNO APARECIDO GONÇALVES TRINDADE (Participação Virtual) 
Departamento de Química / Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Dourados

Araraquara, 25 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: César Augusto Marasco Júnior

Nome em citações bibliográficas: MARASCO JUNIOR, C.A.

Nascimento: 06/11/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Catanduva-SP

Filiação: César Augusto Marasco

Márcia Aparecida Catarino Marasco

E-mail: cesaraugustojunior1@gmail.com

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara – Departamento de Química Analítica. Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha, CEP: 14800-060-Araraquara, SP – Brasil.

Formação Acadêmica/Titulação

2020 - 2022 Graduação em Tecnologia Gestão da Qualidade
Universidade Paulista

2018 - 2020 Mestrado em Química
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP–Instituto de Química-Araraquara
Dissertação: Determinação de fármacos como contaminantes em águas residuárias utilizando preparo de amostra on-line e LC-MS/MS e aplicação da técnica MRM-Profiling na avaliação de compostos de relevância ambiental (Exposoma)
Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Coorientadora: Dr.^a Bianca Ferreira da Silva
Bolsista: FAPESP (processo n^o 2018/11700-7)

2014 - 2017 Graduação em Licenciatura em Química
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Catanduva
Monografia: Efeito da estabilização de cargas nas propriedades luminescentes de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) de zinco e alumínio dopados com íons Eu^{3+} e intercalados com ânions orgânicos
Orientador: Prof. Dr. João Henrique Saska Romero
Vínculo: Voluntário

2012 - 2013 Técnico em Química
Escola Técnica Estadual Elias Nechar–Catanduva/São Paulo
Monografia: Composição química das tintas e suas tendências tecnológicas
Orientadora: Prof.^a Ms. Adriana Cossu Vallejo

Formação Complementar

- 2020** Lean Seis Sigma White Belt (Carga horária: 8h)
FM2S Treinamentos – Unicamp/Campinas/SP-Brasil.
- 2020** Gerenciamento de resíduos (Carga horária: 60h)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-Bento Gonçalves/RS-Brasil.
- 2017** Segurança em laboratórios (Carga horária: 12h)
TreinoLab, Brasil.
- 2015** Metodologias analíticas para açúcar e etanol (Carga horária: 16h)
Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Brasil.
- 2015** Boas práticas de laboratório (BPL) (Carga horária: 8h)
AllQuality, Brasil.
- 2014** Operações unitárias e aplicações industriais (Carga horária: 48h)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-Catanduva/SP-Brasil.

Atuação Profissional

- 2014-2018** Analista de Controle de Qualidade-COFCO International-Catanduva (SP),
Brasil.
- 2014-2015** Projeto de extensão (voluntário)
Levantamento e disponibilização de banco de dados com propriedades físicas de reagentes químicos e frases de advertência quanto ao seu manuseio, via aplicativo para dispositivos móveis
Orientador: Prof. Ms. Rafael Lilli Fernandes
- 2016-2017** Iniciação Científica (voluntário)
Efeito da estabilização de cargas nas propriedades luminescentes de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) de zinco e alumínio dopados com íons Eu^{3+} e intercalados com ânions orgânicos
Orientador: Prof. Dr. João Henrique Saska Romero
- 07/2018-12/2018** Estágio docência (carga horária: 60h)
Química analítica quantitativa (experimental) – Engenharia química
Supervisor: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
- 05/2019-10/2019** Estágio de pesquisa - Aston Labs, Purdue University, West Lafayette (Indiana), USA.
MRM-profiling: uma nova ferramenta para detecção de biomarcadores
Orientador: Prof. Dr. R. Graham Cooks
Bolsista: FAPESP (processo n° 2019/03385-7)

Prêmios

2015 Aluno inovador, recebido durante o II Encontro de Inovação e Empreendedorismo do IFSP Campus Catanduva.

Artigos publicados em periódicos

Marasco Junior, C.A.; Luchiari, N.C.; Lima Gomes, P.C.F. Occurrence of caffeine in wastewater and sewage and applied techniques for analysis: a review. *Eclética Química Journal*. 2019;44(4):11-26. DOI: 10.26850/1678-4618eqj.v44.4.11-26.

Luchiari, N.C.; Silva, G.A.; **Marasco Junior, C.A.;** Lima Gomes, P.C.F. Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone. *RSC Advances*. 2019;9:35033-35038. DOI: 10.1039/c9ra06220c.

Participações em congressos

Junho 02-06, 2019 67th American Society for Mass Spectrometry (ASMS), Atlanta, GA-USA. Determination of pharmaceuticals in wastewater using online extraction by LC-MS/MS.

Outubro 04, 2019 Bindley-Waters Omics Symposium, Purdue University, West Lafayette, IN-USA.

Organizações de eventos

Setembro 18-21, 2019 12nd Center for Analytical Instrumentation Development (CAID) Workshop, Purdue University, West Lafayette, IN-USA.

Trabalhos apresentados em congressos (pôster)

Marasco Junior, C.A.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Determination of pharmaceuticals in wastewater using online extraction by LC-MS/MS. In: 67th American Society for Mass Spectrometry (ASMS), 2019, Atlanta, GA-USA.

Fonsêca, M.C.; **Marasco Junior, C.A.;** Dias, D.S.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Removal of caffeine in water using sugarcane bagasse biomass as biochar. In: XVIII MRS Meeting (SBPMat), 2019, Balneário Camboriú, SC-BR.

Freitas, G.; **Marasco Junior, C.A.;** Oliveira, R.C. Relato de experiência envolvendo a prática como componente curricular. In: XVI Evento de Educação em Química (EVEQ), 2018, Araraquara, SP-BR.

Trabalhos apresentados em congressos (oral)

Martins, G.S.; **Marasco Junior, C.A.;** Lamarca, R.S.; Fonsêca, M.C.; Silva, B.F.; Lima Gomes, P.C.F. Caffeine transformation products formed during wastewater treatment using a horizontal flow-anaerobic immobilized biomass bioreactor. In: XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry (LASEAC), 2019, Bento Gonçalves, RS-BR.

Dedico este trabalho a DEUS, por ser autor do meu destino, me guiar durante esta caminhada, sempre me amparar nas horas difíceis, e principalmente, por me dar oportunidade de seguir em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois se tive a oportunidade de seguir em busca dos meus sonhos foi por ELE, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida. Afinal, DEUS é o maior mestre que alguém pode conhecer e que se apresenta, principalmente, quando parece que não há mais saída.

Gostaria de agradecer aos meus pais César e Márcia, pelo incentivo, amor e carinho. Pelos valores transmitidos e pelos exemplos de pais dedicados, resilientes e de pessoas de bem. Agradeço por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nas minhas decisões, me proporcionando aquilo que eles não puderam ter.

Agradeço também aos meus avós paternos e maternos (Cleoci, Euclides, Olavo e Dirce) e aos meus tios Edson e Michele, pela contribuição valiosa durante todo meu crescimento pessoal e profissional. Claro, não poderia deixar de lembrar da minha prima Isabela, quem acompanhei desde o nascimento e que hoje me proporciona muitos momentos de alegria e descontração.

Agradeço à minha namorada Gabriele que sempre esteve ao meu lado durante o meu percurso acadêmico e por se manter firme e resiliente durante meu estágio de pesquisa nos Estados Unidos, apesar de todas as adversidades enfrentadas durante este período.

Sou grato ao meu orientador Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes pela confiança depositada na minha proposta de projeto. Obrigado por me manter motivado durante todo o processo e por me acolher em seu grupo de pesquisa. Agradeço também à minha coorientadora Dr.^a Bianca Ferreira da Silva pelos ensinamentos, incentivo e por indicar a direção correta a seguir para elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Álvaro José dos Santos-Neto do Instituto de Química de São Carlos e ao Douglas M. Sartore, pelos ensinamentos e troca de experiências na operação do sistema on-line de preparo de amostra, e também por ter cedido toda a infraestrutura do laboratório para preparo e empacotamento da coluna RAM, essencial para andamento deste projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Dr. R. Graham Cooks por me receber em seu grupo de pesquisa na Purdue University, ainda que por um curto período, para realização de um estágio de pesquisa em seu laboratório, fornecendo toda estrutura necessária para realização do projeto e compartilhando um pouco de sua vasta experiência em espectrometria de massas. Não poderia deixar de agradecer também a Dr.^a Christina R. Ferreira, por me acompanhar durante meus experimentos, orientar sobre o andamento do projeto e por compartilhar sua experiência em análises de amostras biológicas, em especial em lipidômica.

Estendo meus agradecimentos a Dr. Jackeline F. Marmolejo, pela grande ajuda com meus experimentos e tratamento de dados e também a Madison, Edwin, Zhuoer e demais integrantes do grupo Aston Labs.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros de grupo, em especial ao Mateus, Rafaela e Natália, pelas discussões e ajuda no direcionamento do trabalho, sem falar nos nossos momentos de descontração.

Meus agradecimentos aos meus amigos Josiel, Lilian e Bia, companheiros de trabalho e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida. Em especial, gostaria de agradecer ao João Pedro pelas valiosas discussões e ensinamentos, ao João Ângelo, com quem discutia os melhores jogos para jogar no PlayStation 4, ao João Carlos, por me auxiliar nos momentos de dúvida e, inclusive, me ajudar na coleta de amostras e à minha grande amiga (*big friend*) Kallyni, com quem passei momentos muito bons de descontração, alegria e aprendizado. Muito obrigado a todos por tudo!

Ao Instituto de Química de Araraquara pelo ambiente criativo e amigável que proporciona, e também pelo apoio e infraestrutura necessária para realização e desenvolvimento deste projeto de pesquisa. Ao INCT-DATREM (Processo nº 2014/50945-4) pelo incentivo, pelo apoio financeiro e por proporcionar a utilização dos equipamentos multiusuários necessários para realização deste projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2018/11700-7) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Novamente, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2019/03385-7) pela concessão da bolsa de estágio de pesquisa no exterior – BEPE, no Departamento de Química da Universidade Purdue (West Lafayette, IN-USA) no laboratório de pesquisa Aston Labs coordenado pelo Dr. R. Graham Cooks, e pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Science is a way to satisfy curiosity. And I think that is the best way to be productive.”

(R. Graham Cooks)

“Santo Anjo do Senhor, meu zeloso guardador, se a ti me confiou a piedade divina, sempre me rege, guarda, governa e ilumina. Amém. ”

(Oração ao Anjo da Guarda)

RESUMO

Compostos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) são substâncias amplamente presentes na sociedade moderna. Estes compostos, conhecidos como contaminantes emergentes, são encontrados no ambiente em níveis de concentração que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos e métodos analíticos para determinar compostos psicoativos, antibióticos e marcadores de atividade antropogênica em países em desenvolvimento, como no Brasil, onde as condições de saneamento ainda são precárias, seja pela falta de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e/ou tratamento adequado dos efluentes. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para detecção e quantificação desses compostos a baixos níveis de concentração (i.e., ng L^{-1}). Tendo em vista a complexidade das amostras ambientais, é necessário a aplicação da extração em fase sólida (SPE) e/ou de materiais de acesso restrito (RAM) para pré-concentrar os analitos. Estas abordagens, aliado ao modo on-line de preparo de amostras, constituem uma alternativa para diminuir a contaminação cruzada, além de permitir automatização e realização do procedimento de forma sequencial. Os métodos analíticos desenvolvidos foram validados de acordo com diretivas nacionais e internacionais de validação utilizando apenas 50 μL de volume de injeção em água ultrapura e esgoto lab-made, sendo a primeira abordagem considerada para quantificação em virtude do uso de padrões isotópicos individuais. Figuras de mérito como limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão intra- e inter-dia e efeito matriz foram avaliadas. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificar possível falta de ajuste. Além disso, a fim de verificar a eficiência cromatográfica, resolução (R_s) e assimetria de pico (A_s) foram consideradas; o efeito de memória do sistema também foi avaliado a fim de garantir a confiabilidade da análise e reutilização da coluna de pré-concentração. Com tempos de análise de 24 min (para o cartucho OASIS HLB[®] da Waters) e 16 min (para coluna RAM feita em laboratório), esses métodos mostraram ser alternativas rápidas e viáveis para análise simultânea dos compostos alvo. A linearidade de ambos os métodos mostrou ser adequada, visto que $r^2 > 0,99$ foi obtido para todos os compostos em água ultrapura ou esgoto lab-made (exceto para CBZ em esgoto lab-made no cartucho OASIS e para FLX também em esgoto lab-made na coluna RAM). Os valores de precisão intra- e inter-dia foram inferiores a 10 e 17 %, respectivamente, para o cartucho OASIS e inferiores a 5,8 e 14,1 % para a coluna RAM. Em ambos os métodos, cafeína foi o composto amplamente detectado, atingindo concentração máxima de 715 $\mu\text{g L}^{-1}$ na análise utilizando o cartucho de pré-concentração OASIS e 392 $\mu\text{g L}^{-1}$ na análise utilizando a coluna RAM. Uma estratégia exploratória simples e informativa aplicada à análise de produtos químicos de exposição ambiental em amostras biológicas foi desenvolvida utilizando a técnica MRM-profiling, que apontou e confirmou a presença de quatro compostos alvo dentre os 87 avaliados em amostras de urina humana, sendo eles metformina, acrilamida, acetaminofeno e metoprolol.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial; preparo de amostra on-line; águas residuárias; material de meio de acesso restrito; exposoma; MRM-profiling.

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds and personal care products (PPCPs) are substances widely present in modern society. These compounds, known as emerging contaminants, are found in the environment at concentration levels ranging from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$. Thus, it is necessary to develop studies and analytical methods to determine psychoactive compounds, antibiotics and markers of anthropogenic activity in developing countries, such as Brazil, where sanitation conditions are still precarious, either due to the lack of wastewater treatment plants (WWTPs) and/or suitable effluents treatment. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been the technique of choice for detecting and quantifying these compounds at background concentrations (i.e., ng L^{-1}). Due to the complexity of the environmental samples, it is necessary to apply solid phase extraction (SPE) and/or restricted access media (RAM) to pre-concentrate the analytes. These approaches combined with the online method of sample preparation are an alternative to decrease cross-contamination, in addition to allowing automation and carrying out the procedure sequentially. The analytical methods developed were validated according to national and international validation guidelines using only 50 μL of injection volume in ultrapure water and lab-made sewage, being the first approach being considered for quantification due to the use of individual isotopic labeled standards. Figures of merit such as limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, intra- and inter-day precision and matrix effect were evaluated. Analysis of variance (ANOVA) was applied to verify possible lack of fit. In addition, in order to verify the chromatographic efficiency, resolution (R_s) and peak asymmetry (A_s) were considered; carryover was also evaluated in order to ensure analysis reliability and reuse preconcentration column reusability. With analysis times of 24 min (for Waters' OASIS HLB® cartridge) and 16 min (for RAM column), the methods proved to be fast and viable alternatives for simultaneous analysis of the target compounds. The methods' linearity proved to be suitable, since $r^2 > 0,99$ was obtained for all compounds in ultrapure water and lab-made sewage (except for CBZ in lab-made sewage on OASIS cartridge and for FLX also in lab-made sewage on RAM column). The intra- and inter-day precision values were less than 10 and 17 %, respectively, for the OASIS cartridge and less than 5,8 and 14,1 % for the RAM column. In both methods, caffeine was the compound widely detected, reaching a maximum concentration of $715 \mu\text{g L}^{-1}$ in the analysis using the OASIS pre-concentration cartridge and $392 \mu\text{g L}^{-1}$ in the analysis using the RAM column. A simple and informative exploratory strategy applied to the analysis of environmental exposure chemicals in biological samples was developed using the MRM-profiling mass spectrometry, which suggested and confirmed the presence of four target compounds among the 87 evaluated in human urine samples, being them metformin, acrylamide, acetaminophen and metoprolol.

Keywords: emerging contaminants, liquid chromatography tandem mass spectrometry, online sample preparation, wastewaters, restricted access media material, exposome, MRM-profiling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fluxograma de rota de entrada de fármacos no ambiente.	26
Figura 1.2 - Levantamento bibliográfico para trabalhos brasileiros que continham os termos “emerging contaminants and wastewater” no título, abstract e/ou palavras-chave no período de 2010-2020 na plataforma Scopus.	31
Figura 1.3 - Etapas analíticas de preparo de amostra utilizando extração em fase sólida: 1) condicionamento; 2) carregamento da amostra; 3) limpeza (clean-up); 4) eluição.	52
Figura 1.4 - Sistema de comutação de colunas no modo backflush (eluição ocorre em sentido reverso ao de pré-concentração).	54
Figura 2.1 - Pontos de amostragem de Araraquara-SP (A), Bueno de Andrada-SP (B) e São Carlos-SP (C).	77
Figura 2.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 150 µg L ⁻¹ : CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.	79
Figura 2.3 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.	85
Figura 2.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).	87
Figura 2.5 - Variação da concentração (µg L ⁻¹) por mês dos fármacos analisados nas amostras de afluentes das ETEs A e B.	91
Figura 2.6 - Gráfico comparativo de concentração total dos analitos alvo do estudo, em µg L ⁻¹ , nos meses de outubro a janeiro, para as amostras de afluente e efluente das ETEs A e B. ...	93
Figura 3.1 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de solução padrão 200 µg L ⁻¹ : CAF (195>138), NOR (320>276), CIP (332>288), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148) com os respectivos tempos de retenção dos analitos.	112
Figura 3.2 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) de amostra de água residuária: CAF (195>138), VEN (278>58), CBZ (237>194), and FLX (310>148).	119
Figura 4.1 - Visão geral do arranjo experimental realizado para as amostras de urina humana (310 MRMs selecionados para analisar 12 amostras de urina humana).	135
Figura 4.2 - Programação de eluição de gradiente baseada no eluente B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico), com vazão de 0,6 mL min ⁻¹ , utilizada na separação cromatográfica de metformina, metoprolol, acetaminofeno, acrilamida e paraxantina.	139
Figura 4.3 - Cromatograma de íons totais (TIC) de solução padrão 300 µg L ⁻¹ : METF (130>71); ACRL (72>55); PRXT (181>124); ACTM (152>110) e METP (268>116).	142
Figura 4.4 - Cromatograma de íons extraídos (XIC) dos compostos detectados nas amostras de urina humana: METF (130>71); ACRL (72>55); ACTM (152>110) e METP (268>116). ...	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Propriedades dos analitos em estudo.....	36
Tabela 1.2 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos anteriormente publicados.....	39
Tabela 1.3 - Ocorrência de fármacos em águas residuárias em estudos nacionais anteriormente publicados.....	42
Tabela 1.4 - Correlação das características dos sistemas de SPE on-line e off-line.....	53
Tabela 2.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.	72
Tabela 2.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.	73
Tabela 2.3 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 2.	74
Tabela 2.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.	83
Tabela 2.5 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.....	84
Tabela 2.6 - Valores de pH e condutividade obtidos das amostras analisadas.....	86
Tabela 2.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.....	88
Tabela 2.8 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).	89
Tabela 2.9 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.	90
Tabela 3.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção do método SRM.	107
Tabela 3.2 - Programação de eluição gradiente utilizada na bomba 1.	109
Tabela 3.3 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em água ultrapura.	116
Tabela 3.4 - Valores de linearidade, precisão intra-dia e inter-dia e pesos empíricos obtidos na validação do método em esgoto lab-made.....	117
Tabela 3.5 - Efeito matriz observado para cada composto alvo em amostras de esgoto lab-made.	118
Tabela 3.6 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) e relação sinal/ruído (S/N), entre parênteses, obtidas através da análise de afluente e efluente das ETEs A e B.....	120
Tabela 3.7 - Concentrações de compostos farmacêuticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtidas através da análise de esgoto doméstico (São Carlos, SP, Brasil) e efluente hospitalar (HCRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).	121
Tabela 3.8 - Ocorrência dos compostos alvo em amostras de águas residuárias.	123
Tabela 3.9 - Comparação entre os métodos desenvolvidos em água ultrapura para a FLX..	124
Tabela 4.1 - Lista de compostos com íons precursores e produtos, bem como os parâmetros para detecção de MS e tempo de retenção (RT) usados para o método SRM.....	138
Tabela 4.2 – Fold change, mudança observada entre a medida original (branco) e a medida real (amostra), para os compostos METF, METP, ACTM, PRXT e ACRL, possivelmente, presentes nas amostras de urina humana.	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GAO: Government Accountability Office

ETEs: estações de tratamento de esgoto

PCBs: bifenilas policloradas

ONU: Organização das Nações Unidas

UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância

ANA: Agência Nacional de Águas

SNIS: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

EUA/US: Estados Unidos

EU: União Europeia

EPA: Environmental Protection Agency

CWA: Clean Water Act

SDWA: Safe Drinking Water Act

PPCPs: fármacos e produtos de cuidado pessoal

FQPA: Food Quality Protection Act

CCL: Contaminant Candidate List

UCMR: Unregulated Contaminant Monitoring Rule

EDSP: Endocrine Disruptor Screening Program

EEA: European Environment Agency

EU WFD: European Water Framework Directive

REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

NORMAN: Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

ABES: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental

K_{ow} : coeficiente de partição octanol/água

CAF: cafeína

CBZ: carbamazepina

CIP: ciprofloxacina

NOR: norfloxacina

PAHO: Pan American Health Organization

WHO: World Health Organization

FLX: fluoxetina

VEN: venlafaxina

ToxCast: Toxicity Forecaster

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

RAFA: reator anaeróbio de fluxo ascendente

UASB: upflow anaerobic sludge blanket

MBR: biorreator de membrana

HAIB: anaeróbio horizontal de leito fixo

AOPs: processos oxidativos avançados

UV: ultravioleta

Q: quadrupolo com armadilha de íons linear

QTrap: quadrupolo com armadilha de íons linear

QToF: quadrupolo com tempo de voo

LIT: ion trap linear

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

SPE: extração em fase sólida

LLE: extração líquido-líquido

PVP-DVB: polivinilpirrolidona-divinilbenzeno

SPDE: extração dinâmica em fase sólida

MEPS: microextração por sorvente empacotado

SBSE: extração sortiva por barra de agitação

MSPD: dispersão da matriz em fase sólida

SPME: microextração em fase sólida

RAM: materiais de acesso restrito

BSA: albumina do soro bovino/ albumina sérica bovina

CAF-¹³C₃: cafeína-trimetil-¹³C₃

CBZ-D₁₀: carbamazepina-D₁₀

CIP-D₈: ciprofloxacina-D₈

FLX-D₆: fluoxetina-D₆

NOR-D₅: norfloxacina-D₅

VEN-D₆: venlafaxina-D₆

MeOH: metanol

ACN: acetonitrila

LC/HPLC: cromatografia líquida de alta performance
ESI: electrospray
FIA: análise por injeção em fluxo
CUR: gás de cortina
CAD: gás de colisão
TEM: temperatura da fonte
IS: voltagem do íon spray
GS1: gás de nebulização
GS2: gás secante
DP: potencial de decaimento
CE: energia de colisão
EP: potencial de entrada
CEP: potencial de entrada da célula de colisão
CXP: potencial de saída de célula de colisão
ESI+: ionização positiva
SRM: monitoramento de reação selecionado
Q1: primeiro quadrupolo
Q3: terceiro quadrupolo
m/z: relação massa/carga
TCC: compartimento de coluna termostaticado
As: assimetria
Rs: resolução
Q: transição para quantificação
q: transição para confirmação
LD: limite de detecção
LQ: limite de quantificação
WLSLR: regressão linear de mínimos quadrados ponderados
ANOVA: análise de variância
RSD: desvio padrão relativo
S/N: relação sinal/ruído
EM: efeito da matriz
DQO: demanda química de oxigênio
HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

XIC: cromatograma de íons extraídos

Tf: fator de cauda

QC: controle de qualidade

TSCA: Toxic Substances Control Act

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

MS: espectrometria de massas

CE: energia de colisão

METF: metformina

METP: metoprolol

ACTM: acetaminofeno

ACRL: acrilamida

PRXT: paraxantina

TIC: cromatograma de íons totais

HRMS: espectrometria de massas de alta resolução

ID: identificação

Prec: varreduras de íon precursor

NL: varreduras de perda neutra

MRM: monitoramento de reação múltipla

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	21
INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS GERAIS	24
Capítulo 1	25
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E ASPECTOS RELACIONADOS AO TEMA	26
1.1 Contaminantes emergentes e legislação	26
1.2 Fármacos como contaminantes emergentes e a ocorrência em águas residuárias	33
1.3 Efeitos ecotoxicológicos relacionados à presença dos contaminantes emergentes no ambiente	44
1.4 Breve discussão acerca das tecnologias de remoção	46
1.5 Do preparo de amostra a técnicas aplicadas para análise de contaminantes emergentes	49
REFERÊNCIAS	56
Capítulo 2	67
2 MÉTODO AUTOMATIZADO PARA DETERMINAR COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE ACOPLADA A LC-MS/MS	68
2.1 INTRODUÇÃO	68
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.3.1 Reagentes.....	70
2.3.2 Método on-line SPE-LC-MS/MS	71
2.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS.....	71
2.3.2.2 Cromatografia líquida.....	72
2.3.3 Validação do método	75
2.3.4 Coleta e preparo de amostra	77

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
2.4.1 On-line SPE-LC-MS/MS.....	78
2.4.2 Validação do método	81
2.4.3 Aplicação em amostras de águas residuárias.....	86
2.4.3.1 Determinação de fármacos em amostras de ETEs.....	86
2.4.3.2 Variação dos compostos alvo em diferentes meses.....	91
2.5 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
Capítulo 3	103
3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ON-LINE DE BAIXO CUSTO ACOPLADA A LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS EM AMOSTRAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS (AFLUENTES E EFLUENTES)	104
3.1 INTRODUÇÃO	104
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	105
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	105
3.3.1 Reagentes.....	105
3.3.2 Método on-line RAM-LC-MS/MS.....	106
3.3.2.1 Parâmetros instrumentais MS/MS	106
3.3.2.2 Preparo de coluna RAM	108
3.3.2.3 Cromatografia líquida.....	108
3.3.3 Validação do método	110
3.3.4 Amostragem e preparo de amostra	111
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.4.1 SPE on-line RAM-LC-MS/MS	112
3.4.2 Validação do método	114
3.4.3 Aplicação nas amostras	118
3.5 CONCLUSÃO	125

REFERÊNCIAS	126
Capítulo 4	132
4 UMA ABORDAGEM RÁPIDA E ALTERNATIVA PARA DETECTAR COMPOSTOS DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL UTILIZANDO MRM-PROFILING PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	133
4.1 INTRODUÇÃO	133
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	134
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	134
4.3.1 Preparo de amostra	134
4.3.2 Fundamentação da técnica MRM-profiling para análise de exposoma.....	134
4.3.3 Análise e tratamento de dados	137
4.3.4 Validação de método por LC-MS/MS.....	137
4.3.4.1 Reagentes.....	137
4.3.4.2 Condições espectrometria de massas.....	137
4.3.4.3 Análises por cromatografia líquida.....	138
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
4.4.1 MRM-profiling aplicado nas amostras de urina humana	139
4.4.1.1 Etapa de identificação nas amostras de urina	141
4.4.2 Validação analítica por LC-MS/MS	141
4.5 CONCLUSÃO	144
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICE A – Lista de compostos selecionados para o estudo de exposoma	149
APÊNDICE B – Varreduras de íons produto	156
Capítulo 5	159
5.1. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	160

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação apresenta o desenvolvimento e validação de método cromatográfico acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) utilizando automatização na etapa de preparo de amostra para determinação de cafeína, carbamazepina, ciprofloxacina, norfloxacina, venlafaxina e fluoxetina em águas residuárias (afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto, efluente doméstico e hospitalar), visando contribuir para os estudos de determinação de contaminantes emergentes em matrizes aquáticas no país. Para melhor compreensão, este estudo foi dividido em seis capítulos.

O capítulo 1 apresenta um panorama da literatura científica e o estado da arte dos contaminantes emergentes no mundo e no Brasil, abordando ocorrência e aspectos regulatórios, efeitos ecotoxicológicos, tecnologias de remoção e uma explanação sobre preparo de amostra a técnicas aplicadas para análise de contaminantes emergentes.

O capítulo 2 descreve o desenvolvimento e validação do método, e posterior quantificação dos analitos nas amostras de águas residuárias, utilizando na etapa de preparo de amostra o cartucho OASIS HLB[®] da Waters. De maneira similar, o capítulo 3 descreve as mesmas etapas, no entanto a discussão deu-se com a utilização de uma coluna de pré-concentração de material de acesso restrito (RAM) feita em laboratório.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos de um estágio no exterior financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP BEPE n° 2019/03385-7) que trata de um estudo da utilização da técnica MRM-profiling aplicada na análise de compostos de exposição ambiental em amostras biológicas, estando inserido no campo de exposoma, cuja estratégia exploratória simples e informativa pode ser facilmente aplicada à análise exploratória de produtos químicos ambientais existentes e novos oferecendo um screening rápido da amostra.

Por fim, o capítulo 5 apresenta uma conclusão geral sobre os estudos apresentados e descritos nos capítulos anteriores e as perspectivas quanto a utilização e aplicação futura dos mesmos.

INTRODUÇÃO

A presença de fármacos de diversas classes terapêuticas no ambiente tem gerado imensa preocupação na comunidade científica. Trata-se de compostos desenvolvidos para que em baixas concentrações possam ter efeitos terapêuticos eficazes tanto na medicina como animal. Entretanto, apesar de serem eficientes no tratamento, os fármacos não são totalmente absorvidos pelo organismo, sendo excretados na forma de metabólitos ou na sua forma administrada, ou até mesmo, descartados incorretamente após o vencimento.

São encontrados no ambiente em níveis de concentração que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ em afluentes/efluentes de estações de tratamento de efluente (ETEs), esgotos não tratados ou em outros corpos d'água. Conhecidos como contaminantes emergentes, estes compostos podem representar risco a saúde humana e ao ambiente, visto que não há nenhuma legislação estabelecida que regulamente o descarte e controle destes compostos, e também devido ao fato de que as atuais ETEs não foram projetadas para tratar e/ou remover completamente compostos nestes níveis de concentração ^{1,2}.

Diante do intenso consumo de medicamentos devido ao aumento populacional e da presença destes compostos no ambiente, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos e métodos analíticos para determinar compostos psicoativos, antibióticos e marcadores de atividade antropogênica em países em desenvolvimento, como no Brasil, onde as condições de saneamento ainda são precárias, seja pela falta de ETEs e/ou tratamento adequado dos efluentes.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) tem sido a técnica de escolha para separação, detecção e quantificação desses compostos, visto que é uma técnica com elevada sensibilidade e seletividade que permite atingir os níveis de concentração exigidos para determinação destes contaminantes ³.

Tendo em vista a complexidade das amostras ambientais, é necessário a aplicação da extração em fase sólida (SPE) e/ou de meios de acesso restrito (RAM) para pré-concentrar os analitos. Estas abordagens aliado ao modo on-line de preparo de amostras constituem uma alternativa para diminuir a contaminação cruzada, além de permitir automatização e realização do procedimento de forma sequencial ⁴. Por exemplo, ao nosso relativo conhecimento, podemos considerar que esta é a primeira vez que um método automatizado com injeção direta de amostras de águas residuárias foi descrito para a determinação simultânea dos seis fármacos cafeína, ciprofloxacina, norfloxacina, carbamazepina, venlafaxina e fluoxetina usando sorvente RAM no modo on-line de preparo de amostras para análises de águas residuárias no Brasil.

(1) MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

(2) CHINNAIYAN, P. et al. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 190, n. 5, p. 288, 2018.

(3) GUSMAROLI, L.; INSA, S.; PETROVIC, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, n. 17, p. 4165-4176, 2018.

(4) BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

Outra estratégia utilizada, sabendo da presença destes contaminantes no ambiente, se deu na tentativa de tentar identificá-los previamente em amostras biológicas. Para isso, uma estratégia exploratória simples e informativa aplicada à análise de produtos químicos de exposição ambiental em amostras biológicas foi desenvolvida utilizando o MRM-profiling (Multiple Reaction Monitoring-profiling), que apontou e confirmou a presença de quatro compostos alvo dentre os 87 avaliados (ainda que os compostos anteriores estivessem inseridos na investigação) em amostras de urina humana, sendo eles metformina, acrilamida, acetaminofeno e metoprolol.

Capítulo 5

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A revisão da literatura apresentada no primeiro capítulo demonstrou a crescente preocupação dos pesquisadores ao redor do mundo com a problemática dos contaminantes emergentes, desde a ocorrência aos efeitos ecotoxicológicos que podem causar. Em vista disso, a necessidade de desenvolvimento de métodos cada vez mais rápidos tem se apresentado como um dos principais focos de pesquisa abordando esta temática.

Apesar da crescente preocupação acerca do tema, em muitos países, principalmente naqueles em desenvolvimento, como o Brasil, a velocidade dos estudos ainda tem se mostrado incipiente e deixado evidente a necessidade de realização de pesquisas como a presente.

Os métodos desenvolvidos com o procedimento automatizado de preparo de amostras por meio da técnica de column switching e acoplamento ao sistema LC-MS/MS permitiram um grande progresso na análise de amostras aquosas ambientais, especialmente para contaminantes emergentes, provando ser preciso, com reduzido tempo de análise, menor consumo de solvente, reduzida geração de resíduo químico comparado ao tradicional preparo de amostra usando SPE off-line e, principalmente, sem perda de resposta analítica.

Ainda que tenham sido realizados em sistemas cromatográficos distintos, mas com mesmo detector, o tempo total de execução do método utilizando o cartucho de pré-concentração OASIS HLB foi de 24 minutos, atingindo alto rendimento, incluindo preparo de amostra e separação cromatográfica.

Comparando esta primeira abordagem ao da coluna RAM feita em laboratório, cujo tempo total de execução foi de 16 minutos, percebemos que o método atingiu alto rendimento assim como o anterior, em um tempo de análise ainda menor incluindo preparo de amostra e análise cromatográfica. Além disso, mostrou-se de baixo custo, com custo estimado cinco ou seis vezes menor do que as fases vendidas comercialmente.

Em termos de validação, ambas as abordagens se mostraram satisfatórias, apresentando figuras de mérito em consonância com diretivas nacionais e internacionais de validação. Em relação à eficiência analítica, percebemos também resultados semelhantes e em acordo com as regras que regem o desenvolvimento de métodos cromatográficos.

Entretanto, percebemos que apesar do custo relativamente elevado e de um tempo análise em torno de oito minutos mais longo, o método desenvolvido utilizando a fase comercial OASIS HLB mostrou ser mais versátil e eficaz que a coluna RAM, o que fica evidenciado pela detecção de analitos a níveis de concentração mais baixo, vide os limites de quantificação atingidos serem superiores aos atingidos pela coluna feita em laboratório, o que por sua vez,

influenciou diretamente, nos resultados obtidos na quantificação das amostras. Ou seja, a fase comercial OASIS HLB atingiu limites de quantificação ainda menores que os alcançados pela coluna RAM e nos permitiu a quantificação de analitos que não tinham sido apontados pela coluna RAM em algumas amostras. Gostaríamos de ressaltar que este método, conforme apontado nos objetivos do trabalho, também foi aplicado na avaliação de remoção dos fármacos ciprofloxacina, norfloxacina, cafeína e carbamazepina, auxiliando um integrante do grupo de pesquisa em seus ensaios de adsorção na avaliação do biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar como matriz adsorvente.

Ambos os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de águas residuárias e se mostraram adequados, confiáveis e sensíveis, podendo ser utilizados para análises de rotina de vários contaminantes orgânicos em baixas concentrações em amostras de águas residuárias ambientais.

Com relação ao conteúdo apresentado utilizando MRM-profiling aplicada a análise de exposoma, é possível destacar a intenção de criar um método não supervisionado e exploratório de possíveis candidatos à exposição ambiental capaz de fornecer um perfil de possíveis compostos passíveis de serem encontrados em determinada amostra biológica. Dessa forma, essa ferramenta irá orientar os analistas para quais compostos possivelmente podem ser encontrados na amostra, e assim, otimizar as análises de interesse clínico, como modelos de progressão da doença, estudos epidemiológicos, avaliação da eficácia do tratamento e se o medicamento atingiu os níveis e locais desejados, além de contribuir para o desenvolvimento do campo de exposoma.

A simplicidade do tratamento dos dados e o método também podem ser usados para orientar a seleção de moléculas a serem posteriormente estudadas por LC-MS/MS ou mesmo por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Este estudo é apenas o primeiro passo em um amplo campo que necessita de mais informações e os próximos passos, possam ser tentar quantificar alguns desses compostos nas amostras ou mesmo identificar e quantificar seus metabólitos.
