UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PATRÍCIA ALEXANDRE EVANGELISTA

Ocorrência e ecotoxicidade de antidepressivos residuais em amostras do Rio Piracicaba (SP)

Piracicaba

2021

PATRÍCIA ALEXANDRE EVANGELISTA

Ocorrência e ecotoxicidade de antidepressivos residuais em amostras do Rio Piracicaba (SP)

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Evangelista, Patrícia Alexandre

Ocorrência e ecotoxicidade de antidepressivos residuais em amostras do Rio Piracicaba (SP) / Patrícia Alexandre Evangelista; Valdemar Luiz Tornisielo. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.
117 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Água contaminada – Rio Piracicaba 2. Antidepressivos 3. Contaminação ambiental 4. Contaminação da água 5. Ecotoxicologia 6. Fármacos 7. HPLC-MS/MS 8. Resíduos tóxicos 9. Toxicologia ambiental I. Título.

CDU 574.64 : 628.4.045

Elaborada por:
Marilia Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631
Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Antônio e Maria, obrigada por serem
parte da minha história e por terem
tanto para me ensinar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele eu não teria forças para essa jornada.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, pela orientação, dedicação e paciência.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por colocar à disposição o Laboratório de Ecotoxicologia para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (Processo nº 133797/2019-8).

Aos técnicos do laboratório Rodrigo Pimpinato e Carlos Doreli pela ajuda com os experimentos e amizade.

Ao Franz Vilca pelo apoio com o LC-MS/MS

Aos meus pais, minha tia Josefa, meu companheiro Fernando, meus filhos e a todos que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

RESUMO

EVANGELISTA, P.A. **Ocorrência e ecotoxicidade de antidepressivos residuais em amostras do Rio Piracicaba (SP).** 2021. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

A depressão é um grande problema global, que foi agravada com a recente pandemia de COVID 19, o consumo de antidepressivos por parte da população aumentou e consequentemente sua detecção no ambiente. Os antidepressivos são fármacos considerados contaminantes ambientais e podem provocar mudanças comportamentais que afetam a dinâmica das populações mesmo em baixas concentrações. A ecotoxicologia é um ramo da toxicologia que se preocupa com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais e sintéticos, aos constituintes dos ecossistemas. *Daphnia magna* é um microcrustáceo amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos agudo e crônico. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de antidepressivos residuais como a fluoxetina (FLU), citalopram (CIT), venlafaxina (VEN) e sertralina (SER) em quatro pontos Rio Piracicaba, SP e realizar teste de toxicidade aguda e crônica em *Daphnia magna*. Para as análises foi utilizada a metodologia de extração em fase sólida (SPE) e um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (HPLC MS/MS). Os parâmetros utilizados para validação seguiram as recomendações da Anvisa. Os ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos com *Daphnia magna* seguiram as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas e *Organisation for Economic Co-operation and Development*. Com a realização do teste agudo, determinou-se a CE_{50} de cada substância, e foi possível realizar uma classificação quanto a toxicidade. Calculou-se o quociente de risco agudo para cada substância. Um teste agudo e crônico foi realizado com a maior concentração ambiental determinada, utilizando as substâncias individuais e suas misturas. No teste crônico foram avaliadas a reprodução, sobrevivência, tamanho dorsal e ventral. O método cromatográfico mostrou-se exato e preciso. Todos os antidepressivos estudados foram detectados nas amostras coletadas, na faixa de concentração de 1,0 a 4,48 ng L^{-1}. A classificação efetuada mostrou que a FLU e o CIT são moderadamente tóxicos, a VEN pouco tóxica e a SER foi considerada muito tóxica. O quociente de risco para

os antidepressivos estudados não apresentam risco ambiental agudo para *Daphnia magna.* Os testes agudos com a mistura dos antidepressivos nas concentrações ambientais não apresentaram organismos mortos ou imóveis. Os testes crônicos demonstraram efeitos na reprodução e tamanho dorsal da *Daphnia magna*, tanto os realizados com a substância individual quanto suas misturas. O tamanho ventral organismo não foi afetado pela exposição individual das substâncias, porém a mistura dos fármacos CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER propiciou os efeitos que mais se afastaram do controle. A variável sobrevivência não atingiu as pressuposições para avaliação estatística. Contudo, espera-se que esta pesquisa possa contribuir com o despertar do interesse das autoridades ambientais, para que haja um aprofundamento nos estudos ecotoxicológicos e melhor caracterização dos riscos associados à introdução contínua dessas substâncias no ambiente.

Palavras-chave: Contaminação ambiental. Água superficial. Antidepressivos. HPLC-MS/MS. *Daphnia magna*.

ABSTRACT

EVANGELISTA, P.A. **Occurrence and ecotoxicity of residual antidepressants in samples from Piracicaba River (SP)**. 2021. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Depression is a major global problem which was aggravated by the recent pandemic of COVID 19. The consumption of antidepressants by the population increased and, therefore, its detection in the environment. Antidepressants are drugs considered to be environmental contaminants and can cause behavioral changes that affect population dynamics even at low concentrations. Ecotoxicology is a branch of toxicology that is concerned with the study of toxic effects, caused by natural and synthetic pollutants, to the constituents of ecosystems. *Daphnia magna* is a microcrustacean widely used in acute and chronic ecotoxicological tests. The objective of this study was to evaluate the occurrence of residual antidepressants such as fluoxetine (FLU), citalopram (CIT), venlafaxine (VEN) and sertraline (SER) in four different spots of the Piracicaba River, in order to perform an acute and chronic toxicity test on *Daphnia magna*. The samples were analyzed through solid phase extraction methodology (SPE) and a liquid chromatograph coupled to a mass spectrometer with electrospray ionization source (HPLC MS / MS). The parameters used for validation followed Anvisa's recommendations. The acute and chronic ecotoxicological tests with *Daphnia magna* followed the recommendations of the Brazilian Association of Technical Standards and Organization for Economic Co-operation and Development. The performance of the acute test allows to determine the EC50 of each substance and it was possible to carry out a classification by toxicity. We also calculated the acute risk quotient for each substance. And performed an acute and chronic test with the highest environmental concentration determined, using the individual substances and their mixtures. Reproduction, survival, dorsal and ventral size were evaluated in the chronic test. The chromatographic method proved to be accurate and precise. All antidepressants studied were detected in the collected samples, in the concentration range of 1.0 to 4.48 ng L-1. The proposed classification showed FLU and CIT as “moderately toxic”, VEN as “not very toxic” and SER as “very toxic”. The risk quotient for the studied antidepressants does not present an acute environmental risk for

Daphnia magna. Acute tests with the mixture of antidepressants at environmental concentrations did not show dead or immobile organisms. The chronic tests demonstrated effects on the reproduction and dorsal size of *Daphnia magna*, both performed with the individual substance and its mixtures. The ventral organism size was not affected by the individual exposure to the substances; however, the mixture of the drugs CIT.FLU.SER and VEN.CIT.FLU.SER propitiated the effects that most moved away from the control. The survival variable did not reach the assumptions for statistical evaluation. However, we hope that this research can contribute to the awakening of environmental authorities' interest, so that there is a deepening in ecotoxicological studies and a better characterization of the risks associated with the continuous increase of these substances in the environment.

Keywords: Environmental contamination. Surface water. Antidepressants. HPLC-MS/MS. *Daphnia magna.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Vias de chegada dos antidepressivos no corpo d'água.....25

Figura 3.2 A) *Daphnia magna* reprodução assexual, B) *Daphnia magna* com efípio .. 36

Figura 4.1 Localização dos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4 na cidade de Piracicaba, SP 58

Figura 4.2 Curva de calibração entre matriz (água) e solvente para a VEN, CIT, FLU, SER 67

Figura 4.3 Cromatogramas dos antidepressivos A) Sem analito (branco); B) VEN min 4,505; C) CIT min 5,133; D) FLU min 5,346; E) SER min 5,372 na concentração de 50 ng mL^{-1} 68

Figura 4.4 Recuperações (%) obtidas para VEN, CIT, FLU, SER nos níveis de fortificação 1, 5, 50 ng mL^{-1} 72

Figura 4.5 Vazões no Rio Piracicaba no mês de setembro de 2020..... 75

Figura 5.1 Relação da concentração de $K_2Cr_2O_7$ ao longo de 20 ensaios. Em azul o valor da média dos resultados dos ensaios de sensibilidade e em vermelho o valor da média o desvio-padrão mais duas vezes o valor médio 99

Figura 5.2 Porcentagem de efeito observado em função da concentração de exposição 101

Figura 5.3 Quociente de risco de quatro antidepressivos determinado a partir das concentrações detectadas no Rio Piracicaba, SP para *D. magna* 103

Figura 5.4 Reprodução da *Daphnia magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER 104

Figura 5.5 Medição do tamanho A) dorsal e B) ventral da D. magna no 21º dia utilizando o *software* Fiji 106

Figura 5.6 Tamanho dorsal da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER 106

Figura 5.7 Tamanho ventral da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Características dos antidepressivos estudados 27

Tabela 4.1 Locais dos pontos de coletas e suas respectivas coordenadas geográficas 59

Tabela 4.2 Parâmetros do íon precursor, energia de fragmentação, íon produzido e a energia de colisão de antidepressivos 64

Tabela 4.3 Características de calibração do efeito matriz 65

Tabela 4.4 Análise da linearidade da validação do método analíticos para antidepressivos 69

Tabela 4.5 Valores de limites de detecção e quantificação, precisão intermediária e repetitividade, teste de filtração da validação do método analíticos para antidepressivos 70

Tabela 4.6 Recuperação (%) e DPR (%) obtidos para os antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER nos níveis de concentração 1, 5 e 50 ng mL^{-1} para LC-MS-MS 71

Tabela 4.7 Valores de recuperação e DPR para variações na temperatura da coluna e fluxo da fase móvel em ±10%..... 73

Tabela 4.8 Concentrações médias de antidepressivos encontradas no Rio Piracicaba, SP durante 7 dias consecutivos 76

Tabela 5.1 Soluções estoque para preparo do meio M4 93

Tabela 5.2 Soluções estoque de preparo do meio de cultivo para *P. subcapitata* 95

Tabela 5.3 Classificação qualitativa de toxicidade para invertebrados aquáticos 97

Tabela 5.4 Estimativa da concentração que afeta 50% da população de animais expostos (CE_{50}) nos fármacos VEN, CIT, FLU e SER e os respectivos desvios-padrão e intervalo de confiança superior e inferior usando o método delta 100

Tabela 5.5 Análise descritiva da reprodução da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER 104

Tabela 5.6 Análise descritiva do tamanho dorsal da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER 106

Tabela 5.7 Análise descritiva da variável tamanho ventral 107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 17
2. OBJETIVOS 18
2.1 Objetivo geral 18
2.2. Objetivos Específicos 18
3 REVISÃO DE LITERATURA 19
3.1. Fármacos no ambiente 19
3.2. Antidepressivos no ambiente 24
3.3. Técnicas analíticas empregadas para análise de fármacos no ambiente 29
3.4. Implicações ecotoxicológicas de antidepressivos no ambiente aquático 32
3.5. Conclusões 40
Referências 40
4. OCORRÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS RESIDUAIS EM AMOSTRAS DO RIO PIRACICABA (SP) 53
Resumo 53
Abstract 54
4.1. Introdução 55
4.2. Materiais e Métodos 57
4.2.1. Área de estudo 57
4.2.2. Coleta de amostras 59
4.2.3. Reagentes e materiais 59
4.2.4. Protocolo de extração 60
4.2.5. Condições cromatográficas 60
4.2.6. Condições das análises no espectrômetro de massas 61
4.2.7. Efeito matriz 61
4.2.8. Validação 62
4.3. Resultados e Discussão 64
4.3.1. Condições das análises no espectrômetro de massas 64
4.3.2. Efeito matriz 64
4.3.3. Validação 67
4.4. Análise de antidepressivos em amostras do Rio Piracicaba, SP 74
4.5. Conclusões 80
Referências 80

5 ANÁLISE DA TOXICIDADE DE ANTIDEPRESSIVOS EM *Daphnia magna* 87
Resumo 87
Abstract 88
5.1. Introdução 89
5.2. Materiais e Métodos 91
5.2.1. Materiais 91
5.2.2. Manutenção e cultivo 91
5.2.3. Teste de sensibilidade em Daphnia magna 96
5.2.4. Teste de toxicidade aguda em Daphnia magna 96
5.2.4.1 Avaliação de risco ambiental agudo 97
5.2.5. Teste de toxicidade crônica em Daphnia magna 98
5.3. Resultados e Discussão 99
5.3.1. Teste de sensibilidade em Daphnia magna 99
5.3.2. Teste de toxicidade aguda em Daphnia magna 100
5.3.2.1. Avaliação de risco ambiental agudo 102
5.3.3. Teste de toxicidade crônica em Daphnia magna 103
5.4. Conclusões 110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 116

1. INTRODUÇÃO GERAL

A água é uma bem insubstituível empregada em diversas atividades, sejam estas urbanas ou rurais. O crescimento populacional, aliado ao rápido avanço das atividades urbanas e industriais, bem como a falta de implementação de uma gestão ambiental adequada contribuiu para altos níveis de poluição ambiental, como a contaminação das águas dos rios (GUPTA; GUPTA, 2021).

Muitas substâncias são descarregadas diariamente no ambiente aquático por meio das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), que são ineficientes na completa remoção de alguns contaminantes. Entre os contaminantes existentes estão os antidepressivos (CASTILLO-ZACARÍAS et al., 2021).

A depressão é um grande problema global, que foi agravada com a recente pandemia de COVID 19. O crescimento do consumo dessas substâncias está intrinsecamente ligado à sua detecção ambiental (REINSTADLER et al., 2021).

Os antidepressivos têm recebido grande atenção da comunidade científica, foram detectados em diversos compartimentos ambientais em muitos países e apresentam riscos para a vida dos organismos aquáticos mesmo em baixas concentrações (MELCHOR-MARTÍNEZ et al., 2021).

Contudo é importante conhecer as concentrações ambientais de fármacos no ambiente, além de estimar os possíveis efeitos biológicos adversos em organismos. Dessa forma, faz-se necessário além de um monitoramento destas substâncias a realização de testes ecotoxicológicos buscando-se entender como os fármacos podem interferir no metabolismo dos organismos expostos direta e indiretamente.

Com base nas informações supracitadas duas hipóteses foram elaboradas:

1) O Rio Piracicaba, SP está contaminado com os antidepressivos: fluoxetina, sertralina, venlafaxina e citalopram.

2) Concentrações ambientais dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, venlafaxina e citalopram causam efeitos agudos e crônicos em *Daphnia magna*.

A partir de tais pressupostos os objetivos desse estudo foram traçados e o trabalho dividido em três capítulos. O primeiro refere-se a revisão de literatura da temática proposta. O segundo sobre a validação do método cromatográfico e determinação dos antidepressivos no Rio Piracicaba, SP. E por fim, o terceiro capítulo está relacionado com os testes ecotoxicológicos utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna.*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de antidepressivos residuais como a fluoxetina, citalopram, venlafaxina e sertralina em quatro pontos nas águas do Rio Piracicaba, SP e realizar teste de toxicidade aguda e crônica em *Daphnia magna.*

2.2. Objetivos Específicos

a) Efetuar a extração de antidepressivos nas amostras de água do Rio Piracicaba, SP utilizando a técnica de extração em fase sólida;
b) Adaptar um método simples e rápido para detecção dos fármacos fluoxetina, citalopram, venlafaxina e sertralina por meio da cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS);
c) Validar e aplicar o método de análise por HPLC-MS/MS na detecção dos compostos fluoxetina, citalopram, venlafaxina e sertralina nas amostras de água do Rio Piracicaba, SP;
d) Realizar testes de toxicidade aguda, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*, com os compostos fluoxetina, citalopram, venlafaxina e sertralina, para determinar o CE_{50} de cada substância;
e) Realizar testes de toxicidade aguda, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*, com cada antidepressivo bem como suas misturas, utilizando a maior concentração detectada em amostras do Rio Piracicaba, SP;
f) Realizar o cálculo do quociente de risco (RQ) do teste agudo de cada antidepressivo para *Daphnia magna*;
g) Realizar testes de toxicidade crônica, avaliando os parâmetros de reprodução, sobrevivência, tamanho dorsal e ventral, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*, com cada antidepressivo bem como suas misturas, utilizando a maior concentração detectada em amostras do Rio Piracicaba, SP.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fármacos no ambiente

Os contaminantes emergentes (CEs) são um grande grupo de compostos sintéticos ou naturais, que possuem a capacidade de gerar impacto à saúde ambiental. A maioria dos CEs não é regulamentada devido à falta de diretrizes padrão para os limites de descarga (SAIDULU et al., 2021). As principais fontes dos CEs, são:

> Indústria farmacêutica, produtos de higiene pessoal, indústria de fertilizantes, pesticidas, hormônios, antibióticos, surfactantes, adoçantes artificiais, retardantes de chama, drogas ilegais, antibacterianos, compostos por fluorados, solventes de limpeza, adesivos para roupas, almofadas de espuma, pomadas, proteção solar, cosméticos, cuidados de beleza, refeições e bebidas e alimentos embalados (RATHI; KUMAR; SHOW, 2021, p.2).

A faixa de concentração em que os CEs já foram detectados em corpos d'água varia de pg L^{-1} a µg L^{-1} (GOGOI et al., 2018). O padrão de consumo de uma população determina a ocorrência dos CEs nos corpos d'água (SAIDULU et al., 2021).

A comercialização e o consumo de produtos farmacêuticos aumentaram em todo o mundo (BUNGAU et al., 2021). Consequentemente, ocorreu um crescimento do descarte indevido de medicamentos não utilizados (ALNAHAS et al., 2020). Quando descartados em locais inadequados, esses resíduos de medicamentos tornam-se um ameaça para o ambiente e, por consequência para a saúde da população (BUNGAU; BUNGAU; TIT, 2015). Diante disso é importante que sejam determinados seu destino e abundância, para que seja possível prever, regular e compreender os seus riscos (CARDOSO-VERA et al., 2021).

Há uma ampla gama de fármacos de diversas classes terapêuticas que são desenvolvidos para serem persistentes, com intuito de conservar suas propriedades químicas a fim de servir a um propósito terapêutico (BILA; DEZOTTI, 2003). No ambiente, os medicamentos podem ser solúveis em água ou associados ao sedimento, material particulado e orgânico (NUNES; DOS ANJOS; QUINÁIA, 2019). O ciclo de vida de um fármaco consiste em múltiplas fases, desde a concepção até o gerenciamento dos resíduos resultantes (BUNGAU et al., 2021). As substâncias ativas podem atingir as águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, o solo e animais (BUNGAU; BUNGAU; TIT, 2015).

Dentre as principais classes de contaminantes em águas brasileiras estão os anticonvulsivantes, hormônios, antidepressivos, anti-lipidêmicos, anti-hipertensivos, anti-glicêmicos, analgésicos, anti-inflamatórios, anti-piréticos, ansiolíticos e cafeína (QUADRA et al., 2017).

O Brasil enfrenta grandes problemas relacionados ao saneamento, onde em muitas regiões ainda ocorrem lançamentos de esgoto *in natura* diretamente nos recursos hídricos (QUADRA et al., 2017). Apenas 55% da população possui tratamento de esgoto considerado apropriado; 18% têm seu esgoto coletado e não tratado e 27% não possuem coleta nem tratamento (BRASIL, 2021). A ausência de saneamento básico agrava a poluição dos recursos hídricos seja por fármacos ou outros contaminantes emergentes.

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) não são projetadas para remoção de medicamentos. Os produtos farmacêuticos podem ser removidos por degradação microbiana ou sorção no lodo em uma ETE convencional (YING et al., 2013). O principal mecanismo de tratamento que prevalece no Brasil é o biológico, porém este não é eficiente na eliminação dos fármacos, devido ao alto peso molecular que algumas substâncias possuem, assim torna-se difícil a quebra dos compostos orgânicos pelos microrganismos (SAIDULU et al., 2021). São raros os casos de ETEs que utilizam técnicas complementares de tratamento (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; NUNES; DOS ANJOS; QUINÁIA, 2019). Vale ressaltar que alguns metabólitos mais persistentes ou mesmo mais tóxicos que os compostos originais podem ser formados durante o tratamento em uma ETE (PATEL et al., 2019).

O destino dos fármacos no ambiente depende de uma série de fatores, como suas propriedades físico-químicas, persistência, solubilidade, fatores ambientais, condições do corpo receptor (pH, teor de carbono orgânico e condição redox), composição do sedimento e solo (QUADRA et al., 2017; YING et al., 2013).

Há tecnologias de tratamento avançadas capazes de efetuar uma melhor remoção dessas substâncias como a ozonização, oxidação avançada, adsorção, separação por membrana, porém tais soluções são mais onerosas se comparadas aos processos tradicionais (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; RATHI; KUMAR; SHOW, 2021; YING et al., 2013).

Os fármacos podem atingir o ambiente por meio do descarte inadequado de medicamentos vencidos nos resíduos domiciliares ou descartados no vaso sanitário. As fossas sépticas e os aterros sanitários possuem lixiviados altamente concentrados, que são uma fonte significativa de fármacos nas águas subterrâneas, especialmente onde o lençol freático é raso e os aquíferos têm uma alta taxa de percolação (RAMAKRISHNAN et al., 2015).

Outra forma dos fármacos alcançar os compartimentos ambientais é pela excreção dessas substâncias pela urina ou fezes. Sabe-se que de uma dosagem administrada 50 % a 90 % são excretados sem sofrer alterações e persistem no ambiente (PINTO et al., 2014). Assim, os compostos farmacêuticos estarão ativos no ecossistema (ALNAHAS et al., 2020).

O lodo proveniente das ETEs, ao ser utilizado como fertilizante na agricultura é um importante causa de contaminação do ambiente terrestre. Quando nos solos, os fármacos podem atingir os corpos hídricos ao serem transportados por meio do escoamento, fluxo subsuperficial, fluxo de drenagem e lixiviação (QUADRA et al., 2017)

Os fármacos de origem veterinária são outra fonte de contribuição para a contaminação das matrizes ambientais, visto que o crescimento da pecuária e aquicultura tem levado à questões complicadas da saúde animal. Os principais meios de contaminação do ambiente pelos fármacos veterinários são o descarte indevido de medicamentos não utilizados, recipientes utilizados, rações, e excreção via fezes e urina. A excreção de fármacos veterinários atinge o solo e as águas subterrâneas diretamente, sem nenhum tratamento (JIGYASA; RAJPUT, 2021).

No ambiente, os fármacos podem passar pelo processo de sorção e dessorção, no qual ocorre a partição da substância entre a água, sedimento e matéria orgânica, afetando assim a biodisponibilidade do composto para a biota aquática (YING et al., 2013). Outro processo em que o fármaco é submetido, quando presente no ambiente, é a degradação biótica ou abiótica, que contribui para diminuição de sua ação, porém alguns elementos podem se manter resistentes e nocivos (BUNGAU et al., 2021). A degradação biótica envolve organismos - bactérias, fungos e algas. Já a degradação abiótica inclui os processos de hidrólise e fotólise (YING et al., 2013). Muitos fármacos são lipossolúveis e podem se depositar nos tecidos adiposos de animais, favorecendo a biomagnificação do composto na cadeia alimentar (BUNGAU et al., 2021).

As consequências da ocorrência dos fármacos no ambiente ainda estão sendo pesquisadas e discutidas. Estudos já apontam algumas sequelas relacionadas a presença dessas substâncias, como interferência no crescimento, alterações no metabolismo celular, interferência na fotossíntese e na estrutura da comunidade do fitoplâncton, resistência bacteriana, alteração no cloroplasto de algas, bioacumulação, biomagnificação, redução da capacidade de resposta do sistema imunológico de invertebrados, alteração na natação, alteração na reprodução e no comportamento de anfípodes e cladóceros, etc (BONNEFILLE et al., 2017, 2018; BOSSUS et al., 2014; BURGOS-ACEVES; FAGGIO, 2017; CAMPOS et al., 2016; KRAEMER; RAMACHANDRAN; PERRON, 2019; LI et al., 2020; PAGANO et al., 2016; QIAO et al., 2018; ROSI-MARSHALL et al., 2013; ULLAH et al., 2019; WANG; ZHANG; GUO, 2017; WANG; XU, 2016).

Poucos são os países que possuem diretrizes e regulamentações específicas no que diz respeito aos fármacos no ambiente (PATEL et al., 2019). No entanto, alguns esforços estão sendo feitos, principalmente na União Europeia (UE).

Na Diretiva 2000/60/UE conhecida como Water Framework Directive faltam limites legais de lançamento para produtos farmacêuticos (BARBOSA et al., 2016). A Diretiva 2008/105/UE altera a Diretiva 2000/60/UE e dispõe de normas para qualidade ambiental para substâncias prioritárias e para outros poluentes, com concentrações máximas admissíveis. Porém, os fármacos não estão incluídos na listagem apresentada (EUROPEAN COMMISSION, 2008)

A Diretiva 2010/84/UE impõe que as indústrias farmacêuticas precisam apresentar uma avaliação do risco ambiental no dossiê de registro de medicamentos (EUROPEAN COMMISSION, 2010; WÖHLER et al., 2020). A Decisão de Execução 2015/495/ UE estabelece uma lista de substâncias de vigilância para monitoração à escala da União no domínio da política da água, estão incluídos na listagem o diclofenaco e antibióticos macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) (EUROPEAN COMMISSION, 2015)

Uma abordagem estratégica publicada pela Comissão Europeia fornece informações sobre os progressos gerais realizados e propõe ações futuras em relação ao ciclo de vida dos produtos farmacêuticos, a serem seguidas pela UE e seus estados membros (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Todavia, não apresenta limites de descarga nem metas quantificáveis para as ações propostas (WÖHLER et al., 2020).

Apesar de não possuírem valores específicos legislados de lançamentos de fármacos no ambiente países como Canadá, EUA, México, Colômbia, Australia, Itália, Reino Unido e Portugal, fazem o recolhimento e descarte final adequado, com campanhas educativas quanto ao uso racional de medicamentos. A Suécia, Alemanha e Espanha vão além, exigem uma a avaliação do impacto ambiental do fármaco (DE OLIVEIRA et al., 2019).

No ano de 2018 o governo da Holanda, lançou a nível nacional um programa que propõe diferentes ações para reduzir as emissões de fármacos no ambiente, porém medicamentos de origem veterinária não estão incluídos no programa (WÖHLER et al., 2020). Na Alemanha não há nenhuma política governamental que regule o lançamento dos fármacos no ambiente, mas órgãos governamentais estão desenvolvendo uma estratégia para colocar em prática medidas que visem a redução de traços de poluentes nas águas (OELKERS, 2021; WÖHLER et al., 2020).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, do inglês, United States Environmental Protection Agency) incluiu os fármacos na atualização da quinta lista de contaminantes candidatos a futura regulamentação (CCL-5, do inglês, Contaminant Candidate List-5). A CCL-5 é uma lista de contaminantes que atualmente não estão sujeitos a regulamentação, mas podem exigir regulamentação futura sob o Safe Drinking Water Act (EPA, 2018).

No Brasil a Resolução CONAMA 357 de 2005 é responsável por estabelecer condições e padrões de lançamento de efluentes, além determinar valores máximos para algumas substâncias orgânicas e inorgânicas. A resolução CONAMA 430 de 2011 complementa e altera a Resolução nº 357/2005, e dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2005, 2011a). Apesar da alteração, a Resolução mais recente não inclui produtos farmacêuticos na determinação de padrões aceitáveis de lançamento e detecção.

Iniciativas em nível estadual foram tomadas, como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que em seu Setor de Análises Toxicológicas iniciou o monitoramento de anti-inflamatórios em águas superficiais do Estado de São Paulo (CETESB, 2018).

A Política Nacional de Resíduos Sólidos instituída pela Lei 12.305/2010 prevê a logística reversa, em que cada elo da sociedade é responsável pelo destino de um produto (BRASIL, 2010). Porém, os medicamentos não constavam especificamente na lista que a Lei apresenta, só a partir do Decreto 10.388 de 05 de junho de 2020 é

regulamentado e instituído “o sistema de logística reversa de medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, de uso humano, industrializados e manipulados, e de suas embalagens após o descarte pelos consumidores” (BRASIL, 2020).

De acordo com Oliveira et al. (2019) no Brasil ainda é pouco discutido e pesquisado sobre a ocorrência dos fármacos e seus resíduos nas águas superficiais. Medidas para detecção e monitoramento deveriam incluir as companhias de saneamento, que são responsáveis pela gestão dos serviços de água e esgoto do país.

3.2. Antidepressivos no ambiente

O consumo de medicamentos antidepressivos aumentou em todo mundo, devido ao reconhecimento da depressão, formulações de novas drogas abrangendo as possibilidades do tratamento terapêutico, além das diretrizes e mudanças nas atitudes do paciente. Na América Latina, os antidepressivos estão entre os fármacos mais consumidos (GONZÁLEZ PEÑA; LÓPEZ ZAVALA; CABRAL RUELAS, 2021).

Estima-se que cerca de uma em cada cinco pessoas será acometida por uma doença mental no decorrer de sua vida. Dentre os problemas que mais prevalecem estão os transtornos de ansiedade e os transtornos depressivos (OCDE, 2019).

Os antidepressivos atingem os compartimentos ambientais diariamente, por meio da excreção humana, descarte de pílulas não utilizadas e/ou vencidas nos vasos sanitários e no lixo comum, disposição inadequada dos resíduos sólidos, despejo de esgoto *in natura*, utilização do lodo proveniente de ETE na agricultura, efluentes industriais e efluentes hospitalares (Figura 3.1). Os antidepressivos já foram detectados em alguns compartimentos ambientais, sendo os principais: lençóis freáticos, rios, lagos, sedimentos, solo, oceano (CASTILLO-ZACARÍAS et al., 2021; EHRHART et al., 2020; FEKADU et al., 2019; MEJÍAS et al., 2021; SEHONOVA et al., 2018; WANG et al., 2019).

O destino e comportamento dos fármacos, em especial os antidepressivos, no meio ambiente são dependentes de algumas propriedades como a “*estrutura molecular, polaridade, constante de dissociação (Ka), solubilidade em água, coeficiente de partição octanol- água (Kow), coeficiente de sorção sólido-água (Kd) e persistência*” (BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018).

Os antidepressivos são uma categoria das drogas psiquiátricas classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo os mais utilizados para o tratamento da depressão e ansiedade os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), inibidores seletivos da recaptação da serotonina-norepinefrina (ISRSNs), antidepressivos tricíclicos (ADTs), inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), inibidores da recaptação da norepinefrina-dopamina (IRND) e antagonistas do receptor NMDA (FITZGERALD; WATSON, 2019).

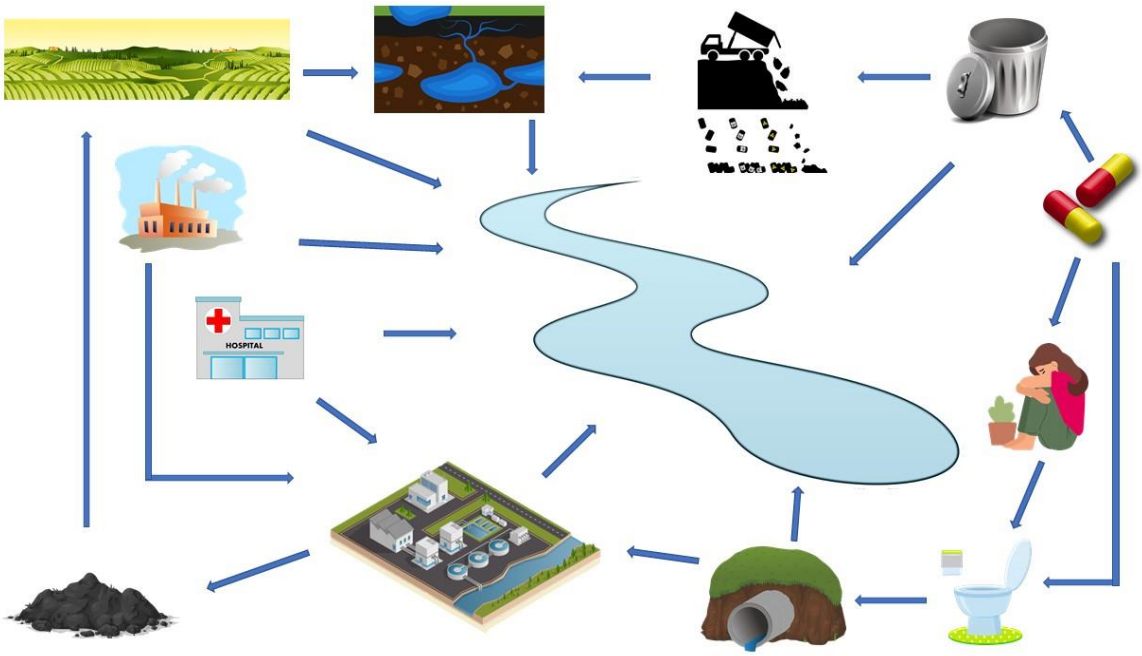


Figura 3.1 - Vias de chegada dos antidepressivos no corpo d'água (Fonte: Autoria Própria)

A fluoxetina (FLU), citalopram (CIT) e a sertralina (SER) estão entre os ISRSs, pois bloqueiam os transportadores pré-sinápticos da recaptação da serotonina (SEHONOVA et al., 2018). Apesar de pertencerem a um grupo com o mesmo mecanismo de ação, os ISRSs não têm estruturas iguais, possuem diferenças em sua farmacocinética e farmacodinâmica. A força da inibição de recaptação da serotonina de cada composto varia, tal qual a seletividade por noradrenalina e dopamina, sendo que dentro do grupo a SER é o mais potente inibidor de recaptação (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

A venlafaxina (VEN) pertencente ao grupo dos ISRSNs que atuam na junção sináptica para prevenir a recaptação de serotonina e noradrenalina, demonstram baixa atividade como inibidores da recaptação de dopamina (MORENO; MORENO;

SOARES, 1999; SEHONOVA et al., 2018).

A FLU é rapidamente absorvida, sua metabolização ocorre no fígado, gera como metabólito ativo a norfluoxetina. A excreção ocorre predominantemente pela urina, cerca de 80%, e 15% pelas fezes ou bile. O tempo de meia vida (t ½) da FLU é de 24-96 h, o mais longo ao comparado com as outras substâncias deste estudo (HIEMKE; HÄRTTER, 2000; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; RANG et al., 2016; SPINA; PISANI; DE LEON, 2016).

O CIT possui rápida absorção e é metabolizado majoritariamente no fígado, cerca de 85%, e o restante 15% nos rins. Alguns derivados são gerados, os ativos - como o desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram e citalopram-Nóxido – e inativo - o ácido propiônico deaminado. É eliminado através da urina de 12% a 23% do CIT em sua forma inalterada. A t ½ é de cerca de 24-36 h (HIEMKE; HÄRTTER, 2000; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; RANG et al., 2016; SPINA; PISANI; DE LEON, 2016).

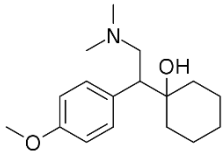
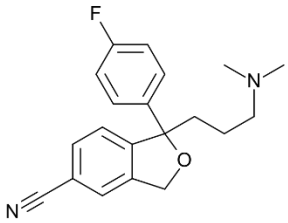
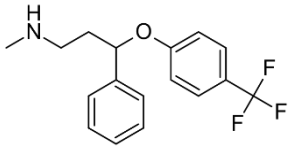
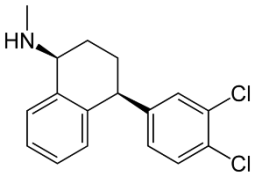
A absorção da SER é lenta, a metabolização ocorre no fígado. A t ½ da SER é de 24-36 h. O N-desmetilado é o principal metabólito gerado na biotransformação da SER, o seu t ½ é três vezes mais longo que o composto original. A eliminação da SER na urina varia de 40 a 45%, onde 0,2% é excretada de forma inalterada. Nas fezes a eliminação oscila entre 40 a 45%, em que a excreção na forma inalterada é de 12 a 14% (HIEMKE; HÄRTTER, 2000; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; RANG et al., 2016; SPINA; PISANI; DE LEON, 2016).

A VEN é rapidamente absorvida, após administração oral. No fígado é metabolizada em O-desmetilvenlafaxina, N,O'desmetilvenlafaxina e N-desmetilvenlafaxina. A t ½ da VEN é de aproximadamente 5 h - relativamente curto ao comparados com as outras substâncias desse estudo. Porém, seus metabólitos possuem a t ½ duas vezes maior ao comparado com a substância original. A VEN e seus metabolitos são excretados em sua maior parte pela urina (87%) (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; RANG et al., 2016; RAZZOUK, 2014; SPINA; PISANI; DE LEON, 2016).

Os antidepressivos estudados possuem em sua estrutura química grupo amino, assim têm natureza básica e valor alto de pka. Os anéis e a cadeia hidrocarbônicas conferem as substâncias caráter hidrofóbico (COSTA JUNIOR et al., 2017). A polaridade dos compostos ionizáveis, varia com o pH do sistema receptor, assim está sujeita a alterações em diferentes compartimentos biológicos, que pode modificar a

bioacumulação esperada e real, o comportamento de partição e toxicidade. Por serem bases fracas, as substâncias aqui estudadas estão presentes na água principalmente na forma neutra em pH alto e na forma iônica em pH baixo (SILVA et al., 2015b). As principais características dos antidepressivos estudados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Características dos antidepressivos estudados

Antidepressivo	Estrutura	Massa molar (g mol^{-1})	pka	Log Kow	t ½
VEN		277,4	8,91	3,2	~5 h
CIT		324,4	9,78	3,5	24-36 h
FLU		309,3	9,8	4,05	24-96 h
SER		306,2	9,85	5,1	24-36 h

Os valores de log Kow dos antidepressivos são VEN 3,20; CIT 3,5; FLU 4,05; SER 5,1. De acordo com Aquino et al. (2013) as substâncias que apresentarem o log Kow entre 2,5 e 4,0, possuem uma tendência moderada de absorção. Os fármacos com log Kow > 4,0 apresentam grande hidrofobicidade, com um potencial de migrarem da fase aquosa, sendo sorvidos nos sedimentos, lodos e sólidos suspensos.

Os antidepressivos já foram detectados em diversos compartimentos ambientais, como no estudo de Miller et al. (2021) que foram analisados 141 compostos entre eles a venlafaxina, citalopram, fluoxetina e sertralina, na água de superfície, sedimento e biota no estuário do rio Colne Reino Unido. Na água superficial a venlafaxina foi uns dos compostos detectados em maiores concentrações 295,4 ng L^{-1}. A sertralina foi detectada em alta concentração no sedimento 35,5 ng g^{-1}. Mais da metade dos fármacos detectados nas amostras de biota eram antidepressivos como carbamazepina, amitriptilina, diazepam, citalopram, nordiazepam, venlafaxina, temazepam e sertralina.

Os antidepressivos venlafaxina e carbamazepina – detectados nas amostras de águas superficiais nas concentrações de 144,1 ng L^{-1} e 170,4 ng L^{-1} - estão entre os dez compostos identificados como marcadores relevantes de contaminação no estudo de Čelić et al. (2021), pois as concentrações encontradas foram consideradas de grande preocupação ecológica.

A venlafaxina, citalopram, fluoxetina e sertralina foram detectadas todas as amostras coletadas em afluente e efluente de uma ETE, em um riacho e rio dos Estados Unidos. As maiores concentrações foram da venlafaxina (350 ng L^{-1}) e citalopram (278 ng L^{-1}) (SKEES et al., 2018).

Os antidepressivos amitriptilina e dosulepina foram detectados em amostras de água subterrânea e afluente bruto de uma ETE da empresa *Farmak* na República Tcheca (KŘESINOVÁ et al., 2016).

Em outro estudo o citalopram e a venlafaxina foram detectados em amostra de drenagem subterrânea. Já na água subterrânea nenhum fármaco estava presente acima dos limites de detecção antes da aplicação de biossólidos municipais no campo. Após a aplicação do biossólido a venlafaxina e outros compostos foram detectados (GOTTSCHALL et al., 2012).

A sertralina, venlafaxina e mais outros compostos foram detectados em amostras de lodo de esgoto obtidas em ETEs municipais localizadas em Galiza (Espanha) (CASTRO et al., 2021). No estudo de Ferhi et al. (2016) a fluoxetina e a carbamazepina estavam presentes na amostra de lodo. No solo a concentração de carbamazepina estava abaixo do limite de detecção.

Os antidepressivos amitriptilina, imipramina e clomipramina e outros fármacos foram analisados em solos na Polônia. Doze dos vinte compostos analisados estavam presentes nas amostras, entre eles a clomipramina (KUMIRSKA et al., 2019).

No estudo de Wang et al. (2019) a fluoxetina e outros compostos foi detectada em lixiviado de um aterro em Cingapura. Em um estudo que verificou a ocorrência de vinte e seis produtos farmacêuticos no lixiviado de quatro aterros em Taiwan (China), dezesseis deles foram detectados, entre os quais a carbamazepina foi identificada em todas as amostras, já a fluoxetina não foi detectada (LU et al., 2016).

3.3. Técnicas analíticas empregadas para análise de fármacos no ambiente

As técnicas analíticas empregadas na detecção de fármacos no ambiente estão baseadas na cromatografia líquida (LC - do inglês *Liquid Chromatography*) ou cromatografia gasosa (GC – do inglês *Gas Chromatography*). A determinação de qual a melhor técnica a ser utilizada irá depender das "*propriedades do poluente de interesse de acordo com a volatilidade e semivolatilidade, polaridade, hidro e lipossolubilidade"* (COSTA; PLETSCH; TORRES, 2014).

A LC é a mais utilizada para análise de fármacos em matrizes ambientais (ÁLVAREZ-RUIZ; PICÓ, 2020). Diferentes tipos de detectores são utilizados, como o detector de UV (comprimento de onda único ou matriz de fotodiodo), detector de fluorescência (FLD) e espectrômetro de massa (MS) (KIM et al., 2018). As opções com menores custos são os detectores de UV e FLDs, porém não possuem sensibilidade suficiente ao serem comparados com o MS para quantificar as concentrações de contaminantes em amostras ambientais (ÁLVAREZ-RUIZ; PICÓ, 2020; LANÇAS, 2013).

No ambiente, os fármacos estão em níveis traço (concentrações na escala de pg L^{-1}, ng L^{-1} e µg L^{-1}) e com a aprimoração das técnicas de HPLC-MS/MS houve um grande avanço na medição e identificação dessas substâncias, propiciando informações sobre a presença, distribuição e destino de contaminantes (PICÓ, 2020).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (HPLC-MS/MS – do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*) é uma técnica analítica poderosa aliada a detecções de contaminantes ambientais (PICÓ, 2020). Concilia a capacidade de separação do HPLC com a medição específica de íons carregados por MS, fornecendo sensibilidade e especificidade para análises simultâneas de multiclasses e multiresíduos (ZHENG; WANG, 2019)

Na cromatografia líquida as substâncias são separadas no tempo. Os íons são então gerados na fonte de ionização e distintos de acordo com a razão massa/carga (m / z) no analisador de massa de MS. Por fim, o detector massas mede a abundância de cada íon (EL-SHAHENY; EL HAMD; EL-MAGHRABEY, 2021; KRUVE et al., 2015a).

No MS existem diferentes modos de operação que são utilizados, como monitoramento seletivo de reações (SRM – do inglês *selected reaction monitoring*), monitoramento de reação múltipla (MRM - do inglês *multiple reaction monitoring*), monitoramento de reação consequente (MS^n - *consequent reaction monitoring*) e varredura da constante perda de fragmentos neutros (NLS – do inglês *neutral loss scan*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; KRUVE et al., 2015a)

O MRM fornece alta sensibilidade e aumenta a seletividade, pois possibilita que os sinais de íons, produto de vários íons precursores sejam medidos e utilizados para quantificação de muitos analitos, com isso a probabilidade de identificação de falsos positivos é diminuída (KRUVE et al., 2015a). Porém, o MRM é mais restritivo entre os modos de operação, pelo menor número de analitos que podem ser detectados por execução cromatográfica (EL-SHAHENY; EL HAMD; EL-MAGHRABEY, 2021).

A ionização por pressão atmosférica (API) surge para garantir a eliminação do solvente proveniente do LC e da ionização do alvo, permitindo a conexão de LC ao MS. A ionização por eletrospray (ESI – do inglês *electrospray ionization*) é o API mais usado para o desenvolvimento de interface do HPLC-MS/MS (BUSSY; LI; LI, 2016), pois é a interface mais eficaz na injeção de íons em analisadores MS com pouca ou nenhuma fragmentação de íons (KRUVE et al., 2015b; PAGE et al., 2007). No ESI as moléculas são ionizadas de acordo com as características do composto, como peso molecular, polaridade e complexidade estrutural (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012). A ionização é realizada no modo positivo ou negativo e os íons precursores são normalmente produzidos em suas formas $[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$ (KIM et al., 2018).

A ESI tende a mostrar efeitos de matriz (EM) com a supressão ou aumento de sinal (BUSSY; LI; LI, 2016). O EM pode ser superado com algumas técnicas como, diluição pós-amostra, volume de injeção menor, utilização de um modo de ionização alternativo - ionização química à pressão atmosférica – calibração com adição de padrão, calibração padrão externa com correspondência da matriz, calibração

padrão interna. Ainda, um procedimento de extração mais seletivo e um processo de limpeza de amostra mais extenso podem reduzir drasticamente o EM (RAPOSO; BARCELÓ, 2021).

O pré-tratamento da amostra é necessário para a concentração dos contaminantes e a limpeza da amostra (FONTANALS et al., 2019). Assim, torna-se possível eliminar eventuais interferências da matriz advindas de compostos endógenos, como proteínas, lipídios e outras moléculas orgânicas ou inorgânicas (MELCHOR-MARTÍNEZ et al., 2021). A definição da técnica analítica mais apropriada para a etapa de extração e limpeza da amostra, está relacionada com as propriedades físico-químicas da matriz e dos analitos em estudo. Essas etapas, são de suma importância para aumentar a sensibilidade da detecção, para obtenção de boas recuperações (BUSSY; LI; LI, 2016).

Para análise de antidepressivos no ambiente, o método de extração mais utilizado é a extração em fase sólida (SPE – do inglês *solid phase extraction*) (BAKER; BARRON; KASPRZYK-HORDERN, 2014; BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2011; BOOGAERTS et al., 2019; FERNANDES et al., 2020; FONTANALS et al., 2019; LAJEUNESSE et al., 2012). O método SPE é usado para o isolamento e concentração de analitos específicos em fluídos, mas também pode ser usada para amostras sólida se forem pré-extraídas com solventes (MELCHOR-MARTÍNEZ et al., 2021).

Na SPE ocorre a interação da amostra com uma fase estacionária adsorvente, cuja finalidade é concentrar os analitos de interesse ou mesmo isolá-los dos interferentes da matriz. Na concentração os analitos são retidos no cartucho e são removidos seletivamente pela ação de um solvente, já no isolamento o procedimento é inverso (JARDIM, 2010).

De modo geral as etapas envolvidas na SPE abrangem o condicionamento do cartucho (sorvente) com o solvente, com a posterior aplicação da amostra, seguido pela limpeza da coluna e, por fim, a eluição do analito (JARDIM, 2010).

A SPE pode ser conduzida nos modos *off line* e *on line* (FONTANALS et al., 2019). A maioria dos métodos emprega a SPE *off line*, porém na SPE *on line*, utiliza-se uma quantidade reduzida de amostras, o tempo de preparo e manipulação da amostra é reduzido e, assim são diminuídas as chances de contaminação (MONTEIRO et al., 2016). Algumas desvantagens do SPE são o tempo elevado de análise (no caso do SPE *off line*), e os elevados custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais (JARDIM, 2010).

A validação analítica é uma série de procedimentos que segue alguns critérios estabelecidos, cuja finalidade é de comprovar se determinada metodologia elaborada fornece um resultado confiável de acordo com a o uso pretendido (BRASIL, 2017). Devido a criação de muitas metodologias analíticas, a validação tornou-se importante e necessária para a obtenção de parâmetros uniformes, assim foram criados muitos materiais com orientações especificada de validação em vários países do mundo (KRUVE et al., 2015a).

As diretrizes elaboradas por algumas agências mundiais como *Eurachem, International Union of Pure and Applied Chemistry, AOAC, U.S. Food and Drug Administration, United States Pharmacopoeia, International Conference on Harmonization, World Health Organization,* servem como base mundial para outros países (BONFILIO et al., 2012).

Há um consenso universal sobre alguns parâmetros avaliados no procedimento de validação, porém uma variedade de métodos de validação continua a ser empregada (BONFILIO et al., 2012). Existe uma discordância em alguns pontos-chave nos procedimentos de validação, bem como nos critérios de aceitação, e isso acaba dificultando a padronização universal da validação (KRUVE et al., 2015a).

No Brasil, o órgão responsável por estabelecer as diretrizes para a validação de métodos analíticos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A primeira resolução que a agência lançou foi a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, logo depois a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, e a mais recente RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2003, 2012, 2017). Outros órgãos também elaboraram guias que abordam os procedimentos de validação, como o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (BRASIL, 2011b; INMETRO, 2016). Vale ressaltar que no Brasil, não há uma resolução voltada especificamente para a validação de metodologias análise de fármacos em amostras ambientais.

3.4. Implicações ecotoxicológicas de antidepressivos no ambiente aquático

A ecotoxicologia é uma ciência moderna derivada da ecologia e da toxicologia (BELDEN, 2020). A primeira definição foi feita por Truhaut datada em 1974, o autor apresenta a ecotoxicologia como "*um ramo da toxicologia que se preocupa com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais e sintéticos,*

aos constituintes dos ecossistemas, animais (incluindo humanos), vegetais e microbianos, em um contexto integrado" (TRUHAUT, 1977). Desde então, muitas definições foram apresentadas, a mais recente é a feita por Walker et al. (2012) afirmando que a ecotoxicologia é "*estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos nos ecossistemas, incluindo efeitos sobre os indivíduos dentro dos ecossistemas, bem como efeitos consequentes no nível da população e acima*".

Segundo Belden (2020) o principal objetivo da ecotoxicologia é a promoção da proteção em níveis de população, comunidade e ecossistema da flora e fauna nativas. Para Scott e Minghetti (2020) a ecotoxicologia se foca na prevenção, monitoramento e atenuação dos impactos ocasionados pelo homem no ambiente. Assim, o reconhecimento dos possíveis efeitos, bem como uma avaliação da relação da dose-resposta (substância e organismo) é a fase preliminar que engloba a avaliação do risco ambiental (SILVA et al., 2015a).

A toxicidade nos organismos pode ocorrer nos mais diversos níveis do ecossistema, incluindo conformações celulares, populações e comunidades (NEWMAN, 2019). A ecotoxicologia em ambientes aquáticos abrange diversos mecanismos como *"o transporte, distribuição, transformação e o destino final dos contaminantes"* (COSTA et al., 2008)

A ecotoxicidade de produtos farmacêuticos tornou-se um tema mundial. Existem agências reguladoras que são responsáveis pela caracterização, avaliação de risco e gestão da ecotoxicidade de algumas substâncias são elas: Agência Ambiental Australiana (AEA – do inglês *Australian Environment Agency*); Centro para avaliação e pesquisa de drogas (CDER - do inglês *Center for Drug Evaluation and Research*); Agência Europeia de Medicamentos (EMA – do inglês *European Medicines Agency*); Comitê científico da Comissão da União Europeia sobre toxicidade, ecotoxicidade e ambiente (EU-CSTEE – do inglês *European Union Commission's scientific committee on toxicity, ecotoxicity and environment*); Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão (MHLW – do inglês *The Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan*); Esquema Nacional de Notificação e Avaliação de Produtos Químicos Industriais (NICNAS – do inglês *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme*); Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH – do inglês *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*); Classificação Ambiental Sueca e Sistema de Informação (SECIS – do inglês *Swedish Environmental Classification and Information System*);

Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA – do inglês *United States Environmental Protection Agency*); Lei Canadense de Proteção Ambiental (CEPA – do inglês *Canadian Environmental Protection Act*); Agência Federal do Meio Ambiente da Alemanha (UBA – do alemão *Umweltbundesamt*) (KAR et al., 2020).

Os ensaios ecotoxicológicos possuem o objetivo de analisar a sensibilidade de organismos aquáticos em relação a dada substância tóxica ou efluentes industriais (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). O ambiente aquático se constitui como o principal reservatório de contaminantes - esses que podem ser depositados com o lançamento de efluentes, emitidos no ar ou provenientes dos solos (COSTA et al., 2008).

No ambiente, os organismos vivos ao serem expostos aos fármacos podem sorver e armazenar os contaminantes em tecidos e órgãos. O reflexo da exposição irá depender da natureza das substâncias, concentração e o tempo de exposição. Os efeitos podem ser reversíveis, crônicos ou agudos, ocasionando a morte do organismo (SILVA et al., 2015b).

Os ensaios em ecotoxicologia podem ser classificados como agudo e crônico (COSTA et al., 2008; NEWMAN, 2019). O ensaio agudo analisa os efeitos ocasionados pela exposição do organismo-teste a um determinado composto em curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas, avalia a imobilidade e mortalidade do organismo. A partir dos testes efetuados é possível a determinação da concentração da amostra responsável pelo efeito em 50% dos organismos testados (CE_{50}) ou pode-se determinar a concentração de uma substância que causa a mortalidade de 50% dos indivíduos (CL_{50}) (NEWMAN, 2019; QUEIROZ, 2015).

Os ensaios crônicos avaliam os efeitos de determinados compostos sobre organismos-teste por um período que pode abranger parte ou todo o seu ciclo de vida. Por convenção em ecotoxicologia, um teste crônico deve ser pelo menos 10% da duração da vida do ciclo de vida do organismo utilizado no ensaio, mas nem sempre é o caso. Neste tipo de teste é possível determinar a letalidade, crescimento, reprodução, desenvolvimento de ovos, maturação ou outras qualidades importantes em todos os estágios da vida de uma espécie. A partir dos testes efetuados é possível determinar a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) (COSTA et al., 2008; NEWMAN, 2019).

Entre os principais organismos-teste mais utilizados para testes ecotoxicológicos de antidepressivos estão: algas - *Pseudokirchneriella subcapitata, Scendesmus acutus, Scendesmus quadricauda, Chlorella vulgaris, Dunaliella tertiolecta, Scendesmus vacuolatus* – bactérias - *Vibrio fischeri, Pseudomonas putida, Aeromonas salmonicida* – invertebrados - *Ceriodaphnia dúbia, Ceriodaphnia silvestrii, Daphnia magna, Daphnia similis, Chlorostoma funebralis, Lithopoma americanum, Tegula fasciatus, Nucella ostrina, Hyalella azteca, Chironomus tentans, Gammarus pulex, Thamnocephalus platyurus, Spirostomum ambiguum, Potamopyrgus antipodarum, Valvata piscinalis, Urosalpinx cinérea, Lampsilis siliquoidea, Ligumia recta* – peixes e outros vertebrados - *Pimephales promelas, Danio rerio, Tachysurus fulvidraco, Poeciliopsis lucida, Xenopus laevis, Cophixalus riparius, Gambusia affinis, Oryzias latipes, Oncorhynchus mykiss* (SILVA et al., 2015b).

A seleção da melhor espécie a ser utilizada em um estudo deve atender a alguns critérios básicos, como a sensibilidade e disponibilidade. O organismos-teste deve ser sensível a uma diversidade de agentes químicos, e esta deverá ser contínua, de modo a garantir a obtenção de resultados precisos. Com relação a disponibilidade, quando o organismo é cultivado em laboratório, este critério é facilmente atendido. Espécies como *Daphnia* e *Ceriodaphnia* possuem fácil e estabelecida manutenção em laboratórios (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008), devido a existência de um grande número de informações e regulamentações sobre as técnicas de cultivo, como a ABNT NBR12713: 2016, OECD nº 211 e ABNT NBR 13373:2017.

A *D. magna,* organismo-teste alvo desde estudo, também conhecida como pulgas d'água, é um microcrustáceo pertencentes à ordem Cladocera, é parte do zooplâncton, ocupa uma posição importante em muitas cadeias alimentares aquáticas, pois servem como fonte significativa de alimento para peixes (ANTUNES; CASTRO, 2017; COSTA et al., 2008). É um consumidor primário, pois se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão, especialmente de algas unicelulares (ABNT, 2016).

Dentre a ordem Cladocera é o maior organismo com tamanho de 0,5 mm a 6 mm ou mais na fase adulta, possui uma carapaça bivalve transparente que engloba todo corpo, com exceção da cabeça e antenas (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008; TKACZYK et al., 2021). A utilização do organismo *D. magna* tem muitas vantagens, como tamanho do corpo, ciclo de vida curto, alta fecundidade e a reprodução assexuada por partenogênese - que garante a produção de organismos

geneticamente idênticos, propiciando uma constante sensibilidade da cultura (Figura 3.2 A) (TKACZYK et al., 2021). Porém, no caso de estresse ambiental – mudança de temperatura da cultura, falta de alimento e superlotação – ocorre o surgimento de machos e fêmeas com ovos haploides. Os ovos são fertilizados pelos machos, e tornam-se efípios que são altamente resistentes a condições desfavoráveis, possuindo a uma cor escura e rígida (Figura 3.2 B) (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

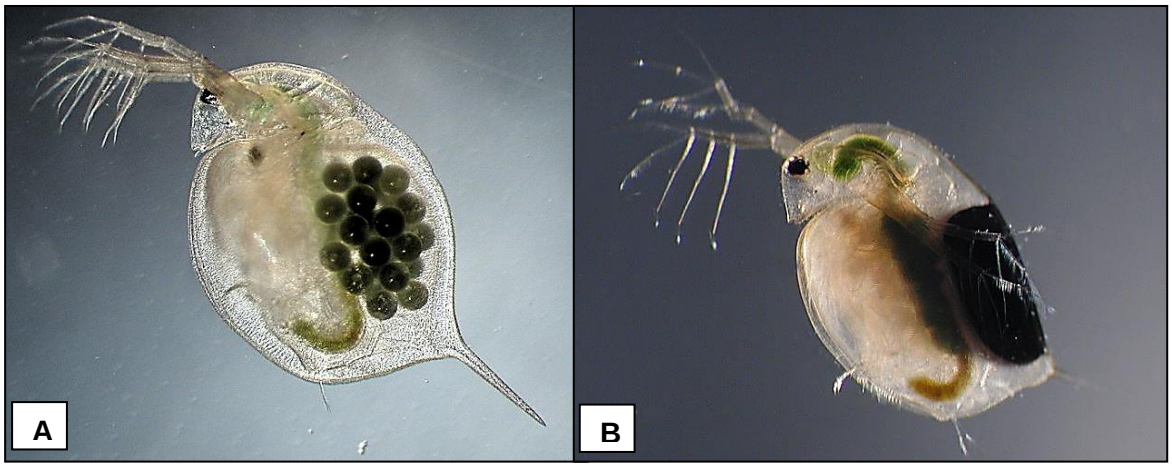


Figura 3.2 - A) *Daphnia magna reprodução assexual,* B) *Daphnia magna* com efípio (Fonte: Autoria Própria)

Os impactos dos antidepressivos no ambiente aquático são temas de muitas pesquisas atualmente. As concentrações ambientais dos antidepressivos não são suficientes para provocar um efeito agudo, porém o mais preocupante são os efeitos crônicos dessas substâncias nos organismos aquáticos (FORD; FONG, 2016). Pode-se dizer que entre os antidepressivos aqui estudados, a fluoxetina é o que mais apresenta estudos sobre efeitos e detecção no ambiente.

Por exemplo, no estudo de Fuertes et al. (2020) os antidepressivos diazepam, fluoxetina e propranolol aumentaram os níveis de alguns triacilgliceróis e reduziram níveis de monoacilgliceróis, lisofosfolipídeos, esfingomielinas e ésteres de colesterol do organismo *D. magna*. Em outro estudo do mesmo autor foram avaliados os efeitos reprodutivos e transcricionais da exposição de mistura do propranolol, diazepam e carbamazepina na *D.magna* em concentrações ambientalmente relevantes.

Os compostos apresentaram a capacidade de desregular a insulina, o ácido araquidônico e as vias de sinalização da biossíntese de esteróides do organismo-teste (FUERTES et al., 2019).

Ding et al. (2017) avaliou o potencial de bioconcentração da fluoxetina e seus efeitos biológicos em *D. magna.* A conclusão do estudo foi que o antidepressivo pode se acumular e induzir perturbações fisiológicas e bioquímicas no organismo-teste.

Foram observadas diferenças gerais nas concentrações dos níveis de 41 neurotransmissores de *D. magna* sob o efeito de quatro antidepressivos sertralina, venlafaxina, duloxetina e fluoxetina (GÓMEZ-CANELA et al., 2019).

Bringolf et al. (2010) mediu a ocorrência, distribuição e bioacumulação de fluoxetina em amostras de água, sedimento e mexilhões de água doce *E. complanata*. O antidepressivo foi detectado em todas as matrizes estudadas e, os resultados obtidos sugerem que a fluoxetina além de se acumular nos tecidos do mexilhão, tem o potencial de interromper vários aspectos de sua reprodução. No mexilhão-zebra *Dreissena polymorpha* concentrações ambientais relevantes de fluoxetina na faixa de ng L^{-1}, induziram a desova de espermatozóides e ovócitos, efeito este que foi mediado pela serotonina (LAZZARA et al., 2012).

O mexilhão de água doce *Lampsilis fasciola* teve seu comportamento alterado pela fluoxetina, houve aumento no movimento, diminuição do tempo de movimento, ampliação da probabilidade de movimento diurno e acréscimo nas taxas de exibição de isca (HAZELTON et al., 2014). Os efeitos de baixas doses de fluoxetina foi estudado no comportamento do invertebrado de água doce *Gammarus pulex.* O resultado foi o aumento na velocidade de nado (DE CASTRO-CATALÀ et al., 2017).

A sertralina na concentração de 3 µg L^{-1} reduziu a ligação do transportador de recaptação de serotonina, bem como alterou o comportamento de busca de abrigo em *Pimephales promelas* machos adultos (VALENTI et al., 2012). Quando expostos à sertralina, *Procambarus virginalis* se mostraram mais ativos, se moviam a maiores distâncias, desovaram com mais frequência e apresentaram maior mortalidade se comparados ao controle (HOSSAIN et al., 2019).

Em um estudo de Yang et al. (2019) os efeitos da sertralina foram investigados nas estruturas das comunidades microbianas aquáticas por meio de análises de sequenciamento de alto rendimento. Foram utilizados a alga verde *Chlorella vulgaris* e a cianobactéria *Microcystis aeruginosa.* O composto inibiu o crescimento dos microrganismos e a concentração de clorofila *a* no microcosmo e assim reduziu a

eficiência fotossintética. Além de perturbar o equilíbrio das espécies de cianobactérias ao estimular o crescimento de cianobactérias específicas.

Tachysurus fulvidraco foi exposto à sertralina em concentrações ambientais, para determinação de efeitos subcrônicos como o comportamento e crescimento. No intuito de avaliar os mecanismos de toxicidade foi realizada a medição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), bem como os transcritos relacionados ao crescimento e alimentação. Os impactos observados foram o aumento do cardume, diminuição do consumo de comida, aumento da taxa de canibalismo, interrupção da expressão de neuropeptídeos e redes de sinalização de leptina, alteração nas redes gênicas associadas às vias de resultados adversos para o comportamento e acúmulo da substância em diferentes tecidos, especialmente no fígado e cérebro (CHEN et al*.,* 2021).

YANG et al. (2021) mediram diferentes efeitos comportamentais da sertralina no organismo *Danio rerio* em estágios iniciais de desenvolvimento, com o objetivo determinar a relação entre o comportamento adverso e a resposta molecular subjacente de genes associados ao sistema serotonérgico. O composto foi capaz de acelerar a eclosão de embriões, reduziu o comportamento locomotor das larvas, e evitar a escuridão.

As exposições a venlafaxina aumentou o tempo para capturar as presas em um estudo utilizando *Morone saxatilis* e *Morone chrysops* como predadores e *Pimephales promelas* como presa. Além disso, o antidepressivo causou uma diminuição estatisticamente significativa nas concentrações de serotonina no cérebro (BISESI; BRIDGES; KLAINE, 2014). A ação dos antidepressivos pode ser agravada pelas condições ambientais. Por exemplo, a exposição conjunta de *Danio rerio* ao antidepressivo venlafaxina e o acréscimo da temperatura aumentaram as taxas metabólicas padrão do organismo, enquanto a exposição aos estressores separadamente não afetou o metabolismo (MEHDI et al., 2019).

As concentrações ambientais de venlafaxina foram responsáveis por alguns efeitos em *Oncorhynchus mykiss*, como redução a resposta de glicose no plasma induzida por estressores, aumento da capacidade metabólica do fígado, impactar o metabolismo das guelras e reduzir a atividade da ATPase Na^+/ K^+ (BEST et al., 2014).

Gasterosteus aculeatus exposto ao citalopram em concentrações ambientais teve seu comportamento alterado com a diminuição da atividade locomotora (HÖGLUND; ØVERLI; ÅTLAND, 2020). Em outro estudo envolvendo o mesmo

organismo e substância foi investigado o comportamento relacionado ao estresse, para uma estimativa da ansiedade, realizou-se também a um teste de cardume, locomoção, de mergulho, de comportamento e agressão. A conclusão foi que o citalopram alterou o comportamento do organismo em alguns aspectos como atividade locomotora que foi aumentada, os peixes expostos se aventuraram perto do objeto desconhecido com mais frequência e permaneceram lá por mais tempo se comparados ao controle. O teste de agressão e de cardume não produziram efeitos estatisticamente significativos (KELLNER et al., 2016).

Em um estudo envolvendo *Mytilus galloprovincialis* foi estudado o efeito da acidificação e do aquecimento da água na bioconcentração, metabolismo e depuração de uma mistura de sete medicamentos sotalol, sulfametoxazol, venlafaxina, carbamazepina, citalopram, metilparabeno e triclosan. A concentração de exposição da mistura foi de 15,7 µg L^{-1} durante o período de vinte dias seguidos de mais vinte para depuração. Os mexilhões absorveram todos os fármacos e a concentração nos tecidos dos mexilhões variou de 1,8 µg kg^{-1} peso seco para metilparabeno (menor concentração) a 12889,4 µg kg^{-1} peso seco para citalopram (maior concentração) (SERRA-COMPTE et al., 2018).

Foram observados comportamentos sobre respostas fotomotoras, distância percorrida e atividade locomotora estimuladora, refratária e de cruzeiro em *Pimephales promelas* e *Danio rerio* sob a ação dos compostos 1-heptanol, fenol, R -(-)- carvona, citalopram, diazinon, pentilenetetrazol (PTZ) e xilazina. O citalopram e a xilazina afetaram significativamente o comportamento em valores de risco terapêutico e, cada um dos sete produtos químicos apresentou perfis de resposta comportamental único (STEELE et al., 2018).

Existe uma lacuna de estudos em relação aos efeitos possíveis da exposição contínua em concentrações ambientais dos antidepressivos em humanos, há uma grande incerteza das consequências, principalmente devido à complexidade na relação dose-resposta. Portanto, há necessidade de mais estudos a fim de finalizar suprir essa defasagem (DAUGHTON; RUHOY, 2011; ZHENG et al., 2021).

3.5. Conclusões

Os antidepressivos estão presentes em diversos compartimentos ambientais e já foram detectados em muitos países. A ETE é a principal via de entrada desses

contaminantes no ambiente aquático, portanto necessitam de atualizações para a conseguirem obter uma completa remoção dessas substâncias.

A realização de testes ecotoxicológicos dá base para o entendimento do comportamento e efeitos dos antidepressivos nos organismos aquáticos. Algumas consequências da presença desses compostos nos organismos foram investigadas e sabe-se que alguns efeitos adversos ocorrem como, alterações na natação, diminuição do reflexo de escape, alteração na alimentação, entre outros. Ainda pouco se sabe sobre as implicações da exposição a concentrações ambientais no decorrer de toda cadeia trófica, incluindo animais terrestres.

As técnicas analíticas existentes são importantes para detectar e quantificar baixas concentrações de antidepressivos e seus metabólitos na biota aquática. Assim, faz-se necessário o aprimoramento contínuo nessas metodologias de extração e quantificação.

As atualizações nas regulamentações sobre o monitoramento e lançamento de tais substâncias no ambiente são de caráter de urgência. Por fim, estudos são necessários para a obtenção de informações e uma melhor compreensão sobre as interações e efeitos que os antidepressivos podem vir a ocasionar no ambiente.

Referências

ALNAHAS, F. et al. Expired medication: Societal, regulatory and ethical aspects of a wasted opportunity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 787, 2020.

ÁLVAREZ-RUIZ, R.; PICÓ, Y. Analysis of emerging and related pollutants in aquatic biota. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 25, e00082, 2020.

ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B. Pulgas-de-água (Daphnia spp.). **Revista de Ciência Elementar**, v. 5, n. 4, p. 1–3, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR12713 de 05/2016.** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera) Aquatic. 4. ed. São Paulo, 2016.

BAKER, D. R.; BARRON, L.; KASPRZYK-HORDERN, B. Illicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: Chemical analysis and drug use estimates. **Science of the Total Environment**, v. 487, n. 1, p. 629-641, 2014.

BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 44, p. 8036–8059, 2011.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.

BARBOSA, M. O. et al. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. **Water Research**, v. 94, p. 257–279, 2016.

BELDEN, J. Introduction to ecotoxicology. In: POPE, C. N.; LIU, J. (Ed.). **Introduction to Interdisciplinary Toxicology: From Molecules to Man**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 381-393.

BEST, C. et al. Environmental levels of the antidepressant venlafaxine impact the metabolic capacity of rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 190-198, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BISESI, J. H.; BRIDGES, W.; KLAINE, S. J. Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. **Aquatic Toxicology**, v. 148, p. 130-138, 2014.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v. 66, n. 210, p. 78-95, 2018.

BONFILIO, R. et al. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012.

BONNEFILLE, B. et al. Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 131, p. 496-506, 2018.

BONNEFILLE, B. et al. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (Mytilus galloprovincialis) after diclofenac exposure. **Science of the Total Environment**, v. 583, p. 257-268, 2017.

BOOGAERTS, T. et al. Development and validation of an analytical procedure to detect spatio-temporal differences in antidepressant use through a wastewater-based approach. **Talanta**, v. 200, p. 340–349, 2019.

BOSSUS, M. C. et al. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod Echinogammarus marinus exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 46–56, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Atlas Esgotos**: Despoluição de Bacias Hidrográficas. Brasília, DF: ANA; Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2017. Disponível em: http://atlasesgotos.ana.gov.br/. Acesso em: 24 fev. 2021.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama 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 União**, Brasília, DF, n. 053, p. 58–63, 18 mar. 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 maio 2011.

BRASIL. Decreto nº 10.388, de 5 de junho de 2020. Regulamenta o § 1º do caput do art. 33 da Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, e institui o sistema de logística reversa de medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, de uso humano, industrializados e manipulados, e de suas embalagens após o descarte pelos consumidores. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 107-A, Seção 1 - Extra, p. 1, 05 jun. 2020.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Poder Legislativo**, Brasília, DF, n. 147, Seção 1, p. 3. 03 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria nº 238, de 31 de março de 2003, considerando o disposto no art.111, inciso II, alínea “a” § 3º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 6 de março de 2003, resolve: Art. 1º Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" anexo. Art. 2º Fica revogada a Resolução RE no 475, de 19 de março de 2002. Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.**Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 104,Seção 1, p. 106. 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 98, Seção 1, p. 93. 22 maio 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 141, Seção 1, p. 87. 25 jul. 2017.

BRINGOLF, R. B. et al. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 1311–1318, 2010.

BUNGAU, S. et al. Aspects of excessive antibiotic consumption and environmental influences correlated with the occurrence of resistance to antimicrobial agents. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 19, art. 100224, 2021.

BUNGAU, S.; BUNGAU, C.; TIT, D. M. Studies on the last stage of product lifecycle management for a pharmaceutical product. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, v. 16, n. 1, p. 56–62, 2015.

BURGOS-ACEVES, M. A.; FAGGIO, C. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: Physiology and molecular aspects. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 513–517, 2017.

BUSSY, U.; LI, K.; LI, W. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantitative bioanalyses of organic molecules in aquatic environment and organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9459–9479, 2016.

CAMPOS, B. et al. Depressing Antidepressant: Fluoxetine Affects Serotonin Neurons Causing Adverse Reproductive Responses in *Daphnia magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 11, p. 6000–6007, 2016.

CARDOSO-VERA, J. D. et al. A review of antiepileptic drugs: Part 1 occurrence, fate in aquatic environments and removal during different treatment technologies. **Science of the Total Environment**, v. 768, art. 145487, 2021.

CASTILLO-ZACARÍAS, C. et al. Antidepressant drugs as emerging contaminants: Occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. **Science of the Total Environment**, v. 757, art. 143722, 2021.

CASTRO, G. et al. Identification and determination of emerging pollutants in sewage sludge driven by UPLC-QTOF-MS data mining. **Science of the Total Environment**, v. 778, art. 146256, 2021.

ČELIĆ, M. et al. Extended suspect screening to identify contaminants of emerging concern in riverine and coastal ecosystems and assessment of environmental risks. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, pt. A, art. 124102, 2021.

CHEN, H. et al. Environmentally relevant concentrations of sertraline disrupts behavior and the brain and liver transcriptome of juvenile yellow catfish (Tachysurus fulvidraco): Implications for the feeding and growth axis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, art. 124974, 2021.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **CETESB inicia monitoramento de compostos anti-inflamatórios na água**. São Paulo, 12 jun. 2018. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/blog/2018/06/12/cetesb-inicia-monitoramento-de-compostos-anti-inflamatorios-na-agua/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

COSTA JUNIOR, I. L. et al. Optimisation of caffeine and antidepressants extraction from sediments and sewage sludge using experimental designs. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97, n. 10, p. 935–948, 2017.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, I. L.; PLETSCH, A. L.; TORRES, Y. R. Occurrence of antidepressant drugs in the environment - A review. **Revista Virtual de Quimica**, v. 6, n. 5, p. 1408-1431, 2014.

DAUGHTON, C. G.; RUHOY, I. S. Green pharmacy and pharmEcovigilance: Prescribing and the planet. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 211-232, 2011.

DE AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

DE CASTRO-CATALÀ, N. et al. Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate Gammarus pulex. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 406–414, 2017.

DE OLIVEIRA, N. R. et al. Review of national and international legal and regulatory mechanisms on the management of drugs and the residues thereof. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 2939–2950, 2019.

DING, J. et al. Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 102–109, 2017.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: RIMA, 2008. p. 153–184.

EHRHART, A. L. et al. Leftover drug disposal: Customer behavior, pharmacist recommendations, and obstacles to drug take-back box implementation. **Waste Management**, v. 118, p. 416–425, 2020.

EL-SHAHENY, R.; EL HAMD, M. A.; EL-MAGHRABEY, M. Liquid chromatography-mass spectrometry techniques for environmental analysis. In: INAMUDDIN, R. B.; ASIRI, A. M. **Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science**. Analytical Techniques for Environmental and Industrial Analysis. Amsterdam: Elsevier, 2021. Chap. 5, p. 117-141.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Implementing Decision. EU 2015/495 of 20 March 2015. Establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, Bruxels, L78/40, n. C1756, p. 20–30, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Directiva 2008/105/CE of the European Parliament and of the Council, December 16, 2008. On environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, Bruxels, L348/84, p. 14, 24 Dez. 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Directiva 2010/84/UE of the European Parliament and of the Council, December 15, 2010. Amending, as regards pharmacovigilance, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use Text with EEA relevance **Official Journal of the European Union**, Bruxels, n. 348, p. 74–99, Jan. 20, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. **Update on Progress and Implementation**: European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment. Brussels: European Union, 2020. 24 p. doi:10. 2779/037747.

FEKADU, S. et al. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 324–337, 2019.

FERHI, S. et al. Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 22, p. 6153–6168, 2016.

FERNANDES, M. J. et al. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. **Chemosphere**, v. 239, 2020.

FITZGERALD, P. J.; WATSON, B. O. In vivo electrophysiological recordings of the effects of antidepressant drugs. **Experimental Brain Research**, v. 237, n. 7, p. 1593–1614, 2019.

FONTANALS, N. et al. Role of solid-phase extraction in wastewater-based epidemiology. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 9, p. 26–33, 2019.

FORD, A. T.; FONG, P. P. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 794–798, 2016.

FUERTES, I. et al. Effects of Single and Combined Low Concentrations of Neuroactive Drugs on *Daphnia magna* Reproduction and Transcriptomic Responses. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 20, p. 11979–11987, 2019.

FUERTES, I.; PIÑA, B.; BARATA, C. Changes in lipid profiles in *Daphnia magna* individuals exposed to low environmental levels of neuroactive pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 733, p. 139029, 2020.

GOGOI, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169–180, 2018.

GÓMEZ-CANELA, C. et al. Analysis of neurotransmitters in *Daphnia magna* affected by neuroactive pharmaceuticals using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Environmental Pollution**, v. 254, part. B, art. 113029, 2019.

GONZÁLEZ PEÑA, O. I.; LÓPEZ ZAVALA, M. Á.; CABRAL RUELAS, H. Pharmaceuticals market, consumption trends and disease incidence are not driving the pharmaceutical research on water and wastewater. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, art. 2532, 2021.

GOTTSCHALL, N. et al. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. **Chemosphere**, v. 87, n. 2, p. 194–203, 2012.

GUPTA, S.; GUPTA, S. K. A critical review on water quality index tool: Genesis, evolution and future directions. **Ecological Informatics**, v. 63, art. 101299, 2021.

HAZELTON, P. D. et al. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 27–35, 2014.

HIEMKE, C.; HÄRTTER, S. Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, p. 11–28, 2000.

HÖGLUND, E.; ØVERLI, Ø.; ÅTLAND, Å. Assaying waterborne psychoactive drugs by the response to naturalistic predator cues in the stickleback (Gasterosteus aculeatus). **Science of the Total Environment**, v. 737, art. 140257, 2020.

HOSSAIN, M. S. et al. Environmentally relevant concentrations of methamphetamine and sertraline modify the behavior and life history traits of an aquatic invertebrate. **Aquatic Toxicology**, v. 213, art. 105222, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. rev. 5. Brasília, DF: INMETRO, Coordenação Geral de Acreditação, 2016. 31 p.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JIGYASA; RAJPUT, J. K. Persistent Veterinary Drug Residues in Environment: their source of origin, adverse effects, and early detection. In: SINGH, P.; HUSSAIN, C. M.; RAJKHOWA, S. (Ed.). **Management of Contaminants of Emerging Concern (CEC) in Environment**. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 179–204.

KAR, S. et al. Ecotoxicological assessment of pharmaceuticals and personal care products using predictive toxicology approaches. **Green Chemistry**, v. 22, p. 1458-1516, 2020.

KELLNER, M. et al. Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (Gasterosteus aculeatus). **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 19–28, 2016.

KIM, C. et al. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 629–645, 2018.

KRAEMER, S. A.; RAMACHANDRAN, A.; PERRON, G. G. Antibiotic Pollution in the Environment : From Microbial Ecology to Public Policy. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 180, 2019. Special Issue.

KŘESINOVÁ, Z. et al. Method for analysis of psychopharmaceuticals in real industrial wastewater and groundwater with suspended organic particulate matter using solid phase extraction disks extraction and ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectro. **Journal of Chromatography A**, v. 1440, p. 15–22, 2016.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, n. 1, p. 29–44, 2015a.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, n. 1, p. 8–28, 2015b.

KUMIRSKA, J. et al. Determination of twenty pharmaceutical contaminants in soil using ultrasound-assisted extraction with gas chromatography-mass spectrometric detection. **Chemosphere**, v. 232, p. 232–242, 2019.

LAJEUNESSE, A. et al. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. **Water Research**, v. 46, n. 17, p. 5600–5612, 2012.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.

LAZZARA, R. et al. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel Dreissena polymorpha. **Aquatic Toxicology**, v. 106–107, p. 123–130, 2012.

LI, W. et al. Antibiotic resistance genes and bacterial community dynamics in the seawater environment of Dapeng Cove, South China. **Science of the Total Environment**, v. 723, art. 138027, 2020.

LU, M. C. et al. Occurrence and treatment efficiency of pharmaceuticals in landfill leachates. **Waste Management**, v. 55, p. 257–264, 2016.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossitemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MEHDI, H. et al. Multiple Stressors in the Environment: The Effects of Exposure to an Antidepressant (Venlafaxine) and Increased Temperature on Zebrafish Metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 10, art. 1431, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.01431

MEJÍAS, C.; et al. Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: A review on their distribution and environmental risk assessment. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 30, e00125, 2021.

MELCHOR-MARTÍNEZ, E. M. et al. Antidepressants surveillance in wastewater: Overview extraction and detection. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 3, art. 100074, 2021.

MILLER, T. H. et al. Multicompartment and cross-species monitoring of contaminants of emerging concern in an estuarine habitat. **Environmental Pollution**, v. 270, art. 116300, 2021.

MONTEIRO, S. H. et al. Study of spatial and temporal distribution of antimicrobial in water and sediments from caging fish farms by on-line SPE-LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 51, n. 9, p. 634–643, 2016.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. DE M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 24–40, 1999.

NEWMAN, M. C. **Fundamentals of Ecotoxicology**. The Science of Pollution. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. Chap. 2, p. 33-98: Major Classes of Contaminants.

NUNES, C. N.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Are there pharmaceutical compounds in sediments or in water? Determination of the distribution coefficient of benzodiazepine drugs in aquatic environment. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 522–529, 2019.

OELKERS, K. Is the objective of the Water Framework Directive to deal with pollutant emissions at source coherently implemented by the EU's substance-specific legal acts? A comparison of the environmental risk control of pharmaceutical legislation with the REACH-, Bi. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 20, n. February, p. 100386, 2021.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OCDE. **Health at a Glance 2019**: OECD Indicators. Paris: OECD Publishing, 2019. doi: 10.1787/4dd50c09-en.

PAGANO, M. et al. Evaluation of functionality and biological responses of mytilus galloprovincialis after exposure to quaternium-15 (Methenamine 3-Chloroallylochloride). **Molecules**, v. 21, n. 2, art. 144, 2016.

PAGE, J. S. et al. Ionization and Transmission Efficiency in an Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Interface. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 9, p. 1582–1590, 2007.

PATEL, M. et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 6, p. 3510–3673, 2019.

PICÓ, Y. Chromatography–mass spectrometry: Recent evolution and current trends in environmental science. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 18, p. 47–53, 2020.

PINTO, G. M. F. et al. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 219–224, 2014.

QIAO, M. et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, v. 110, p. 160–172, 2018.

QUADRA, G. R.; et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200–1218, 2017.

QUEIROZ, S. **Tratado de toxicologia ocupacional**. 2. ed. São Paulo: Biblioteca 24 Horas, 2015.

RAMAKRISHNAN, A. et al. Emerging contaminants in landfill leachate and their sustainable management. **Environmental Earth Sciences**, v. 73, n. 3, p. 1357–1368, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAPOSO, F.; BARCELÓ, D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, art. 116068, 2021.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; SHOW, P. L. A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, art. 124413, 2021.

RAZZOUK, D. Venlafaxina e Interações Medicamentosas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, p. 4–9, 2014.

REINSTADLER, V. et al. Monitoring drug consumption in Innsbruck during coronavirus disease 2019 (COVID-19) lockdown by wastewater analysis. **Science of the Total Environment**, v. 757, art. 144006, 2021.

ROSI-MARSHALL, E. J. et al. Pharmaceuticals suppress algal growth and microbial respiration and alter bacterial communities in stream biofilms. **Ecological Applications**, v. 23, n. 3, p. 583–593, 2013.

SAIDULU, D. et al. A review on occurrences, eco-toxic effects, and remediation of emerging contaminants from wastewater: Special emphasis on biological treatment based hybrid systems. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, art. 105282, 2021.

SCOTT, J.; MINGHETTI, M. Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology. In: POPE, C. N.; LIU, J. (Ed.). **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 477-486.

SEHONOVA, P. et al. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 789–794, 2018.

SERRA-COMPTE, A. et al. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (Mytilus galloprovincialis). **Environmental Pollution**, v. 236, p. 824–834, 2018.

SILVA, J. S. et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 2, p. 409–418, 2015a.

SILVA, L. J. G. et al. Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. **Environmental Pollution**, v. 197, p. 127–143, 2015b.

SKEES, A. J. et al. Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 1457–1464, 2018.

SPINA, E.; PISANI, F.; DE LEON, J. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions of antiepileptic drugs with new antidepressants and new antipsychotics. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 72–86, 2016.

STEELE, W. B. et al. Comparative behavioral toxicology with two common larval fish models: Exploring relationships among modes of action and locomotor responses. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1587–1600, 2018.

TKACZYK, A. et al. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. **Science of the Total Environment**, v. 763, art. 143038, 2021.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotocology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151–173, 1977.

ULLAH, R. et al. Taxonomic diversity of antimicrobial-resistant bacteria and genes in the Red Sea coast. **Science of the Total Environment**, v. 677, p. 474–483, 2019.

USEPA. **Contaminant Candidate List 5 (CCL 5)**. Washington, DC, 2018. Disponível em: <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-5-ccl-5>. Acesso em: 20 abr. 2021.

VALENTI, T. W. et al. Human therapeutic plasma levels of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) sertraline decrease serotonin reuptake transporter binding and shelter-seeking behavior in adult male fathead minnows. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 2427–2435, 2012.

WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. 386 p.

WANG, M.; ZHANG, Y.; GUO, P. Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of Microcystis flos-aquae. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 67–76, 2017.

WANG, S.; XU, Z. Effects of dihydroartemisinin and artemether on the growth, chlorophyll fluorescence, and extracellular alkaline phosphatase activity of the cyanobacterium microcystis aeruginosa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–14, 2016.

WANG, Y. et al. Bioaccumulation behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a constructed wetland. **Chemosphere**, v. 222, p. 275–285, 2019.

WÖHLER, L. et al. Alternative societal solutions to pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, art. 124350, 2020.

YANG, H. et al. Molecular and behavioral responses of zebrafish embryos/larvae after sertraline exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, art. 111700, 2021.

YANG, Z. et al. Aquatic ecotoxicity of an antidepressant, sertraline hydrochloride, on microbial communities. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 129–134, 2019.

YING, G. G. et al. Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (surface water and sediment). **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 62, p. 453-5572, 2013.

ZHENG, X. et al. Environmental chemicals affect circadian rhythms: An underexplored effect influencing health and fitness in animals and humans. **Environment International**, v. 149, art. 106159, 2021.

ZHENG, Y. Z.; WANG, S. Advances in antifungal drug measurement by liquid chromatography-mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 491, p. 132–145, 2019.

4. OCORRÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS RESIDUAIS EM AMOSTRAS DO RIO PIRACICABA (SP)

Resumo

Os antidepressivos são produtos farmacêuticos considerados micropoluentes e podem provocar mudanças comportamentais que afetam a dinâmica das populações em baixas concentrações. Após a administração, grande parte dessas substâncias são excretadas inalteradas ou como metabólitos ativos. O objetivo deste estudo foi adaptar e validar uma metodologia baseada em extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (HPLC-MS/MS) para analisar e monitorar os antidepressivos venlafaxina, citalopram, fluoxetina e sertralina em amostras de água coletadas em quatro pontos Rio Piracicaba no decorrer de sete dias consecutivos durante período de estiagem. O processo de validação foi realizado de acordo com os critérios de órgão regulador, a Anvisa. O método apresentou exatidão (76-119,8%) e precisão (DPR < 15%) aceitáveis, alta seletividade, e os LDs e LQs demostram que o método é sensível. Todos os antidepressivos estudados foram detectados neste trabalho na faixa de concentração de 1,0 a 4,48 ng L^{-1}. Em alguns pontos foi detectada a presença contínua de antidepressivos. A fluoxetina e a sertralina foram os compostos que tiveram detecções mais frequentes. Espera-se que este estudo possa servir como base norteadora para a inclusão na legislação brasileira do monitoramento de fármacos no ambiente aquático.

Palavras-chave: Água Superficial; Antidepressivos; Validação Analítica; HPLC-MS/MS

Abstract

Antidepressants are pharmaceutical products considered to be micropollutants and can cause behavioral changes that affect families' dynamics in casualties. After administration, most of these substances are excreted unchanged or as active metabolites. The objective of the study was to adapt and validate a methodology based on solid phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer with electrospray ionization source (HPLC-MS / MS) to analyze and monitor antidepressants venlafaxine, citalopram, fluoxetine and sertraline in water collected in four different spots of the Piracicaba River over seven consecutive days during the drought season. Validation process was carried out according to the criteria of the regulatory agency, Anvisa. The method demonstrated acceptable accuracy (76-119.8%) and precision (DPR <15%), high selectivity, and the LDs and LQs shows that the method is sensitive. All the antidepressants analyzed were detected in the concentration range of 1.0 to 4.48 ng L-1. In some places, the continuous presence of antidepressants was detected. Fluoxetine and sertraline were the compounds that had the most frequent detections. We hope that this study could serve as a guiding basis for the inclusion in the Brazilian legislation of drugs monitoring in aquatic environment.

Keywords: Surface Water; Antidepressants; Analytical Validation; HPLC-MS / MS

4.1. Introdução

O crescimento populacional gera um aumento na demanda por serviços e produtos, aliado a tal fator estão os avanços da ciência na área da saúde, bem como as pesquisas de novos tratamentos. Estes aspectos, resultaram na expansão de processos para desenvolvimento de novos compostos e quantidade de medicamentos disponíveis para comercialização e consumo (COSTA JUNIOR et al., 2014; PINTO et al., 2014).

Os medicamentos são substâncias químicas desenvolvidas para serem biologicamente ativas, com o intuito de gerar respostas fisiológicas em humanos, animais e plantas (LIMA et al., 2017). São indispensáveis para a manutenção da saúde pública e da qualidade de vida. Após a administração, grande parte dos fármacos é excretada inalterada ou como metabólito ativo (CARACCIOLO et al., 2015). Os principais meios de entrada dos fármacos no ambiente são os esgotos domésticos bruto e tratado, descarte inadequado de medicamentos em lixo domiciliar e indústrias (PINTO et al., 2014).

As descargas de efluentes em águas superficiais e a aplicação de lodo de esgoto na agricultura, expõem a vida silvestre terrestre e aquática aos fármacos (BEAN et al., 2014). A ausência de saneamento básico leva a poluição dos recursos hídricos, pois ocorre o descarte de esgoto *in natura* em corpos d'água (EVANGELISTA et al., 2020). As estações de tratamento de esgoto (ETEs) não são projetadas para remoção desses compostos. Em uma ETE os mecanismos envolvidos no processo de remoção dos fármacos são: sorção, biodegradação, transformações químicas, fotodegradação e volatilização (AQUINO et al., 2013).

Ao chegarem no ambiente, os fármacos estão amplamente diluídos, porém sabe-se que estas substâncias podem provocar impactos ambientais generalizados por serem produzidas para desencadear grandes efeitos biológicos em concentrações extremamente baixas (ESCUDERO et al., 2021; GUNNARSSON et al., 2019). Alguns fármacos se degradam rapidamente no meio ambiente, enquanto outros são resistentes (ESCUDERO et al., 2021), tal dinâmica irá depender das propriedades específicas de cada substância tais como, estabilidade química, biodegradabilidade, solubilidade em água e coeficientes de absorção/adsorção (GAFFNEY et al., 2014).

Assim, os fármacos possuem alguns atributos que determinam seu risco ambiental, como a sua persistência, potencial de bioacumulação e toxicidade (ESCUDERO et al., 2021; KÜSTER; ADLER, 2014; MOERMOND et al., 2011).

Os antidepressivos são uma categoria dos fármacos psiquiátricos e são subdivididos de acordo com seu mecanismo de ação farmacológica em: inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), inibidores seletivos da recaptação da serotonina-norepinefrina (ISRSNs), antidepressivos tricíclicos (ADTs) e inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), inibidores da recaptação da norepinefrina-dopamina (IRND) e antagonistas do receptor NMDA. Em que, os ISRSs são os mais prescritos (FITZGERALD; WATSON, 2019).

A Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2019 aponta um crescimento de 34,2% nos casos de depressão no Brasil se comparado a 2013 (IBGE, 2019). No ano de 2020, tais dados foram acrescidos pelo aumento no consumo de antidepressivos no país, que foi de 14% se comparado ao ano anterior, devido a recente pandemia de COVID-19, a qual afetou a saúde mental da população, levando a um aumento no número de pessoas com episódios depressivos (CFF, 2020). Diante deste cenário, estima-se que ocorra um aumento constante na prescrição e consumo de antidepressivos no país e, por consequência, sua detecção nas matrizes ambientais. Dessa forma é necessário o monitoramento preciso dessas substâncias, abrangendo todo o ciclo da água (CASTILLO-ZACARÍAS et al., 2021).

Os antidepressivos podem provocar mudanças comportamentais que afetam a dinâmica das populações em concentrações mais baixas, pois agem nos diferentes neurotransmissores envolvidos na regulação do humor (BEAN et al., 2014; MARTIN et al., 2020; WILLE et al., 2008). Diversos estudos já detectaram a presença dessas substâncias em matrizes ambientais (BLAIR et al.; 2013; FERNANDES et al., 2020; GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2018; SCHULTZ; FURLONG, 2013; SCHULTZ et al., 2010; SHENG et al., 2014). Os antidepressivos podem exercer impactos ecotoxicológicos no ambiente aquático podendo bioacumular em organismos não alvo, como peixes, moluscos mexilhões, algas, crustáceos e caramujos.

Dentre as perturbações já relatadas em estudos encontram-se: alteração no comportamento e mobilidade espacial, diminuição dos parâmetros de reprodução, modificação no tamanho do organismo, alteração nos níveis de hormonais, alteração genes responsáveis pela construção do cérebro, mudanças no

comportamento alimentar e variações nos instintos de sobrevivência (ARNNOK et al., 2017; EBELE et al., 2017; HAZELTON et al., 2014; SCHULTZ et al., 2010).

Assim, o uso crescente de antidepressivos, bem como as crescentes detecções ambientais encontradas, justificam avaliações sobre seus riscos ambientais, que devem incluir seu monitoramento e uma avaliação dos efeitos potenciais de misturas ambientalmente relevantes (GUNNARSSON et al., 2019; MARTIN et al., 2020).

A detecção de fármacos no ambiente depende da aplicação de metodologias analíticas robustas, que requerem a capacidade de determinar simultaneamente uma série de substâncias, com diferentes propriedades físico-químicas, dentro de matrizes ambientais que compreendem comparativamente altas concentrações de compostos orgânicos complexos (MONTAGNER et al., 2017; PETRIE et al., 2012).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais utilizada para a detecção de antidepressivos em amostra ambientais (FERNANDES et al., 2020; GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2018; SHENG et al., 2014), em função da sua possibilidade de detectar baixos níveis de concentrações na faixa de ng L^{-1} a µg L^{-1}, e a confirmação estrutural dos poluentes – sobretudo quando está em série com detector massas (MS/MS) (COSTA JUNIOR et al., 2014).

Com base nas informações supracitadas, o objetivo deste trabalho foi adaptar e validar uma metodologia baseada em extração em fase sólida (SPE) e HPLC-MS/MS para analisar e monitorar os antidepressivos venlafaxina, citalopram, fluoxetina e sertralina em amostras de água coletadas em quatro pontos Rio Piracicaba, na cidade de Piracicaba, SP, Brasil, no decorrer de sete dias consecutivos durante período de seca.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Área de estudo

O Rio Piracicaba nasce em Americana, SP, através da junção dos rios Jaguari e Atibaia e percorre cerca de 250 km, passando pelo município de Piracicaba, até desaguar na margem direita do Rio Tietê, entre os municípios paulistas de Santa Maria da Serra e Barra Bonita, SP. Ao longo de sua extensão recebe a carga poluente de inúmeros rios e ribeirões que nele deságuam, assim como lançamentos diretos de

cargas poluentes (AGÊNCIA DAS BACIAS PCJ, 2018; IBGE, 2019; MELLER et al., 2012).

As principais atividades econômicas que acontecem no entorno do Rio Piracicaba são a agropecuária e a produção industrial, como o parque têxtil em Americana, Nova Odessa e Santa Bárbara d'Oeste e indústrias sucroalcooleiras e do setor metal-mecânico em Piracicaba (SIGRH, 2019).

Os quatro pontos de coleta definidos estão concentrados no munícipio de Piracicaba, SP – cidade com 364.571 habitantes, segundo o último censo realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021) – localizados nas proximidades de uma ETE (P3 e P4), uma região bem adensada (P2) e em região próxima à foz do tributário Ribeirão Tijuco Preto, este que igualmente recebe carga de uma ETE (P1) (Figura 4.1).

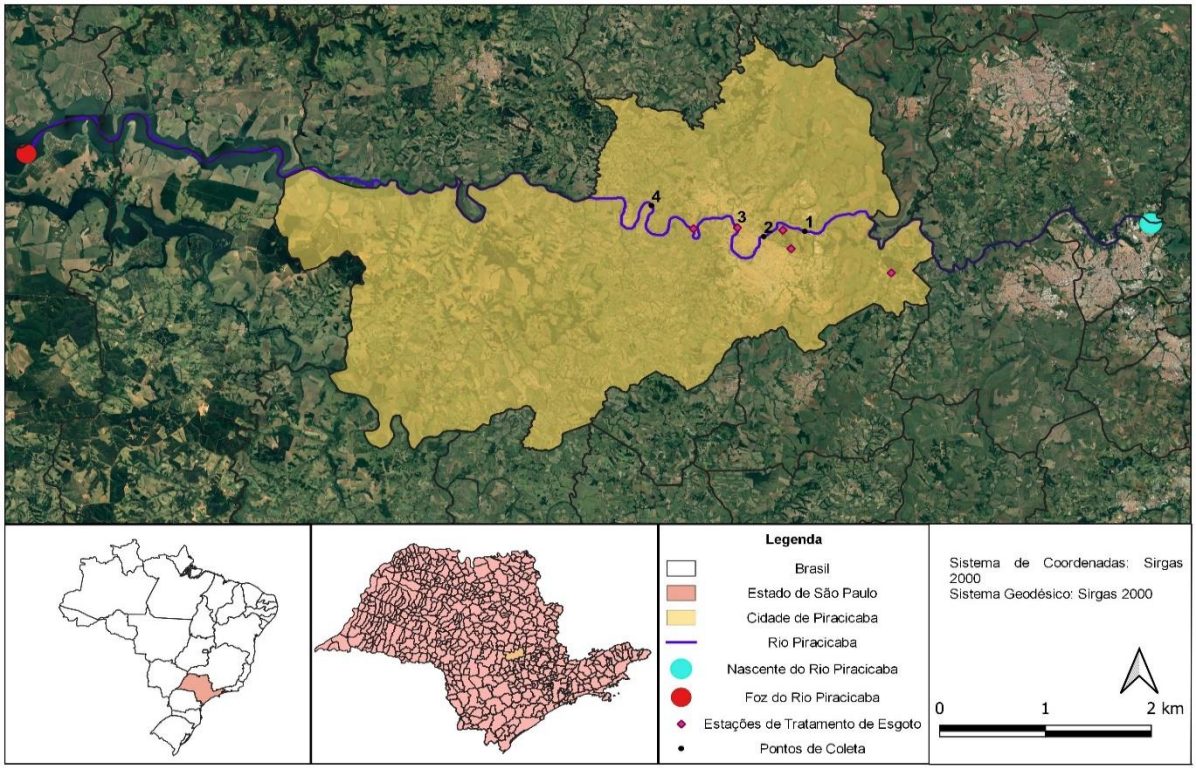


Figura 4.3 - Localização dos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4 na cidade de Piracicaba, SP (Fonte: Autoria Própria)

4.2.2. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em 4 pontos do Rio Piracicaba na cidade de Piracicaba, SP (Figura 4.1 e Tabela 4.1). As coletas foram realizadas no período de 7 dias consecutivos entre 3 a 9 de setembro de 2020. Em cada ponto, as amostras foram coletadas em triplicada, totalizando durante toda a campanha de coleta 84 amostras.

Tabela 4.1 - Locais dos pontos de coletas e suas respectivas coordenadas geográficas

Local	Coordenadas	ETE próxima
Anel Viário Municipal Comendador Leopoldo Dedini (P1)	22°41'21.0"S 47°34'59.9"O	ETE Tupi
Avenida Armando Dedini (P2)	22°42'20.3"S 47°38'48.7"O	ETE H e ETE Piracicamirim
Avenida Investigador Lucídio Leite (P3)	22°41'46.7"S 47°40'18.3"O	ETE Ponte do Caixão

Foram adotados os procedimentos estabelecidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2011) e o método EPA-1694 (2007) para o armazenamento, preservação e validade das amostras em que, para a conservação das mesmas foram utilizados frascos de vidro âmbar de 1 litro previamente descontaminadas com sabão alcalino, sendo posteriormente lavados com água corrente, água deionizada e acetona.

Na amostragem, a coleta de água foi superficial e ocorreu entre 0 e 30 centímetros da lâmina d'água. Os frascos foram previamente lavados com água do rio e preenchidos completamente para minimizar o contato entre a água e o ar. Após a coleta, o material foi refrigerado e armazenado em caixa de material isotérmico e enviado para o laboratório para início das análises.

4.2.3. Reagentes e materiais

Os antidepressivos venlafaxina (VEN), citalopram (CIT), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER) foram obtidos na forma de padrões de referência para farmácias de manipulação com pureza de 99,98% (*Fragon*, Holanda*).*

Todos os solventes orgânicos e aditivos da fase móvel, utilizados na extração e eluição possuíam grau de pureza LCMS: acetonitrila (ACN) (*MTedia*, EUA), metanol (MeOH) (*MTedia*, EUA), água ultrapura (*Pura-Q*, Brasil), ácido fórmico (*J.T. Baker*, EUA) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (*Mallinckrodt*, Irlanda). Para filtragem das amostras foi utilizado filtro de membrana politetrafluoretileno de 0,47 e 0,2 *µ*m (*Advantec*, Japão).

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida *Agilent* modelo 1200 acoplado a um espectrômetro de massas *Triple QuadAgilent* modelo 6410 (*Agilent Tchnologies*, Palo Alto, EUA). O conjunto cromatográfico é composto de uma bomba binária, amostrador automático e um compartimento com controle de temperatura da coluna. O sistema triplo quadrupolo (QQQ) é formado por uma fonte de ionização *electrospray* (ESI). Os instrumentos foram controlados por meio do *software Mass Hunter*.

4.2.4. Protocolo de extração

No procedimento de extração em fase sólida (SPE) foi utilizado uma bomba peristáltica (*Ismatec* IPC, SWI), que proporcionou fluxo constante durante o experimento, e um cartucho *Bond Elut C18* (500 mg, 6 mL) da *Agilent Technologies*. O protocolo de extração seguiu a metodologia de Reis et al. (2019) com adaptações. Em que resumidamente o cartucho foi adequado com 5 mL MeOH, 5 mL H_2O ultrapura. Em seguida as amostras de 0,5 L - previamente filtradas em filtro de membrana (0,47 e 0,2 *µm*) e acidificadas a pH 2 com H_2SO_4 (5%) - foram passadas através do cartucho para concentração dos analitos de interesse. O fluxo utilizado foi de 5 mL min^{-1} constante de amostra e secagem sob vácuo durante aproximadamente 20 minutos em sistema múltiplo de vácuo (*Vacuubrand*, DEU). A lavagem foi realizada com 2 x 5 mL de MeOH. Os extratos foram coletados, secos em nitrogênio e ressuspendidos em água acidificada com 0,1% ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 0,1% ácido fórmico na proporção de 80% e 20% respectivamente.

4.2.5. Condições cromatográficas

As soluções estoque dos analitos, foram preparadas em MeOH na concentração de 1000 µg mL^{-1}, conservadas a -20º C e renovadas a cada 3 meses. A solução de trabalho foi preparada a partir das soluções estoque, em água ultrapura

contendo todos os antidepressivos, em quantidades apropriadas de cada solução, na concentração de 100 µg mL^{-1} para as fortificações.

Os parâmetros de separação partiram do estudo de Kim (2019) com algumas adaptações. Os analitos foram separados em uma coluna *Syncronis* C18 (4,6 mm x 50 mm; 3 µm, *Thermo Scientific*) a uma temperatura de 40 ºC com injeção de 25 µL. A eluição foi realizada através de gradiente que consiste em Fase Móvel A, água acidificada com 0,1% ácido fórmico e Fase Móvel B, acetonitrila acidificada com 0,1% ácido fórmico. A vazão foi de 0,7 mL min^{-1}, iniciando com 80% A e 20% B; em 1,8 minutos 35% A e 65% B; no minuto 2,20 25% A e 75% B; retornando à condição inicial de 80% A e 20% no minuto 2,21, permanecendo nessa condição no *post time* de 3 minutos, totalizando um tempo de corrida de 9 minutos.

4.2.6. Condições das análises no espectrômetro de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas utilizando um Espectrômetro Triplo Quadrupolo 6410 com interface ESI (*electrospray ionization*), operada no modo positivo de ionização. O gás utilizado foi o nitrogênio. Os parâmetros da fonte de íons foram definidos da seguinte forma: o fluxo do gás de secagem foi de 10 L min^{-1}; temperatura de 350 ºC; gás de nebulização, 50 psi e a voltagem do capilar a 4000V. Utilizou-se o modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para identificar e quantificar as transições iônicas dos compostos de estudo. Para o processamento de dados foi utilizado o *software Agilent Mass Hunter* versão B.02.01 beta (*Agilent Technologies*, Palo Alto, EUA).

4.2.7. Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz (EM) sob a sensibilidade do método analítico foram obtidos extratos das amostras de água, coletados em uma nascente (22º47’34.13”S 47º45’12.01”O), Piracicaba, SP. A curva de calibração foi preparada nas concentrações de 1 ng mL^{-1}; 2,5 ng mL^{-1}; 5,0 ng mL^{-1}; 10 ng mL^{-1} e 50 ng mL^{-1}, cada ponto em triplicata, usando a solução de extrato de matriz para dissolver os padrões analíticos em cada nível de concentração, enquanto outra curva de calibração foi feita usando a fase móvel (80% água acidificada com 0,1% ácido fórmico, e 20% acetonitrila acidificada com 0,1% ácido fórmico).

Para análise dos dados foi efetuada uma comparação entre os coeficientes angulares, para tal, foi efetuada a razão entre o coeficiente angular da matriz e do solvente. Foi realizado o teste F Snedecor para comparação de variâncias entre o solvente e a matriz. E, por fim, foi aplicado um teste t para comparação das médias no nível de significância de 95%.

4.2.8. Validação

Os parâmetros da validação analítica foram efetuados de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017).

A seletividade foi avaliada pelo detector espectrômetro de massas, que comparou o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, onde efetuou-se a fragmentação dos íons de interesse, além da comparação dos tempos de retenção.

A linearidade foi verificada utilizando 5 (cinco) concentrações diferentes de 1,0; 2,5; 5,0; 10; e 50 ng mL^{-1} em triplicata, preparadas de maneira independente, diluídas a partir da solução de trabalho. Os critérios de linearidade para aceitação da curva foram os coeficientes de correlação e a equação da reta (y = ax +b). Para a avaliação da linearidade foi aplicada a análise de regressão com análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança usando *software* estatístico Minitab 19.2020.1. A ausência de outliers foi demonstrada em cada, nível de concentração pelo teste de Grubbs (MILLER; MILLER, 2010).

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetibilidade com as amostras sob as mesmas condições de operação - mesmo analista, instrumentação e uma única corrida analítica. Foram utilizadas sete réplicas a 100% da concentração de 5 ng mL^{-1} individualmente preparadas. Além da repetibilidade foi analisada a precisão intermediária, nas mesmas condições, em 3 (três) dias distintos. A análise foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme Equação (1).

$$DPR = \frac{DP}{\bar{x}} \,.\, 100 \qquad (1)$$

Em que DP é o desvio padrão e $\bar{x}$ a concentração média determinada.

A exatidão foi verificada a partir de três concentrações que contemplam o intervalo linear do método analítico 1,0 ng mL^{-1} (baixa), 5,0 ng mL^{-1} (média) e 50,0 ng mL^{-1} (alta), com cinco réplicas em cada nível. As amostras foram preparadas de maneira independente, diluídas a partir de uma mesma solução estoque. Após a fortificação nas concentrações conhecidas, as amostras foram submetidas ao processo de extração. A recuperação foi calculada de acordo com a Equação (2).

$$Recuperação = \frac{CA_{(amostra\ adicionada)} - CA_{(amostra)}}{CTA} \qquad (2)$$

Onde CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado.

O teste do filtro foi realizado com a finalidade analisar a retenção ou não dos fármacos no filtro. Foi utilizada a concentração de 5,0 ng mL^{-1} (média) com sete réplicas em cada nível, em que as amostras foram fortificadas de maneira independente, diluídas de uma mesma solução estoque antes da realização da filtração. Após fortificação, as amostras foram filtradas em membrana politetrafluoretileno de 0,47 e 0,2 μm. A recuperação foi calculada de acordo com a Equação (2). Foi realizado um teste t no nível de significância de 95% para verificar se houve diferença estatística significativa entre os valores de recuperação obtidos no teste de filtração.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir das Equações (3) e (4), usando os dados das curvas de calibração.

$$LD = \frac{3{,}3\ \sigma}{b} \qquad (3)$$

$$LQ = \frac{10\ \sigma}{b} \qquad (4)$$

No qual b é o coeficiente angular e σ o desvio padrão do intercepto.

A robustez do método foi testada efetuando a injeção das concentrações 1,0 ng mL^{-1} (baixa), 5,0 ng mL^{-1} (média) e 50,0 ng mL^{-1} (alta), com cinco réplicas em cada nível, efetuando a diminuição e aumento na temperatura da coluna e no fluxo da fase móvel 10%. A análise foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme Equação (1).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Condições das análises no espectrômetro de massas

As substâncias foram otimizadas para a obtenção das melhores condições de abundância dos fragmentos. Como parâmetros foram utilizados o íon precursor, a energia de fragmentação, o íon produzido e a energia de colisão. A polaridade ocorreu no modo positivo. Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 4.2, bem como o tempo de retenção dos compostos.

Tabela 4.2 - Parâmetros do íon precursor, energia de fragmentação, íon produzido e a energia de colisão de antidepressivos

Antidepressivos	Íon precursor	Energia de Fragmentação (V)	Íon produzido	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção
VEN	278,2	65	147,2	18	4,505
CIT	325,2	15	262,2	18	5,133
FLU	310,1	70	148,0	2	5,346
SER	307,1	85	275,8	4	5,372

4.3.2. Efeito matriz

O EM pode ser definido como a combinação de efeitos em todos os componentes de uma amostra, com exceção do analito de interesse, no processo de quantificação. No caso de um componente específico ser identificado como causador de um efeito, tem-se uma interferência (CORTESE et al., 2020).

O EM pode resultar na supressão ou no aumento de sinal do analito, durante a ionização por *electrospray*, o que pode gerar resultados errôneos (GROS et al., 2006; TANG; KEBARLE, 1991; XIAO et al., 2008). Assim, sua avaliação ao longo do processo de quantificação dos compostos é um significativo parâmetro a ser analisado no decorrer do desenvolvimento e validação de um método analítico (CASSIANO et al., 2009; GROS et al., 2006).

Alguns procedimentos para redução do EM abrangem extração seletiva e uma limpeza eficaz da amostra após a extração, porém, tais soluções podem não ser as mais adequadas, visto que levam a perdas de analito. Assim, outros métodos utilizados para diminuir o EM, consistem no uso de abordagens de calibração adequadas, tais como calibração externa usando amostras matriciais, adição de padrão ou padrão interno, bem como a diluição de extratos de amostra (CORTESE et al., 2020; GROS et al., 2006). Para este estudo foi utilizado a calibração externa usando amostras matriciais.

Na análise de fármacos em matrizes ambientais, o EM tem se demostrado uma adversidade que deve ser considerada para cada tipo de substância, bem como para cada tipo de matriz analisada. Tal fator ocorre devido à variabilidade das propriedades físico-químicas e à complexidade das matrizes. A água é considerada uma matriz simples, porém interferentes como ácidos húmicos e fúlvicos podem resultar em EM (EVANGELISTA et al., 2020; TORRES et al., 2017). A Tabela 4.3 mostra os dados obtidos referente ao efeito matriz.

Tabela 4.3 - Características de calibração do efeito matriz

Antidepressivo	Dados de calibração				Relação Coeficiente angulares	Teste F Snedecor	Teste t
	R^2		Coeficientes angulares				
	Solvente	Matriz	Solvente	Matriz			
VEN	0,999	0,991	3045	3395	0,89	0,80	-6,90
CIT	0,999	0,997	12394	7073	1,75	3,06	2,43
FLU	0,996	0,996	31872	19829	1,61	2,58	2,39
SER	0,995	0,995	2959	1118	2,65	6,97	2,61

$t_{crítico}$ (0,05; 28) = 2,048

Para todos os antidepressivos foram obtidos diferentes coeficientes angulares nas curvas preparadas. Conforme pode-se visualizar na Figura 4.2, ocorreu diferenças entre as inclinações das curvas dos analitos quando as soluções foram preparadas nos extratos da matriz e no solvente orgânico. Em que, nesta analogia, os componentes da matriz colaboram para inserir erros sistemáticos nos resultados, tais erros podem ser proporcionais e contínuos (COSTA JÚNIOR et al., 2020).

Os coeficientes de determinação (R^2) de todas as curvas tanto do solvente como na matriz ficaram acima de 0,990, o qual é estipulado pela Anvisa (2017). A razão entre os coeficientes angulares da matriz e do solvente ficou abaixo de 1 para venlafaxina, mas para as outras substâncias os valores foram superiores a 1. A supressão do sinal na presença da matriz para compostos analisados foi de 89% VEN, 175% CIT, 161% FLU e 265% SER. Segundo Costa Júnior (2020) quando a proporção entre os coeficientes angulares é superior a 1 indica um efeito positivo da matriz, isto é, a sensibilidade analítica se eleva na presença dos elementos da matriz para os antidepressivos deste estudo.

A comprovação do efeito matriz ocorreu por meio da aplicação do teste t e do teste F. Em que, ao nível de significância de 95% e os graus de liberdade iguais a 28 o valor de t corresponde a $t_{crítico}$ (0,05; 28) = 2,048. O valor de $t_{calculado}$ para VEN ficou abaixo do $t_{crítico}$. Porém, para as outras substâncias os valores foram superiores ao $t_{crítico}$. Em nível de significância de 95% e os graus de liberdade iguais a 14, o valor de F corresponde a $F_{crítico}$ (0,05; 14; 14) = 2,48. De todas substâncias estudadas apenas a VEN teve seu valor de F abaixo do $F_{crítico}$. Dessa forma, as comparações foram consideradas estatisticamente diferentes (exceto a venlafaxina). Assim, para quantificação dos antidepressivos no Rio Piracicaba foi efetuada a calibração externa usando amostras matriciais.

Na validação de alguns fármacos incluindo a VEN, CIT, FLU e SER em águas de rio, Paíga et al. (2017) obteve para VEN o menor valor de EM, os outros compostos CIT, FLU e SER o EM foi mais pronunciado com uma supressão iônica marcada. No estudo Fernandes et al. (2020) nas águas do rio todos antidepressivos apresentaram sinal de supressão iônica, onde a VEN e a trazona apresentaram o sinal mais baixo observado.

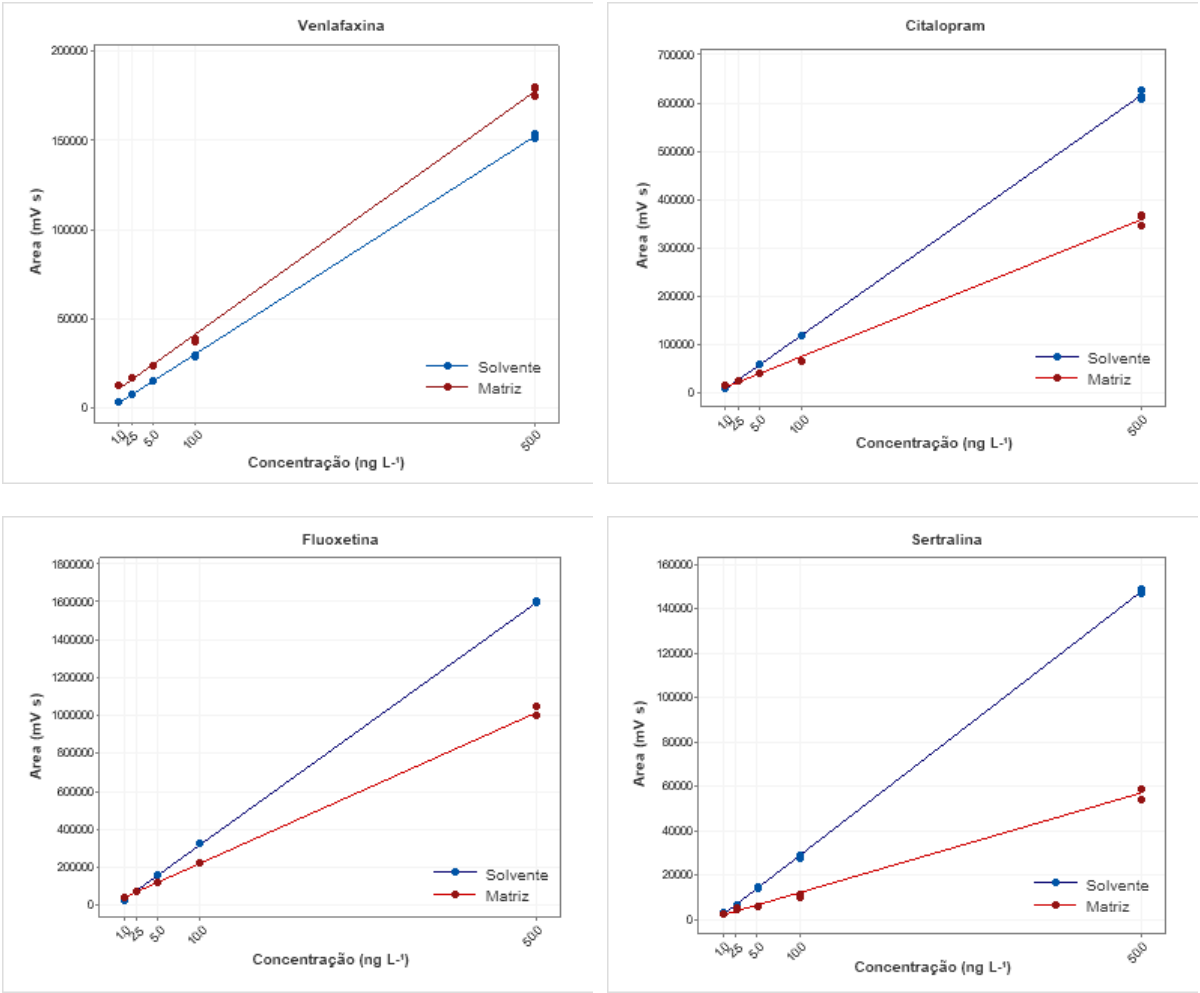


Figura 4.2 - Curva de calibração entre matriz (água) e solvente para a VEN, CIT, FLU, SER

4.3.3. Validação

Em relação a seletividade não foram verificados interferentes - os cromatogramas obtidos não apresentaram pico na região de determinação dos analitos. Demonstrando assim que o método apresentou alta seletividade. Na Figura 4.3 é possível observar o cromatograma resultante do extrato da matriz e os cromatogramas para a concentração de 50 ng mL^{-1}.

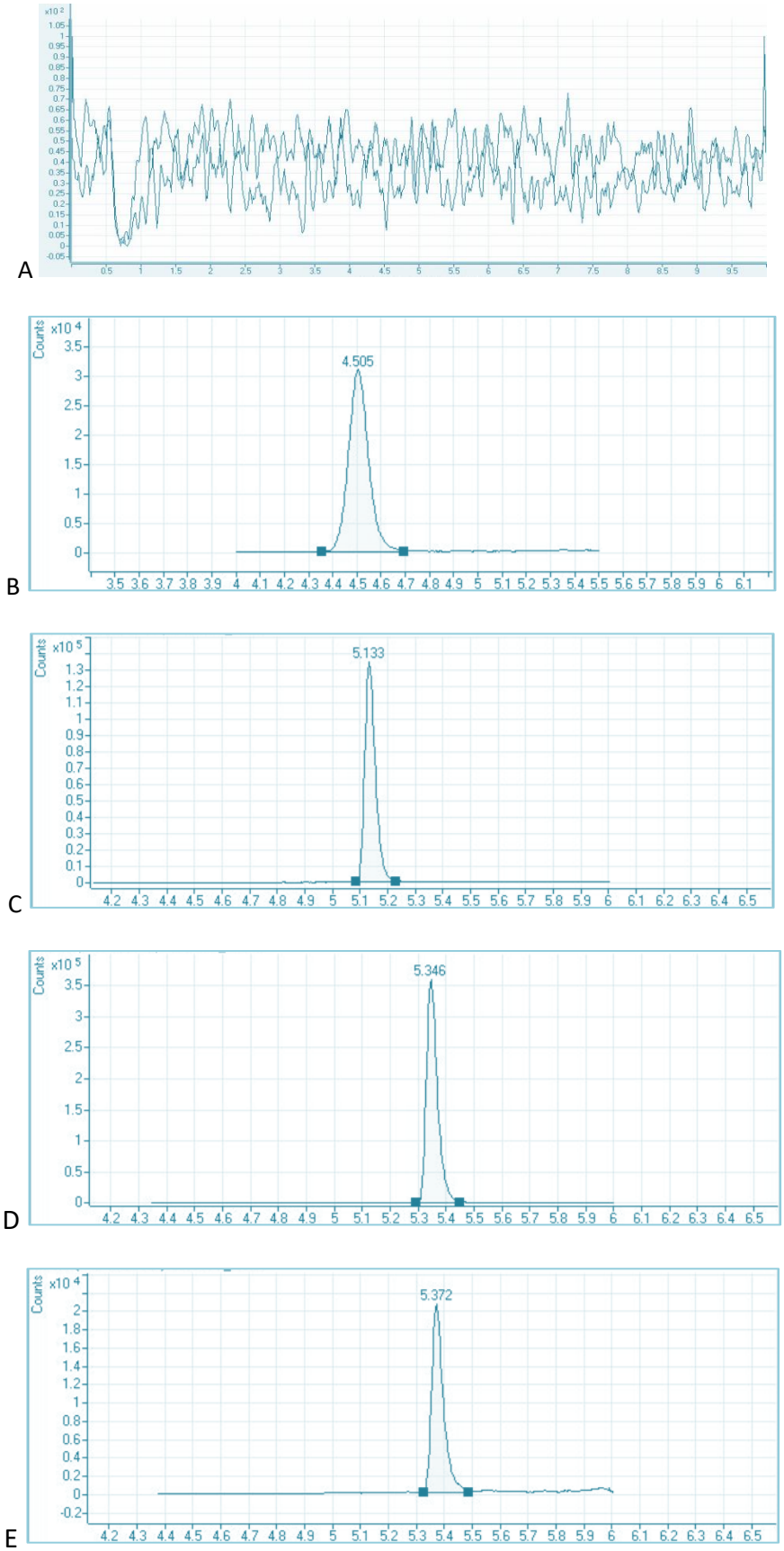


Figura 4.4 - Cromatogramas dos antidepressivos A) Sem analito (branco); B) VEN min 4,505; C) CIT min 5,133; D) FLU min 5,346; E) SER min 5,372 na concentração de 50 ng mL^{-1}

Na análise da linearidade foi verificado que a resposta do método na faixa de trabalho estudada foi adequada para todos os antidepressivos, conforme demonstrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Análise da linearidade da validação do método analíticos para antidepressivos

Antidepressivo	Regressão				Falta de ajuste	
	Equação	R^2	$F_{calculado}$	p-valor	$F_{calculado}$	p-valor
VEN	y = 3395x+7336	0,991	12725,77	0	2,2	0,151
CIT	y = 7073x + 5757	0,997	5578,06	0	0,32	0,812
FLU	y = 19829x + 27097,55	0,996	17756,42	0	0,18	0,905
SER	y = 1118,04x + 1465,37	0,995	2592,83	0	2,57	0,113

$F_{crítico}$ da regressão (0,05; 1;13) = 4,67; $F_{crítico}$ da falta de ajuste (0,05; 3; 10) = 3,71

As equações obtidas pelo método dos mínimos quadrados apresentaram excelentes coeficientes de determinação com $R^2 \geq 0,990$ que é estipulado pela Anvisa (2017), indicando boa aderência ao modelo linear para todas substâncias estudadas. Os valores de $F_{calculado}$ da regressão de todos os antidepressivos foram superiores ao valor crítico - $F_{crítico}$ da regressão (0,05; 1;13) = 4,67 - tanto nas faixas alta quanto na baixa, indicando que as regressões são estatisticamente válidas. Os valores F, obtidos para o teste de falta de ajuste, foram inferiores ao valor crítico - $F_{crítico}$ da falta de ajuste (0,05; 3; 10) = 3,71 – e os valores de p para a falta de ajuste foram superiores a 0,05. Portanto, regressões foram consideradas aceitáveis, pois o modelo linear descreve as correlações entre as áreas dos picos e as concentrações nas faixas avaliadas satisfatoriamente.

Os limites de detecção e quantificação do método variaram de 0,03 a 0,33 ng mL^{-1} e de 0,08 a 0,99 ng mL^{-1}, respectivamente (Tabela 4.5), e estão de acordo com a faixa linear de trabalho. Estes valores demostram que o método analítico desenvolvido possui boa sensibilidade.

O desenvolvimento e validação de metodologia UHPLC-MS / MS para estudo de antidepressivos e antibióticos, incluindo VEN, CIT, FLU e SER, em águas de rio apresentou LD de 0,575 ng L^{-1} e LQ de 1,93 ng L^{-1} para VEN; LD de 0,50 ng L^{-1} e LQ de 1,63 ng L^{-1} para CIT; LD de 0,225 ng L^{-1} e LQ 0,750 ng L^{-1} FLU; e LD de 0,125 ng L^{-1} e LQ 0,425 ng L^{-1} para SER (FERNANDES et al. 2020). Os valores

de LD e LQ obtidos neste estudo foram superiores se comparados a alguns estudos (BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2011; ASIMAKOPOULOS et al., 2017; PAÍGA; DELERUE-MATOS, 2016).

Para verificar se alguma das substâncias ficaria retida nos filtros utilizados para filtragem da amostra, o teste da filtração foi realizado para a concentração de 5 ng mL^{-1} (média). Os valores obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.5. Um teste estatístico permitiu concluir que as diferenças entre as perdas médias observadas com a filtragem e sem a filtragem não foram estatisticamente significativas.

A precisão de um método é a proximidade do acordo entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas, geralmente é expressa em DPR (EVANGELISTA et al., 2020). Os DPRs deste estudo podem ser observados na Tabela 4.5. O valor para a repetitividade foi de 2,01% para a VEN; 2,70% para o CIT; 4% para FLU; e 5,05% para SER. A precisão intermediária dos três dias testados foi de 3,0% para a VEN; 3,59% para o CIT; 4,38% para FLU; e 5,07% para SER. Os valores de DPR ficaram abaixo de 15% para todas as substâncias, assim, estão em concordância com os parâmetros estabelecidos para a validação de métodos cromatográficos em fármacos (AOAC, 2016; ANVISA, 2003). Tais valores indicam uma boa precisão do método.

Tabela 4.5 - Valores de limites de detecção e quantificação, precisão intermediária e repetitividade, teste de filtração da validação do método analíticos para antidepressivos

Antidepressivo	Limites		Teste do filtro		Precisão	
	LD ng L^{-1}	LQ ng L^{-1}	Recuperação %	DPR%	Repetitividade DPR %	Intermediária DPR %
VEN	0,24	0,73	96,1	7,55	2,01	3,00
CIT	0,33	0,98	116,7	1,04	2,70	3,59
FLU	0,03	0,08	90,3	3,95	4,0	4,38
SER	0,33	0,99	116,6	8,07	5,0	5,07

A exatidão foi avaliada através de experimentos de recuperação. As recuperações do método podem ser visualizadas na Tabela 4.6 e Figura 4.4. Os valores variaram de 76 a 103,33% para a VEN; 99,57 a 119,15% para CIT; 82,26 a 98,40% para FLU; 107,49 a 119,80% para SER. As maiores recuperações foram obtidas para SER. Recuperações com porcentagens perto de 100% são desejáveis, entretanto, pode-se admitir valores inferiores contanto que as recuperações sejam precisas e exatas (ANVISA, 2003).

De acordo com Kruve et al. (2015) valores de recuperação entre 70% e 120% são considerados aceitáveis. Todas recuperações deste estudo ficaram acima de 70% (Figura 4.4). Os valores de DPR para a exatidão ficaram abaixo de 15%. Assim, tem-se que neste estudo a metodologia validada é precisa e exata sendo aceitáveis as recuperações obtidas.

Vale ressaltar que as recuperações obtidas no teste de filtragem (Tabela 4.5), foram próximas as recuperações alcançadas sem o procedimento de filtração (Tabela 4.6), portanto não ocorreu retenção de analito no processo de filtração.

Tabela 4.6 - Recuperação (%) e DPR (%) obtidos para os antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER nos níveis de concentração 1, 5 e 50 ng mL^{-1} para LC-MS-MS

Antidepressivo	Nível de concentração ng mL^{-1}	Média n=5 ng mL^{-1}	Recuperação %	DPR %
VEN	1	0,76	76,00	9,35
	5	4,76	95,33	4,89
	50	51,66	103,33	0,99
CIT	1	0,99	99,57	3,24
	5	5,96	119,15	3,32
	50	50,70	101,40	1,48
FLU	1	0,82	82,26	1,08
	5	4,44	88,76	4,05
	50	49,20	98,40	0,84
SER	1	1,19	119,80	5,74
	5	5,44	119,20	7,08
	50	53,74	107,49	0,55

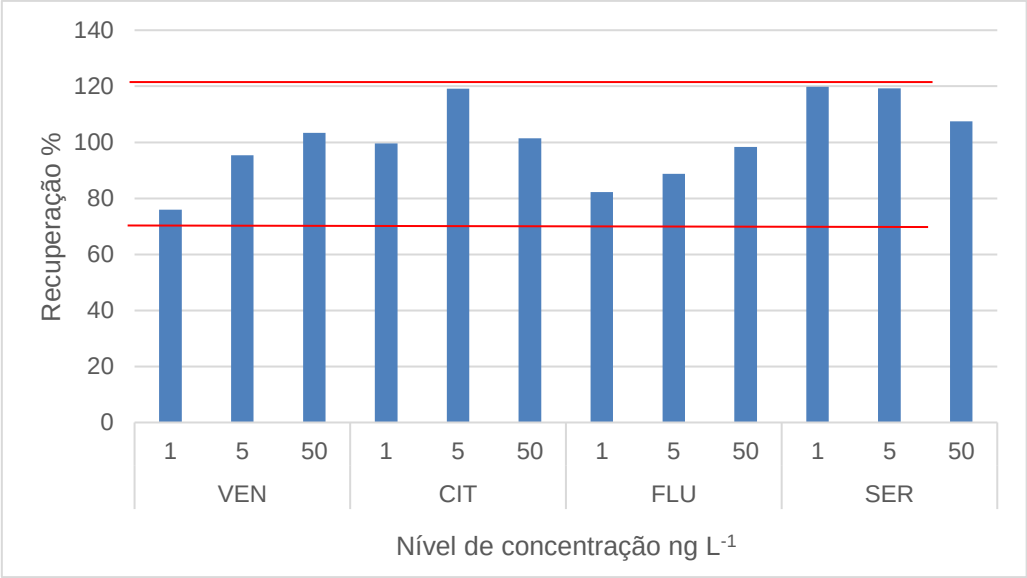


Figura 4.5 - Recuperações (%) obtidas para VEN, CIT, FLU, SER nos níveis de fortificação 1, 5, 50 ng mL^{-1}

A robustez do método foi avaliada por algumas variações cromatográficas utilizadas, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. As injeções foram efetuadas para cada condição individualmente. As variações adotadas para alterações foram de 10% para mais e para menos. Em que, para temperatura o menor valor foi de 36 ºC e para maior valor 44 ºC. Já o fluxo a variação foi de 0,63 mL min^{-1} (menor) e 0,77 mL min^{-1} (maior). Os valores obtidos de recuperação e DPR para robustez podem ser visualizados na Tabela 4.7.

A variação que mais impactou os resultados de recuperação foi a alteração no fluxo da fase móvel, para SER as recuperações foram inferiores se comparadas com a metodologia original. Apesar das alterações efetuadas no método, este mostrou-se robusto, as recuperações são aceitáveis e em sua maioria ficaram dentro da faixa de aceitação.

Tabela 4.7 - Valores de recuperação e DPR para variações na temperatura da coluna e fluxo da fase móvel em ±10%

Antidepressivo	Concentração ng mL^{-1}	Temperatura				Fluxo			
		+10%		-10%		+10%		-10%	
		Recup %	DPR %	Recup %	DPR %	Recup %	DPR %	Recup %	DPR %
VEN	1	71,30	3,60	69,80	3,54	62,61	9,54	60,12	1,36
	5	100,04	0,47	102,00	3,68	72,72	6,59	117,00	3,14
	50	100,64	2,59	100,40	1,64	76,49	4,23	87,10	0,97
CIT	1	68,60	1,57	63,40	3,80	68,44	1,23	70,02	7,25
	5	105,80	3,18	106,0	0,90	96,83	2,56	79,12	4,65
	50	100,06	0,79	100,02	0,87	95,42	1,03	97,3	4,12
FLU	1	118,60	1,78	83,38	1,04	73,66	8,56	70,13	5,98
	5	103,80	1,27	103,60	0,50	79,45	6,78	93,61	7,15
	50	100,36	0,98	100,30	0,24	71,55	3,54	97,80	6,15
SER	1	94,00	8,47	82,35	2,57	65,23	12,65	58,36	4,68
	5	101,60	0,44	102,20	1,26	70,62	7,14	53,94	9,64
	50	100,24	0,14	100,14	2,53	71,23	5,87	61,21	8,12

A validação de metodologia empregando SPE e HPLC MS/MS na determinação de 33 fármacos humanos e veterinários em amostras de água de rio, incluindo antidepressivos, obteve recuperações de 91,1% a 98,4% para VEN; 85,5% a 89,5% para CIT; 85,1% a 90,5 % para FLU; e 85,7% a 91,3% para SER (PAÍGA et al., 2017).

Fernandes et al. (2020) em seu estudo utilizando SPE e HPLC MS/MS para detecção de antibióticos e antidepressivos no rio Leça e rio Douro obteve recuperações de 91,1% a 98,2% para VEN; 85,5% a 89,5% para CIT; 85,1% a 90,5 % para FLU; e 91,1% a 98,2% para SER. Em um estudo para detecção de 20 drogas de abuso e produtos farmacêuticos utilizando SPE e UHPLC MS/MS a recuperação ficou em 98% para CIT e 103% para FLU (PENG et al., 2019).

Uma metodologia foi desenvolvida para a determinação simultânea de 89 fármacos neuropsiquiátricos legais e drogas ilícitas (compostos originais e metabólitos) e outros micropoluentes em águas residuais não filtradas e água doce

através de dois métodos de extração, as recuperações ficaram em 74,3% a 106% para VEN; 66,5% a 106,9% para CIT; 80,4% a 123% para FLU; e 69.4% a 112.3% para SER (ASIMAKOPOULOS et al., 2017).

Rivera-Jaimes et al. (2018) ao analisarem 35 fármacos, entre eles a FLU, em águas superficiais e efluentes de Cuernavaca (México), encontraram recuperações entre 67% e 71%. Porém, vale ressaltar que o pH da amostra coletada não foi ajustado para a análise, como ocorreu neste estudo.

Isto posto, pode-se constatar que as recuperações dos analitos estudados na literatura, corroboram com os valores obtidos neste estudo.

4.4. Análise de antidepressivos em amostras do Rio Piracicaba, SP

O Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE) possui uma rede de telemetria que monitora dados de chuvas acumuladas em 24 horas, total de chuva acumulada no mês vigente e nos anteriores, vazões e níveis dos rios. Os Boletins Diários são disponibilizados pela Sala de Situação PCJ (AGÊNCIA DAS BACIAS PCJ, 2021). Na cidade de Piracicaba, existem três pontos de monitoramento, o PS24 localizado no Rio Corumbataí, o PS21 e PS25, ambos situados no Rio Piracicaba, sendo que o PS21 está a montante do PS25. A Figura 4.5 apresenta os dados de vazões diárias no Rio Piracicaba durante o mês de setembro de 2020 relativos aos pontos de monitoramento PS21 e PS25.

A vazão média histórica para o mês de setembro é de 58,28 $m^3. s^{-1}$ (SSPCJ, 2021). Entre os dias 03 e 9 de setembro de 2020, período em que ocorreram as coletas, as vazões variaram de 17,26 $m^3.s^{-1}$ a 21, 08 $m^3.s^{-1}$ no PS21 e 20,81 $m^3.s^{-1}$ a 23,93 $m^3.s^{-1}$ no PS25. Em ambos os pontos de monitoramento, as vazões ficaram abaixo da média histórica. Vale ressaltar PS21 e PS25 registaram 0,00 mm de chuvas acumuladas nos dias de coleta, bem como aqueles que a antecederam (SSPCJ, 2021).

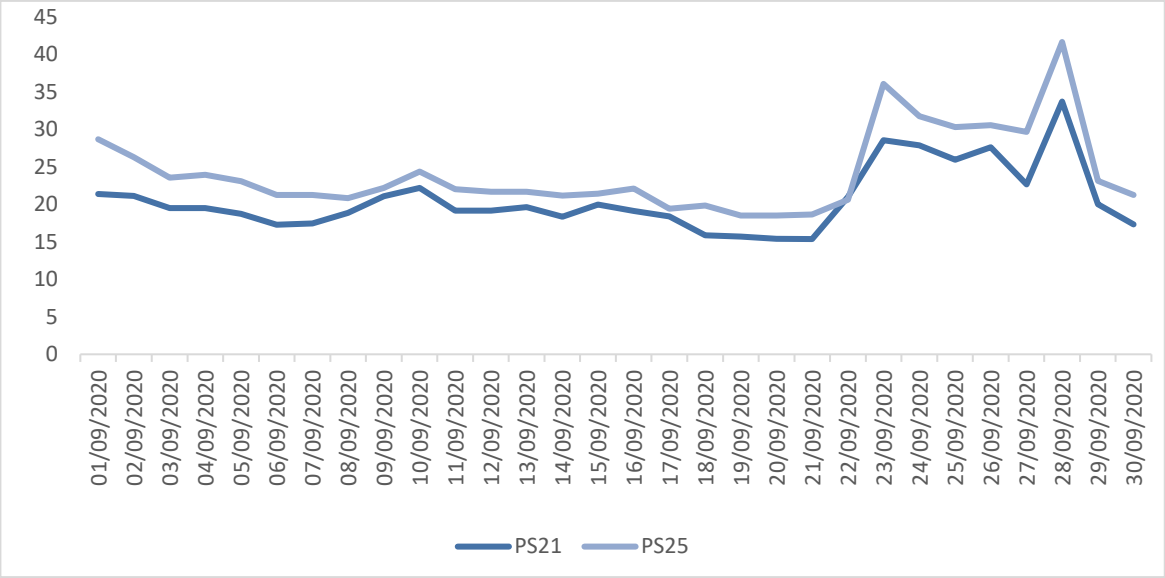


Figura 4.6 - Vazões no Rio Piracicaba no mês de setembro de 2020 (Adaptado: Agência das Bacias PCJ. Sala de Situação, 2021)

A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos para a determinação de VEN, CIT, FLU e SER nas coletas realizadas durante 7 dias no Rio Piracicaba, SP, dentro dos limites da cidade de Piracicaba. Os resultados estão expressos em termos da concentração média.

As ETEs da cidade de Piracicaba, empregam sistemas de tratamento que já se mostraram ineficientes para remoção de fármacos (DEBLONDE et al., 2011). A presença destes contaminantes no Rio Piracicaba pode estar atrelada a diversos motivos como descarte inadequado, recepção de esgoto *in natura*, recepção de afluentes contaminados, aumento no consumo de antidepressivos na cidade, etc. Vale ressaltar que o período de seca contribui para detecção de fármacos no ambiente, devido às baixas vazões no corpo d'água (LIMA et al., 2017).

Tabela 4.8 - Concentrações médias de antidepressivos encontradas no Rio Piracicaba, SP durante 7 dias consecutivos

Antidepressivo	Pontos de coleta	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
VEN ng L^{-1}	P1	1,41	1,29	1,31	1,02	1,46	2,10	1,47
	P2	1,18	alq	alq	1,00	alq	alq	alq
	P3	1,08	alq	alq	alq	alq	alq	1,29
	P4	2,57	alq	alq	alq	alq	1,36	alq
CIT ng L^{-1}	P1	1,03	1,13	alq	alq	alq	alq	alq
	P2	1,15	alq	alq	alq	alq	alq	nd
	P3	alq	alq	nd	alq	alq	alq	nd
	P4	1,73	alq	alq	alq	alq	1,19	nd
FLU ng L^{-1}	P1	1,79	1,86	2,70	2,51	1,03	1,36	1,77
	P2	1,02	alq	nd	nd	nd	nd	nd
	P3	1,00	alq	nd	nd	nd	nd	nd
	P4	2,71	1,23	1,00	2,01	2,44	1,01	alq
SER ng L^{-1}	P1	2,12	1,36	1,00	1,53	1,77	1,70	1,87
	P2	2,97	alq	1,35	1,66	ald	1,36	ald
	P3	1,38	alq	alq	1,32	alq	2,01	1,45
	P4	4,48	2,10	2,01	1,97	2,50	2,45	1,62

nd = substância não detectada ou menor que o limite de detecção
alq = abaixo do limite de quantificação

No 1º dia, todas as substâncias foram detectadas, até mesmo o CIT no P3, foi detectado mas não quantificado. A ETE mais próxima é a ETE Tupi – a aproximadamente 7,5 km em linha reta – a qual emprega como forma de tratamento o reator anaeróbio UASB atendendo 1,1% da população de Piracicaba, a vazão afluente é de 10,7 $L.s^{-1}$ lançada no Ribeirão Tijuco Preto, que deságua no Rio Piracicaba (BRASIL, 2017). No P1, a ocorrência dos antidepressivos estudados foi diária durante os 7 dias, variando de 1,02 a 2,10 ng L^{-1} para a VEN; 1,03 a 2,70 ng L^{-1} para a FLU; e 1,00 a 2,12 ng L^{-1} para a SER. O CIT foi detectado no 1º e 2º dia de coleta.

O P2 está localizado na zona urbana, a ETE Piracicamirim está a aproximadamente 2,8 km (em linha reta) de distância e emprega como forma de tratamento lodo ativado, atende a 24,7% da população de Piracicaba, e possui vazão afluente de 244,2 $L.s^{-1}$ lançada no Ribeirão Piracicamirim (BRASIL, 2017). No P2 nenhum fármaco teve sua detecção constante, a VEN foi detectada no 1º e 4º dia, o CIT e a FLU no 1º dia, e a SER 1º, 3º, 4º e 6º dia de coleta.

O P3 está situado na zona urbana, a ETE Ponte do Caixão está na margem esquerda da ponte no qual foi realizada a coleta. Utiliza como forma de tratamento lodo ativado, atende a 29,5% da população de Piracicaba, e possui vazão afluente de 297,1 $L.s^{-1}$ lançada no Rio Piracicaba (BRASIL, 2017). A ocorrência de antidepressivos no P3 não foi diária, como em P1, a VEN foi detectada no 1º e 7º dia, o CIT não foi detectado, a FLU no 1º dia, e a SER no 1º, 4º, 6º e 7º dia de coleta.

O P4 está localizado na zona urbana, a ETE Bela Vista está a aproximadamente 4,5 km de distância (em linha reta). Utiliza como forma de tratamento o lodo ativado que atende a 30,2% do município, e possui vazão afluente de 298,2 $L.s^{-1}$ lançada no Rio Piracicaba (BRASIL, 2017). A VEN e o CIT foram detectados no 1º e 6º dia, a FLU manteve sua ocorrência frequente, exceto no 7º dia, e a SER foi detectada todos os dias de coleta. Vale ressaltar que as maiores concentrações encontradas para a VEN, CIT, FLU e SER - 2,57 ng L^{-1}; 1,73; 2,71 ng L^{-1} e 4,48 ng L^{-1} respectivamente - foram no P4.

Apesar de ser o ponto mais remoto dentre os estabelecidos neste estudo, e não estar tão próximo aos afluentes de uma ETE, P1 foi o que apresentou maior frequência de detecção dos fármacos, provavelmente, por receber influência direta das cidades vizinhas, como Americana, Limeira e Santa Bárbara D' Oeste. O Ribeirão do Tatu é um tributário do Rio Piracicaba e deságua em sua margem direita. De acordo com enquadramento dos corpos d'água o Ribeirão do Tatu possui Classe 4 - destinado apenas para navegação e à harmonia paisagística (BRASIL, 2005). Possui problemas de lançamento de esgoto *in natura,* disposição irregular de resíduos sólidos e lançamentos clandestinos de efluentes industriais (PREFEITURA DE LIMEIRA, 2017). Já o Ribeirão dos Toledos e o Ribeirão Tijuco Preto (este último sendo o mais próximo ao P1) são afluentes da margem esquerda do Rio Piracicaba, e possuem Classe 3 (BRASIL, 2005).

No P4 notou-se uma frequência de detecção para a FLU e a SER, tal fator pode estar associado a recepção de afluentes das maiores ETEs da cidade, como a ETE Ponte do Caixão e a ETE Bela Vista, que juntas são responsáveis pelo tratamento de aproximadamente 60% do esgoto de Piracicaba.

Salienta-se que os antidepressivos são medicamentos controlados de uso contínuo, o que justifica a sua presença frequente em todos os dias de coleta no P1 e P4. No P2 e P3 apesar da não constância de detecção, não se pode afirmar que o

corpo d'água alvo deste estudo está livre de tais medicamentos, visto que, podem se encontrar em menores concentrações (abaixo do LQ).

As maiores concentrações detectadas neste trabalho variaram de 1,73 a 4,48 ng L^{-1}. Apesar de tais concentrações serem baixas, são alarmantes, visto que os antidepressivos estudados possuem tendência de migrarem para o sedimento ou matéria orgânica em suspensão pelos mecanismos absorção ou adsorção, devido as características da molécula (ALVARINO et al., 2018; FERNANDEZ et al., 2020). O valor de log Kow dos antidepressivos estudados é VEN 3,20; CIT 3,5; FLU 4,05; SER 5,1, isto significa que a molécula possui alta hidrofobicidade, então estes poluentes são capazes de se movimentar da fase aquosa para a camada lipofílica do sedimento, sendo assim absorvidos. O pka da molécula e o pH do meio influenciam na adsorção dos fármacos – pka VEN 8,91 , CIT 9,78, FLU 9,80 e SER 9,85 - em que, quando pka da molécula for menor que pH do meio há ocorrência de protonação, formando espécies catiônicas que possivelmente irão se adsorver no sedimento ou na matéria orgânica em suspensão por meio das interações eletrostáticas entre a molécula carregada positivamente e a superfície negativa das moléculas do sedimento (AL-KHAZRAJY; BOXALL, 2016; ALVARINO et al., 2018).

A FLU foi o antidepressivo detectado com maior frequência em um estudo nas águas superficiais e sedimentos dos rios ao norte de Portugal. As concentrações detectadas na água estão na faixa de 1,97 ng L^{-1} no Rio Douro e 28,9 ng L^{-1} no Rio Leça. Já a VEN, CIT e SER foram detectados apenas no Rio Leça na faixa de concentração de 5,4 a 641 ng L^{-1} (FERNANDES et al., 2020). Em um estudo com vários fármacos incluindo os antidepressivos nas águas do Rio Lis em Portugal, a FLU foi detectada na concentração de 3,3 ng L^{-1}, a SER ficou a baixo do limite detecção, e o CIT e a VEN não foram detectados (PAÍGA et al., 2017).

No primeiro estudo sobre a ocorrência de fármacos em águas superficiais e efluentes de Cuernavaca, México, 35 fármacos foram analisados no rio Apatlaco, dentre eles a FLU. Porém, o antidepressivo não foi detectado em nenhuma campanha de amostragem (RIVERA-JAIMES et al., 2018). Ao analisar 11 antidepressivos nas águas do Rio Blanice na República Checa, o CIT foi detectado na faixa de concentração de 24 a 58 ng L^{-1}, a VEN de 65 a 170 ng L^{-1} e a SER de 4 a 100 ng L^{-1} (GRABICOVÁ et al., 2017).

A bacia do rio Beiyun na China foi selecionada como um *hotspot* representativo de um estudo, no qual avaliou-se a ocorrência enantiomérica de fármacos quirais incluindo 5 compostos parentais, dente eles a VEN e FLU. A VEN teve uma frequência de detecção de 100% nos dois períodos de amostragem (estação chuvosa e seca) sendo encontrada na concentração de 22,9 ng L^{-1}. A FLU foi detectada apenas ocasionalmente na estação chuvosa, vezes a abaixo do limite de detecção a 11,8 ng L^{-1} (MA et al*.,* 2020).

Rimayi et al. (2018) avaliou a presença e quantificação de 15 contaminantes emergentes no rio Jukskei. A presença de VEN variou de 0,2 a 4 ng L^{-1} em diferentes pontos ao longo do rio.

Alonso et al. (2010) em um estudo com vários fármacos psicoativos, dentre os quais estão incluídos o CIT, FLU, VEN e SER, ao longo dos rios Jarama, Manzanares, Guadarrama, Henares e Tajo, detectou a FLU na concentração média de 14 ng L^{-1} e um máximo de 44 ng L^{-1}. O CIT apresentou concentração média de 37 ng L^{-1} e máxima de 120 ng L^{-1}. A VEN foi detectada com média de 57 ng L^{-1} e máximo de 387 ng L^{-1}. Já a SER não foi detectada no estudo.

Dez drogas psicotrópicas foram monitoradas em ETEs e águas superficiais na bacia do rio Atibaia, Brasil. A FLU foi detectada na faixa de 25 a 60 ng L^{-1} em sete pontos do Rio Atibaia, já a SER não foi detectada (PIVETTA et al., 2020). No mesmo país a FLU foi detectada a uma concentração de 0,58 ng L^{-1} no fundo do mar da Baía de Santos (CORTEZ et al., 2019). Alguns fármacos e cocaína foram analisados no rio Negro e seus dois afluentes em Manaus, o CIT foi detectado na faixa de concentração de 48 a 79 ng L^{-1} e a SER de 30 a 146 ng L^{-1} (THOMAS et al., 2014).

Os níveis detectados desses medicamentos no Rio Piracicaba estão de acordo com alguns estudos, porém divergem de outros. No geral, nota-se que foram encontrados níveis inferiores de contaminação se comparado a pesquisas em outras áreas geográficas. Alguns fatores podem ser responsáveis por tal questão, por exemplo, os antidepressivos selecionados não sejam utilizados nas quantidades consumidas em outras partes do mundo, possivelmente devido a fatores sociais.

Os dados apresentados neste trabalho reafirmam que as atuais tecnologias de tratamento de esgoto das ETEs que circundam o Rio Piracicaba não conseguem remover efetivamente VEN, CIT, FLU e SER, visto que tais componentes foram detectados por meio de HPLC- MS/MS. As concentrações diárias detectadas,

principalmente em P1 e P4, é um indicativo de descarga contínua desses medicamentos no ambiente, sendo a principal causa de sua presença generalizada.

4.5. Conclusões

Um método analítico sensível baseado em SPE seguido de análise em HPLC- MS/MS foi otimizado para um exame simultâneo de quatro antidepressivos, VEN, CIT, FLU e SER em águas superficiais. O processo de validação foi realizado de acordo com os critérios de órgão regulador, a Anvisa. O método apresentou exatidão (70-120%) e precisão (DPR < 15%) aceitáveis, alta seletividade, e os LDs e LQs demostram que o método é sensível.

O método foi aplicado para analisar amostras de água superficiais em quatro pontos do Rio Piracicaba na cidade de Piracicaba, SP, durante 7 dias consecutivos durante o período de seca (setembro). Todos os antidepressivos estudados foram detectados neste trabalho, de modo que FLU e a SER foram os compostos que tiveram detecções mais frequentes.

O cuidado ao ecossistema aquático é de extrema importância, visto que os corpos d'água são *habitats* de uma vasta quantidade de espécies com populações que necessitam de um meio equilibrado para prosperar. A contaminação por produtos farmacêuticos, em especial os antidepressivos, é um tema de extrema importância e os seus impactos no meio ambiente devem ser avaliados. Contudo, espera-se que este estudo possa servir como base norteadora para a inclusão na legislação brasileira do monitoramento de fármacos no ambiente aquático, em que a metodologia aqui validada possa atuar como uma importante ferramenta junto aos órgãos ambientais do país.

Referências

AGÊNCIA DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. **Primeira Revisão do Plano das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí 2010 a 2020** - Relatório Final - Tomo IV - Plano de Ações. Piracicaba: Agência das Bacias PCJ; Comitês PCJ, 2018.

AGÊNCIA DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. Sala de Situação PCJ. **Boletins Diários**. Piracicaba: Agência das Bacias PCJ, 2021. Disponível em: <http://www.sspcj.org.br/> Acesso em: 22 mar. 2021.

AL-KHAZRAJY, O. S. A.; BOXALL, A. B. A. Impacts of compound properties and sediment characteristics on the sorption behaviour of pharmaceuticals in aquatic systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 317, p. 198-209, 2016.

ALONSO, S.G. et al. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). **Environment International**, v. 36, n.2, p.195-201, 2010.

ALVARINO, T. et al. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment Technologies. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 297-306, 2018.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.18, n.3, p. 187-204, 2013.

ARNNOK, P. et al. Selective uptake and bioaccumulation of antidepressants in fish from effluent-impacted Niagara River. **Environmental Science and Technology**, v.51, n.18, p. 10652-10662, 2017.

ASIMAKOPOULOS, A. G. et al. Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: An alternative sample preparation approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 6205-6225, 2017.

BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 12, p. 1620-1631, 2011.

BEAN, T. G. et al. Behavioural and physiological responses of birds to environmentally relevant concentrations of an antidepressant. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, art. 20130575, 2014.

BLAIR, B. D. et al. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 2116-2123, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico - ANA. **Atlas Esgotos**: Despoluição de Bacias Hidrográficas. Brasília, DF: ANA; Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2017. Disponível em: http://atlasesgotos.ana.gov.br/. Acesso em: 24 fev. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. 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 União**, Brasília, DF, n. 053, 18 mar. 2005. p. 58-63.

CARACCIOLO, A. B.; TOPP, E.; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 25-36, 2015.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

CASTILLO-ZACARÍAS, C. et al. Antidepressant drugs as emerging contaminants: Occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. **Science of the Total Environment**, v. 757, art. 143722, 2021.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Guia Nacional de Coleta e preservação de amostras**: Água, sedimento, comunidades aquáticas, e efluentes líquidos. Brasília, DF: CETESB; ANA, 2011. 327 p.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA - CFF. **Venda de medicamentos psiquiátricos cresce na pandemia**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <http://covid19.cff.org.br/venda-de-medicamentos-psiquiatricos-cresce-na-pandemia/> Acesso em: 05 mar. 2021.

CORTESE, M. et al. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. **Molecules**, v. 25, n.13, p.3047, 2020.

CORTEZ, F. S. et al. Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel *Perna perna*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, p. 366-372, 2019.

CORTEZ, F. S. et al. Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel Perna perna. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, p. 366-372, 2019.

COSTA JUNIOR, I. L. et al. Simultaneous HPLC-PDA determination of commonly prescribed antidepressants and caffeine in sludge from sewage treatment plants and river sediments in the Itaipu reservoir region, Paraná, Brazil. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 100, n. 9, p. 1004-1020, 2020.

COSTA JUNIOR, I. L.; PLETSCH, A L.; TORRES, Y. R. Ocorrência de fármacos antidepressivos no meio ambiente-revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1408-1431, 2014.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. International. **Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442-448, 2011.

EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A. E.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v.3, n. 1, p.1-16, 2017.

ESCUDERO, J. et al. Antipsychotics as environmental pollutants: An underrated threat? **Science of The Total Environment**, v. 769, art.144634, 2021.

EVANGELISTA, P. A. et al. Optimization of a methodology for simultaneous determination of four antidepressants present in fresh water by high efficiency liquid chromatography. **Reget**, v. 24, n. 8, p. 1-20, 2020.

FERNANDES, M. J. F. et al. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. **Chemosphere**, v. 239, art. 124729, 2020.

FITZGERALD, P. J.; WATSON, B. O. In vivo electrophysiological recordings of the effects of antidepressant drugs. **Experimental Brain Research**, v. 237, p. 1593–1614, 2019.

GAFFNEY, V. J. et al. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. Nota técnica. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 138-149, 2014.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 1569, p. 91-100, 2018.

GRABICOVÁ, K. et al. Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. **Water Research**, v. 124, p. 654-662, 2017.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 678-690, 2006.

GUNNARSSON, L. et al. Pharmacology beyond the patient – The environmental risks of human drugs. **Environment International**, v. 129, p. 320-332, 2019.

HAZELTON, P. D. et al. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 27-35, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019**. Percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e Grandes Regiões. Rio de Janeiro, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Biblioteca: Catálogo ID 46110**: Rio Piracicaba - Salto do Rio Piracicaba - Restaurante Mirante - Parque do Mirante - Piracicaba, SP. Fotografia em preto e branco. Rio de Janeiro, s.d. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/biblioteca-catalogo.html?id=446110 &view=detalhes> Acesso em: 24 jun. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo 2010** - Piracicaba. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/piracicaba/panorama> Acesso em: 26 mar. 2021.

KIM, L. **Development and validation of a LC-MS/MS method for detection and quantification of 18 antidepressants in whole blood**. 2019. Thesis (MS in Forensic Science) – John Jay College of Criminal Justice, CUNY Academic Works, New York, 2019.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–massspectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8–28, 2015.

KÜSTER, A.; ADLER, N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, art. 20130587, 2014.

LIMA, D. R. S. et al. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043-1054, 2017.

MA, R. et al. Widespread monitoring of chiral pharmaceuticals in urban rivers reveals stereospecific occurrence and transformation. **Environment International**, v. 138, art. 105657, 2020.

MARTIN, J. M. et al. Antidepressant exposure causes a nonmonotonic reduction in anxiety-related behaviour in female mosquitofish. **Journal of Hazardous Materials Letters**, v. 1, art. 100004, 2020.

MELLER, A.; BRAVO, J. M.; COLLISCHONN, W. Assimilação de dados de vazão na previsão de cheias em tempo-real com o modelo hidrológico MGB-IPH. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 209-224, 2012.

MOERMOND, C. T. A. et al. Assessment using the revised Annex XIII of REACH: a comparison with other regulatory frameworks. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 8, p. 359–371, 2011.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). **Science of Total Environment**, v. 569–570, p. 16-22, 2016.

PAÍGA, P.; SANTOS, L. H. M. L. M.; DELERUE-MATOS, C. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 135, p. 75-86, 2017.

PENG, Y.; GAUTAM, L.; HALL, S. W. The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 223, p. 438-447, 2019.

PETRIE, B. et al. Application of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of steroid oestrogens in wastewaters. International **Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 13, p. 1343-1355, 2012.

PINTO, G. M. F. et al. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 219-224, 2014.

PIVETTA, R. C. et al. Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 727, art. 138661, 2020.

REIS, E. O. et al. Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 773-781, 2019.

RIMAYI, C. et al. Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the uMngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 1008-1017, 2018.

RIVERA-JAIMES, J. A. et al. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 1263–1274, 2018.

SCHULTZ, M. M.; et al. Antidepressant Pharmaceuticals in Two US Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1918-1925, 2010.

SCHULTZ, M. M.; FURLONG, E. T. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS Anal. **Chemosphere**, v. 80, n. 5, p. 1756-1762, 2008.

SHENG, L. H. et al. Simultaneous determination of 24 antidepressant drugs and their metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, p. 1212-1222, 2014.

THOMAS, K. V. et al. Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 302-308, 2014.

TORRES, N. H. et al. Spatial and seasonal analysis of antimicrobials and toxicity tests with *Daphnia magna*, on the sub-basin of Piracicaba river, SP, Brazil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 6, p. 6070-6076, 2017.

WILLE, S. M. R. et al. Relevant issues in the monitoring and the toxicology of antidepressants. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 45, n. 1, p. 25-89, 2008.

XIAO, Y. et al. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, p. 100-108, 2008.

5 ANÁLISE DA TOXICIDADE DE ANTIDEPRESSIVOS EM *Daphnia magna*

Resumo

Devido ao crescimento da prevalência de transtornos mentais na sociedade moderna, o consumo de antidepressivos por parte da população aumentou. Os antidepressivos foram detectados em diversas matrizes, como em águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, mar e solos. A *Daphnia magna* é um microcrustáceo amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos agudo e crônico. O objetivo deste estudo foi realizar testes de toxicidade aguda com os compostos fluoxetina (FLU), citalopram (CIT), venlafaxina (VEN) e sertralina (SER), para determinação do CE_{50} de cada substância, além de efetuar testes de toxicidade aguda e crônica com a mistura dos compostos, de modo que as concentrações utilizadas foram baseadas na maior concentração detectada em amostras do Rio Piracicaba, SP. No teste crônico foram avaliadas a reprodução, sobrevivência, tamanho dorsal e ventral. Para tal, os ensaios seguiram as normas ABNT NBR12713: 2016, OECD nº 211 e ABNT NBR 13373:2017. O CE_{50} para FLU, CIT, VEN e SER foram 3,77 mg L^{-1}; 6,96 mg L^{-1}; 36,15 mg L^{-1}; 0,34 mg L^{-1} respectivamente. A FLU e o CIT foram classificados como moderadamente tóxicos, a VEN pouco tóxica e a SER foi considerada muito tóxica. O quociente de risco para os antidepressivos estudados não apresentam risco ambiental agudo para invertebrados. Os testes agudos com a mistura dos antidepressivos nas concentrações ambientais não apresentaram organismos mortos ou imóveis. Os testes crônicos demonstraram efeitos na reprodução e tamanho dorsal da *Daphnia magna*, tanto os realizados com a substância individual quanto suas misturas. O tamanho ventral organismo não foi afetado pela exposição individual das substâncias, porém a mistura dos fármacos CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER propiciou os efeitos que mais se afastaram do controle. A variável sobrevivência não atingiu as pressuposições para avaliação estatística, dado que a mortalidade no ensaio foi de 5%. Contudo, os resultados aqui apresentados são o primeiro passo o entendimento de como se dá comportamento da e suas misturas no ambiente.

Palavras-chave: Antidepressivos; *Daphnia magna*; Toxicidade aguda; Toxicidade crônica; Ensaios de misturas.

Abstract

The rise in the prevalence of mental disorders in modern society is shown by the increase in the consumption of antidepressants by the population. Antidepressants have been detected in several matrices, such as in surface and underground waters, sediments, sea and soils. *Daphnia magna* is a microcrustacean used in acute and chronic ecotoxicological tests. The objective of this study was to carry out acute toxicity tests with compounds fluoxetine (FLU), citalopram (CIT), venlafaxine (VEN) and sertraline (SER), to determine the CE_{50} of each substance, in addition to performing acute and chronic toxicity tests with the mixture of compounds, so that the concentrations used were based on the highest concentration detected in samples from Piracicaba River, SP. In the chronic test, reproduction, dorsal and ventral size were evaluated. For this purpose, the tests followed the standards ABNT NBR12713: 2016, OECD nº 211 and ABNT NBR 13373: 2017. The CE_{50} for FLU, CIT, VEN and SER were 3.77 mg L-1; 6.96 mg L-1; 36.15 mg L-1; 0.34 mg L-1 respectively. FLU and CIT were classified as “moderately toxic”, VEN “little toxic” and SER was considered “very toxic”. The risk quotient for the studied antidepressants does not present an acute environmental risk for invertebrates. Acute testing with a mixture of antidepressants at environmental concentrations did not show dead or immobile organisms. Chronic tests demonstrated the effects of reproduction and on the dorsal size of *Daphnia magna*, both those performed with an individual substance and its mixtures. The ventral organism size was not affected by the individual exposure of the substances, however the mixture of the drugs CIT.FLU.SER and VEN.CIT.FLU.SER propitiated the effects that most moved away from the control. The related variable did not reach the assumptions for evaluation, given that the mortality in the trial was 5%. However, the results here are the first step in understanding how these mixtures behave in the environment.

Keywords: Antidepressants; *Daphnia magna*; Acute toxicity; Chronic toxicity; Mixing tests

5.1. Introdução

Produtos farmacêuticos de diversas categorias são utilizados em grande escala para o restabelecimento e tratamento da saúde humana e animal (NKOOM et al., 2019). Isto se deve às descobertas de novas drogas, à população em expansão, à estrutura etária inversa da população, bem como o vencimento de patentes com disponibilidade resultante de genéricos menos caros (EVANGELISTA et al., 2020).

Um fármaco é fabricado com o objetivo de ter uma consequência benéfica no indivíduo em que foi administrado, pois é um material que contém uma substância ativa projetada para afetar vias biológicas específicas de organismos a fim de atingir seu propósito terapêutico (TKACZYK et al., 2021). Muitos dos medicamentos existentes acabam no ambiente, onde podem exercer efeitos biológicos adversos (NKOOM et al., 2019).

Tais substâncias podem entrar no ambiente por diversas vias como o descarte impróprio - queima, descarga no vaso sanitário, resíduos destinados a aterro - e por excreção metabólica de formas transformadas e inalteradas (MINAGH et al., 2009). A tecnologia empregada nas estações de tratamento de esgoto não são efetivas na remoção destes poluentes, contribuindo para a sua constantemente introdução no meio ambiente (WAWRYNIUK et al., 2015).

Devido algumas características físico-químicas, bem como sua frequente introdução no ambiente, um fármaco pode tornar-se persistente, o que leva à exposição contínua de organismos aquáticos ao longo de todo o seu ciclo de vida (MINAGH et al., 2009). Dessa forma, faz-se necessário, além de um monitoramento destas substâncias, a realização de testes de toxicidade buscando-se entender como os fármacos podem interferir no metabolismo dos organismos expostos direta e indiretamente.

Os antidepressivos são uma classe de medicamentos humanos para o tratamento da depressão clínica, transtorno de déficit de atenção, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico e fobia social. Devido ao crescimento da prevalência de transtornos mentais na sociedade moderna, o consumo de antidepressivos por parte da população, principalmente no período da pandemia de COVID-19 teve um aumento (CFF, 2020; DING et al., 2017).

Os antidepressivos foram detectados em diversas matrizes, como em águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, mar e solos (FICK et al*.,* 2009; FONG et al*.,* 2019; MEJÍAS et al., 2021; PARK; JEON, 2021; SCHLÜSENER et al*.,* 2015). Além de apresentarem efeitos em diferentes níveis tróficos de organismos não-alvo, como algas, plantas, invertebrados e vertebrados, estes medicamentos possuem a capacidade de bioacumulação, afetando o crescimento, diminuição da predisposição para interagir, alterações de natação, redução da taxa de crescimento populacional (ABREU et al., 2020; BYEON et al., 2020; DUARTE et al., 2020; SEHONOVA et al., 2019; SILVA et al., 2015).

Para o entendimento do impacto de fármacos no ambiente são adotados testes de ecotoxicidade, para tal são utilizados organismos-testes. Na ecotoxicologia aquática, o ideal é que as espécies utilizadas pertençam a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos, tenham ampla distribuição, sejam passíveis de cultivo e manejo em laboratório, além abrangerem uma importância recreativa, econômica e ecológica (BIDWELL, 2020; DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

As *Daphnia* também conhecidas como “pulgas d’água”, são microcrustáceos pertencentes à ordem Cladocera representativos das espécies de zooplâncton e amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade da água (ANTUNES; CASTRO, 2017). Possuem sensibilidade a várias substâncias e são considerados organismos modelos muito úteis em ecotoxicologia (BOWNIK, 2017).

Com um breve ciclo de vida, altas taxas de fecundidade e sensibilidade a diversos fatores de estresse, a *Daphnia magna* possui reprodução sexuada ou assexuada, onde em condições favoráveis é predominante a partenogénese assexuada, o que possibilita o controle de sua variabilidade genética, possibilitando facilmente sua manutenção e cultivo em laboratório (ANTUNES; CASTRO, 2017; TKACZYK et al., 2021).

Entre os diferentes organismos utilizados em testes de toxicidade de fármacos - como o paracetamol, carbamazepina, cimetidina, diltiazem, antibióticos sulfonamidas e genfibrozila - a *Daphnia magna* apresentou um nível de sensibilidade muito maior do que em outras espécies, incluindo bactéria (*Vibrio fischeri*), e peixes japoneses medaka (*Oryzias latipes*) e algas (*Chlorella vulgaris*) (KIM et al., 2007; ZURITA et al., 2007).

Isto posto, o objetivo deste estudo foi realizar testes de toxicidade aguda com os compostos fluoxetina, citalopram, venlafaxina e sertralina, para determinação da concentração efetiva CE_{50} de cada substância e RQ, além de efetuar testes de toxicidade aguda e crônica com a mistura dos compostos, de modo que as concentrações utilizadas foram baseadas na maior concentração detectada em amostras do Rio Piracicaba, SP. No teste crônico foram avaliadas a reprodução, sobrevivência, tamanho dorsal e ventral.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Materiais

Os antidepressivos venlafaxina (VEN), citalopram (CIT), fluoxetina (FLU) e sertralina (SER) foram obtidos na forma de padrões de referência para farmácias de manipulação com pureza de 99,98% (*Fragon*, Holanda).

Os sais utilizados para preparo dos meios de cultivos constam nas Tabelas 5.1 e 5.2. O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (*Synth*, Brasil) foi usado para o teste de sensibilidade, Câmara de Neubauer (*Inlab*, Brasil) e microscópio (*Leica Microsystems*, Brasil) foram empregados para contagem de algas.

5.2.2. Manutenção e cultivo

Para o desenvolvimento dos ensaios foi mantido um cultivo de *D. magna* em condições padronizadas pelo método da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR12713:2016.

O meio de cultivo utilizado foi M4 – água reconstituída (Tabela 5.1), em que, para o seu preparo utilizou-se água ultrapura (*Pura-Q*, Brasil) com condutividade menor que 10 $\mu S/cm^{-1}$, acrescida de sais, cuja dureza total foi mantida entre 200 $\pm$ 25 mg/L $CaCO_3$ e o seu pH corrigido, se necessário, para 7,6 com auxílio de NaOH ou HCl 0,1M. A troca do meio de cultivo ocorreu duas vezes por semana de segunda e quinta-feira (ABNT, 2016).

Foram mantidas 40 fêmeas de *D. magna* em recipientes de 2000 mL, com luminosidade difusa – fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro – e temperatura de 20 ± 2 ºC. As matrizes com idade superior a 60 dias foram descartadas (ABNT, 2016).

A alimentação foi fornecida diariamente com uma suspensão de algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* na quantidade de 1 x 10^7 células de algas por organismo. Ademais foi oferecido três vezes por semana um complemento alimentar à base de partes iguais de solução de ração para peixe e solução de levedura na quantidade de 0,02 mL de alimento por organismo (ABNT, 2016).

As algas utilizadas para alimentação, foram cultivadas segundo a metodologia de Blaise et al. (2000) (Tabela 5.2). Em que, o meio de cultivo foi preparado e o seu pH corrigido para 7,0 com auxílio de NaOH ou HCl 0,1M. Após o ajuste, o meio foi autoclavado a 121 ºC por 30 minutos.

A *P. subcapitata* foi mantida em recipiente de 2000 mL, sob aeração e luminosidade (3000 lux). Após o cultivo atingir o crescimento ideal, foi realizada a sua centrifugação, durante 5 minutos a 4000 rpm, em que, descartou-se o sobrenadante e a massa de algas foi ressuspendida no meio de cultivo M4 e posteriormente foram armazenadas em geladeira numa temperatura 4 ºC. A contagem algas foi realizada em câmara de Neubauer (ABNT, 2016).

O alimento composto foi preparado adicionando-se 5 g de ração para peixe em 1000 mL de água ultrapura e mantida por uma semana sob aeração constante, com reposição da água perdida por evaporação. Após esse período, a solução foi decantada, filtrada e fracionada em frascos de 100 mL, onde foi mantida congelada até o uso. Para o uso diário na alimentação da *D. magna*, os frascos eram previamente descongelados e misturados a 0,5 g de fermento biológico seco instantâneo diluído com mais 100 mL de água ultrapura (ABNT, 2016).

Tabela 5.1 - Soluções estoque para preparo do meio M4

Solução estoque	Reagente	Fórmula Molecular	Marca	Quantidade g/L
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	$CaCl_2.2H_2O$	*Êxodo Científica*, Brasil	73,5
2	Sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4.7H_2O$	*Mallinckrodt*, EUA	123,3
3	Cloreto de potássio	KCl	*Synth*, Brasil	5,8
4	Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	*Synth*, Brasil	64,8
5	Cloreto de estrôncio hexahidratado	$SrCl_2.6H_2O$	*Sigma* Aldrich, Japão	3,04
	Cloreto de cobre dihidratado	$CuCL_2.2H_2O$	*Sigma* Aldrich, China	0,335
	Cloreto de zinco	$ZnCl_2$	*Merck*, Alemanha	0,260
	Cloreto de cobalto hexahidratado	$CoCl_2.6H_2O$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,200
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	$MnCl_2.4H_2O$	*Sigma Aldrich*, China	7,21
	Cloreto de lítio	LiCl	*Sigma Aldrich*, China	6,12
	Cloreto de rubídio	RbCl	*Merck*, Alemanha	1,42
6	Nitrato de sódio	$NaNO_3$	*Sigma Aldrich*, Japão	0,548
	Ácido bórico	H_3BO_3	*J.T.Backer*, Brasil	5,719
	Brometo de sódio	NaBr	*Merck*, Alemanha	0,032
	Molibdato de sódio dihidratado	$Na_2MoO_4.2H_2O$	*J.T.Backer*, Brasil	0,126
	Monovanadato de amônio	NH_4VO_3	*Sigma Aldrich*, Japão	0,00115
	Iodeto de potássio	KI	*Sigma Aldrich*, China	0,0065
	Selenito de sódio	Na_2SeO_3	*Sigma Aldrich*, Japão	0,0044

Continua

conclusão

7	Silicato de sódio	Na_2SiO_3	*Synth*, Brasil	21,465
	EDTA dissódico heptahidratado	$Na_2EDTA.7H_2O$	*Merck*, Alemanha	0,500
8*	Sulfato de ferro heptahidratado	$FeSO_4.7H_2O$	*Merck*, Alemanha	0,1991
	Fosfato de potássio dihidrogenado	KH_2PO_4	*Sigma Aldrich*, EUA	0,286
9	Fosfato de potássio	K_2HPO_4	*Synth*, Brasil	0,368
	Hidrocloreto de tiamina	$C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,750
	Cianocabalamina (vitamina B12)	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,010
10	D (+) Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,007 5

*As soluções de $FeSO_4.7H_2O$ e $Na_2EDTA.7H_2O$ foram preparadas individualmente. As duas soluções foram misturadas e autoclavadas a 121°C por um período de 15 minutos Fonte: Adaptado ABNT, 2016

Tabela 5.2 - Soluções estoque de preparo do meio de cultivo para *P. subcapitata*

Solução estoque	Reagente	Fórmula Molecular	Marca	Quantidade g L^{-1}
1	Cloreto de magnésio hexahidratado	$MgCl_26H_2O$	*Sigma Aldrich*, China	12,160
	Cloreto de cálcio dihidratado	$CaCl_2.2H_2O$	*Êxodo Científica*, Brasil	4,400
	Ácido bórico	H_3BO_3	*J.T.Backer*, Brasil	0,185
	Cloreto de manganês pentahidratado	$MnCl_2.4H_2O$	*Sigma Aldrich*, China	0,416
	Cloreto de zinco	$ZnCl_2$	*Merck*, Alemanha	0,003
	Cloreto de ferro hexahidratado	$FeCl_3.6H_2O$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,159
	Cloreto de cobalto hexahidratado	$CoCl_2.6H_2O$	*Sigma Aldrich*, EUA	0,001
	Cloreto cúprico	$CuCl_2.H_2O$	*Sigma Aldrich*, EUA	$1,2\ 10^{-5}$
	Molibdato de sódio dihidratado	$NaMoO_4.2H_2O$	*J.T.Backer*, Brasil	0,007
2	Nitrato de sódio	NaNO3	*Merck*, Alemanha	25,500
3	Sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4.7H_2O$	*Sigma Aldrich*, EUA	14,700
4	Fosfato de potássio	K_2HPO_4	*Synth*, Brasil	1,044
5	Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	*Synth*, Brasil	15,000

Fonte: Adaptado Blaise, 2000

5.2.3. Teste de sensibilidade em Daphnia magna

Para avaliação da sensibilidade dos organismos teste foi utilizado como substância de referência o $K_2Cr_2O_7$, nas concentrações (em triplicata) de 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 e 1,28 mg/L e controle. Os neonatos de *D. magna* com idade entre 2 a 26 horas foram expostos a substância com período de incubação de 24 horas, sem alimentação e temperatura entre 20 ± 2 ºC (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Foram realizados 20 ensaios onde foi calculado o CE_{50}, 24h e elaborada a carta controle (ABNT, 2016).

5.2.4. Teste de toxicidade aguda em Daphnia magna

Para o teste agudo das misturas dos fármacos, foram utilizadas como referência as maiores concentrações ambientais detectadas no Rio Piracicaba - SP de cada um dos antidepressivos estudados: VEN 2,57 ng L^{-1}; CIT 1,73 ng L^{-1}; FLU 2,71 ng L^{-1}; SER 4,48 ng L^{-1}. As substâncias foram combinadas de forma que se obteve misturas binárias, terciárias e uma quaternária, conforme segue:

- Binárias: VEN.CIT; VEN.FLU; VEN.SER; CIT.FLU; CIT.SER; FLU.SER
- Terciárias: VEN.CIT.FLU; VEN.CIT.SER; CIT.FLU.SER
- Quaternária: VEN.CIT.FLU.SER

As diluições das substâncias foram realizadas no meio M4 e para auxiliar na dissolução, foi usado o aparelho de ultrassom (*Brason* modelo 2510) durante de 3 minutos.

Para determinação do CE_{50} de cada substância, inicialmente foi realizado um ensaio preliminar para conhecer a diluição que ocasiona a imobilidade de 100% dos organismos e a diluição que se observa um efeito menor que 10% na imobilidade de cada um dos fármacos estudados. A partir de tais resultados foi definido o intervalo da série de diluições do teste definitivo (ABNT, 2016).

Os ensaios agudos - preliminar, definitivo e misturas - foram conduzidos com cinco concentrações e o controle, em triplicata. Em cada triplicata foram adicionados cinco neonatos de *D. magna* com idade entre 2 a 26 horas (ABNT, 2016). O período de incubação foi de 48 horas, sem alimentação e temperatura entre 20 ± 2 ºC, após esse tempo contabilizou-se o número de indivíduos imóveis e/ou mortos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

A partir de tais resultados foi possível calcular a estimativa da concentração que afeta 50% da população de animais expostos ao $K_2Cr_2O_7$ e para cada um dos os antidepressivos (VEN, CIT, FLU e SER). As respectivas representações gráficas foram obtidas por meio da aplicação de um modelo sigmoide (dose-resposta), simétrico em relação a CE_{50} (RITZ, 2010). A esse modelo foi aplicado uma regressão logística com dois parâmetros, atendendo a princípio da parcimônia.

Com base nesses valores, realizou-se uma classificação quanto à toxicidade aguda para a *D. magna*, de acordo com as classes toxicológicas de Zucker (1985) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Classificação qualitativa de toxicidade para invertebrados aquáticos

Concentração mg L^{-1}	Classificação
< 0,1	Altamente tóxico
0,1 <CE_{50}<1	Muito tóxico
1<CE_{50}< 10	Moderadamente tóxico
10 <CE_{50}<100	Pouco tóxico
CE_{50}>100	Praticamente não-tóxico

Fonte: Adaptado de Zucker (1985).

5.2.4.1 Avaliação de risco ambiental agudo

A avaliação de risco dos antidepressivos estudados foi determinada de acordo com o quociente de risco (RQ – do inglês *risk quotient*) que é calculado pela razão entre a concentração ambiental medida (MEC – do inglês *Measured Environmental Concentration*) e a concentração sem efeitos previsíveis (PNEC – do inglês *Predicted No-Effect Concentration*). A PNEC foi determinada para toxicidade aguda, usando o valor de CE_{50} dividido por um fator de avaliação de 1000 (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2006; KOSMA et al., 2020; PAPAGEORGIOU; KOSMA; LAMBROPOULOU, 2016).

Assim, após calculado o RQ cada antidepressivo recebeu uma das seguintes classificações: RQ ≥ 1 alto risco ecológico; RQ entre 0,1 e 1 risco médio; RQ entre 0,01 e 0,1 risco baixo ou insignificante (KOSMA et al., 2020; PAPAGEORGIOU et al., 2016).

5.2.5. Teste de toxicidade crônica em Daphnia magna

Os testes crônicos foram realizados seguindo normas nº 211 da *Organization for Economic and Development* (OECD, 2012), e a norma ABNT 13373:2017 com algumas adaptações.

Os neonatos de *D. magna* com idade ente 2 e 26 horas, obtidos por partenogênese de fêmeas adultas com idade entre 10 dias a 60 dias, foram colocados individualmente em recipiente de poliestireno com capacidade de 100 mL. As concentrações utilizadas no teste foram as maiores detectadas ambientalmente no Rio Piracicaba - SP de cada um dos antidepressivos estudados: VEN 2,57 ng L^{-1}; CIT 1,73 ng L^{-1}; FLU 2,71 ng L^{-1}; SER 4,48 ng L^{-1}. As substâncias foram combinadas de forma que se obteve misturas binárias, terciárias e quaternária, conforme segue:

- Binárias: VEN.CIT; VEN.FLU; VEN.SER; CIT.FLU; CIT.SER; FLU.SER.
- Terciárias: VEN.CIT.FLU; VEN.CIT.SER; CIT.FLU.SER.
- Quaternária: VEN.CIT.FLU.SER

Para cada concentração de antidepressivo puro e suas misturas, foram feitas 10 réplicas, que foram diluídas no meio M4. O controle (branco) foi mantido no meio de cultivo M4, também com 10 réplicas.

Os recipientes foram conservados a 20 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro. O teste durou 21 dias, no qual ocorreu a troca das soluções três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) e a alimentação administrada diariamente na quantidade de $1x10^7$ células $mL^{-1}dia^{-1}$ com a alga *P. subcapitata*.

Durante o período do teste foram analisados três *endpoints*, sendo sobrevivência, reprodução, tamanho dorsal e ventral de cada organismo. As avaliações de sobrevivência e de reprodução ocorreram diariamente. Os neonatos gerados eram contabilizados e descartados. Os tamanhos dorsal e ventral individual de cada *D. magna* foi verificada no 21º dia (último) do experimento, em que os organismos foram fotografados e sua medição realizada através das imagens utilizando o *software* Fiji.

A análise descritiva das características sobrevivência, reprodução, tamanho ventral e dorsal foram realizados no *software R version 4.0.4***.** Na avaliação foram considerados os valores de média e desvio-padrão (DP) dentro de cada tratamento. Valores superiores a 3 vezes o desvio-padrão em relação à média foram considerados *outliers* e retirados das análises. O efeito do tratamento sobre as variáveis avaliadas

foi obtido por meio da análise de variância de uma via (ANOVA One-Way), seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparação das médias de cada nível dos tratamentos. O modelo estatístico utilizado na análise de variância está representado pela Equação 1

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Em que: y_{ij} = variável resposta j do tratamento i; μ = média geral; τ_i = efeito fixo do tratamento i; ε_{ij} = resíduo aleatório.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Teste de sensibilidade em Daphnia magna

Foram realizados vinte testes de sensibilidade com a *D. magna* utilizando a substância de referência $K_2Cr_2O_7$. As avaliações foram intercaladas entre os experimentos com os antidepressivos. O valor médio obtido para sensibilidade, CE_{50}, 24h foi de 0, 63 mg L^{-1} com DP de 0,09 e desvio padrão relativo (DPR) de 14,9%, valores estes que em conformidade com a norma ISO 6341 e NBR 12713 (2016) (Figura 5.1). De acordo com tais resultados, os organismos-testes cultivados no laboratório mostraram-se aptos para serem utilizados nos testes de toxicidade.

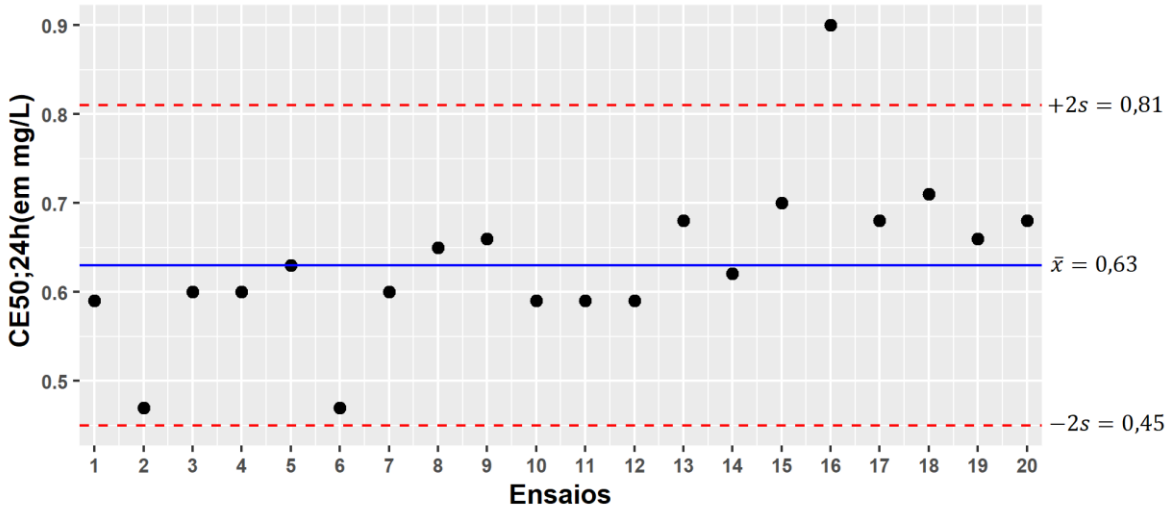


Figura 5.1. Relação da concentração de $K_2Cr_2O_7$ ao longo de 20 ensaios. Em azul o valor da média dos resultados dos ensaios de sensibilidade e em vermelho o valor da média o desvio-padrão mais duas vezes o valor médio

5.3.2. Teste de toxicidade aguda em Daphnia magna

A Tabela 5.4 apresenta os resultados de CE_{50}, DP e intervalo de confiança (IC) para os testes agudos individuais. A SER foi o antidepressivo que se demonstrou mais tóxico entre os quatros fármacos estudados, apresentando o CE_{50} de 0,34 mg L^{-1} e DP de 0,04. O CE_{50} da FLU foi de 3,77 mg L^{-1} e DP de 0,43. Seguido pelo CIT com CE_{50} de 6,96 mg L^{-1} e DP de 0,99. Por fim a VEN obteve CE_{50} de 36,15 96 mg L^{-1} e DP de 1,45.

Tabela 5.4 - Estimativa da concentração que afeta 50% da população de animais expostos (CE_{50}) nos fármacos VEN, CIT, FLU e SER e os respectivos desvios-padrão e intervalo de confiança superior e inferior usando o método delta

Antidepressivo	CE_{50}	DP	IC	
			Inferior	Superior
Venlafaxina	36,15	1,45	33,30	39,00
Citalopram	6,96	0,99	5,02	8,90
Fluoxetina	3,77	0,43	2,92	4,62
Sertralina	0,34	0,04	0,25	0,42

DP: Desvio-padrão; **IC**: Intervalo de confiança

Segundo Zucker (1985) a SER se enquadra na classificação “muito tóxico”, a FLU e o CIT “moderadamente tóxico”, e a VEN “pouco tóxico” (Tabela 5.3).

Na Figura 5.2 é possível observar a porcentagem de efeito observado em 50% da população de *D. magna* em função das concentrações de exposição para os antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER.

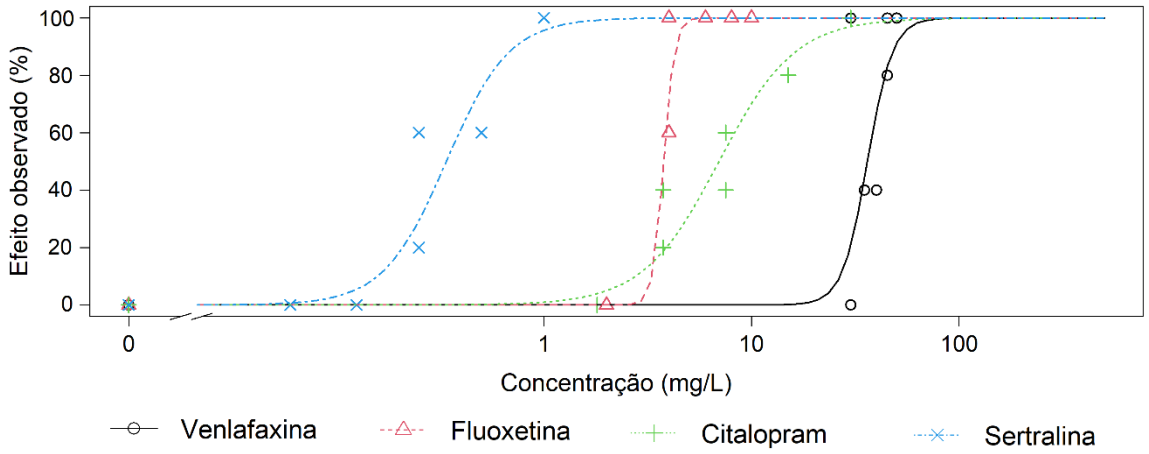


Figura 5.2 - Porcentagem de efeito observado em função da concentração de exposição

As substâncias SER e o CIT possuem curvas com inclinação semelhante, indicando provavelmente, o mesmo mecanismo de ação, apesar da SER consistir como a substância mais tóxica em concentrações mais baixas. A inclinação da curva da VEN e FLU reflete um mecanismo de ação distinto das demais substâncias, principalmente a FLU não apresentou inclinação. Segundo Rand et al. (1995) uma curva menos inclinada pode apresentar uma substância cujos efeitos tóxicos se manifestam algum tempo após a exposição, ou uma substância que tem absorção deficiente ou, ainda, com rápida excreção ou destoxificação; já uma curva com maior inclinação pode indicar rápida absorção, com rápida manifestação dos efeitos tóxicos.

Ao avaliar o impacto de oito antidepressivos pertencentes a inibidores seletivos da recaptação da serotonina ou inibidores da recaptação da serotonina norepinefrina pela combinação de abordagens múltiplas (*in vivo, in vitro, in silico*) Minguez et al. (2014) obteve o CE_{50} para VEN de 141,28 mg $L^{-1.}$ O CE_{50} utilizado no trabalho de Papageorgiou et al (2016) foi de 38 mg L^{-1}. Já na ficha de informação de segurança de produto químico o CE_{50} para *D. magna* da VEN é de 38 mg L^{-1} (MERCK, 2021), tal valor está em concordância ao que foi alcançado neste estudo.

O valor de CE_{50} para o CIT apresentado neste estudo não foi concordante com o obtido por Christensen et al. (2007) e Minguez et al. (2014) 20 mg L^{-1} e 30,14 mg L^{-1} respectivamente.

Brooks et al. (2003) avaliaram o potencial de toxicidade aquática da FLU e obteve o CE_{50} para *D. magna* de 820 µg L^{-1}. Já Christensen et al. (2007) obtiveram o CE_{50} de 6,4 mg L^{-1}. Minguez et al. (2014) obtiveram CE_{50} para FLU de 5,91 mg L^{-1}, valor este aproximado ao que foi obtido neste estudo.

O valor de CE_{50} para SER que foi determinado neste trabalho ficou um pouco abaixo dos relatados nos estudos de Minguez et al. (2014), Minagh et al. (2009) e Christensen et al. (2007) 1,5 mg L^{-1}, 1,3 mg L^{-1} e 0,92 mg L^{-1} respectivamente. Mas ficou um pouco acima dos 0,12 mg L^{-1} relatado por Santos et al. (2010).

Os testes agudos conduzidos com a mistura dos antidepressivos nas concentrações ambientais encontradas no Rio Piracicaba não apresentaram organismos mortos ou imóveis no período de 48h, assim não foi possível elaborar o cálculo do CE_{50} para estas concentrações.

5.3.2.1. Avaliação de risco ambiental agudo

A avaliação do RQ foi realizada com os dados obtidos das maiores concentrações determinadas no Rio Piracicaba, SP, para cada substância, utilizando o CE_{50} do organismo *D. magna*. Os valores estão ilustrados na Figura 5.3.

De acordo com os valores calculados de RQ os antidepressivos estudados não apresentam risco ambiental agudo para invertebrados, isso se deve principalmente as baixas concentrações detectadas. A SER foi a substância que obteve um RQ mais elevado (entre 0,01 e 0,1) se enquadrando na classificação de “risco baixo ou insignificante”.

Vale destacar que o teste agudo com outros organismos que compõe o ecossistema como peixes, moluscos, algas etc, são necessários. Ainda, ressalta-se que a toxicidade aguda relacionada as misturas dos antidepressivos, pode ser maior do que a toxicidade proporcionada por uma única substância devido às ações sinérgicas. Portanto, são necessários mais estudos para uma melhor avaliação e entendimento dos riscos ambientais agudos dessas substâncias no ambiente.

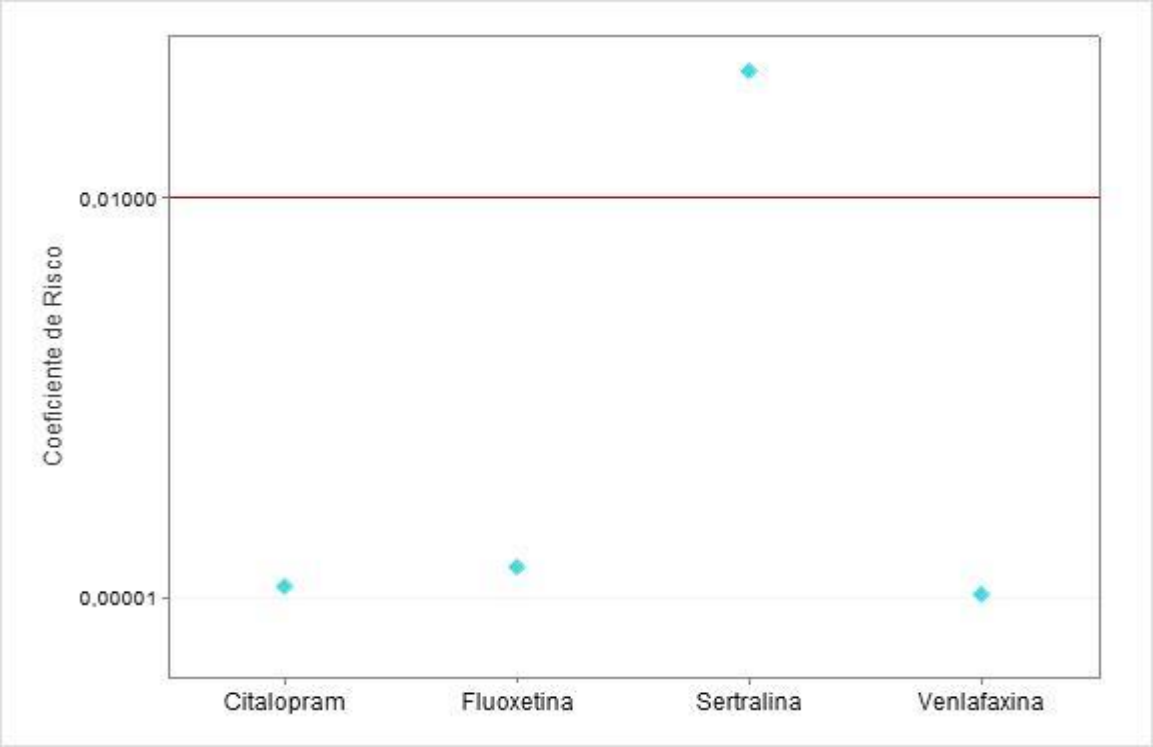


Figura 5.3 - Quociente de risco de quatro antidepressivos determinado a partir das concentrações detectadas no Rio Piracicaba, SP para *D. magna*

5.3.3. Teste de toxicidade crônica em Daphnia magna

Na análise descritiva das características sobrevivência, reprodução, tamanho ventral e dorsal, o resíduo do modelo de regressão foi considerado normal segundo o teste de Shapiro-Wilk e sua variância homocedástica pelo teste de Levene. A variável sobrevivência não atingiu as pressuposições para realização de uma ANOVA, já que no controle não houve morte de organismos, e nos outros tratamentos a letalidade dos organismos utilizados no ensaio foi de 5% (o que está de acordo com a norma).

Na Figura 5.4 e Tabela 5.5 são apresentados os dados obtidos de reprodução da *Daphnia magna* para o ensaio crônico dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER, nas concentrações ambientais determinadas no Rio Piracicaba, SP.

O tratamento “Branco” refere-se ao controle utilizado no ensaio, no qual foi utilizado apenas o meio M4. O número de vezes que a fêmea liberou ovos (postura) foram quatro, onde a primeira liberação ocorreu no 9º dia de exposição. A média de filhotes foi de 22,44. O amadurecimento sexual de *D. magna* ocorre entre o sexto e o décimo dia de vida e o número de posturas esperado é de três a cinco, a média de filhotes no final de 21 dias deve ser igual ou superior a 20, tais informações

estão de acordo com o que foram obtidas neste trabalho (RAND, 1995; TERRA; FEIDEN, 2003).

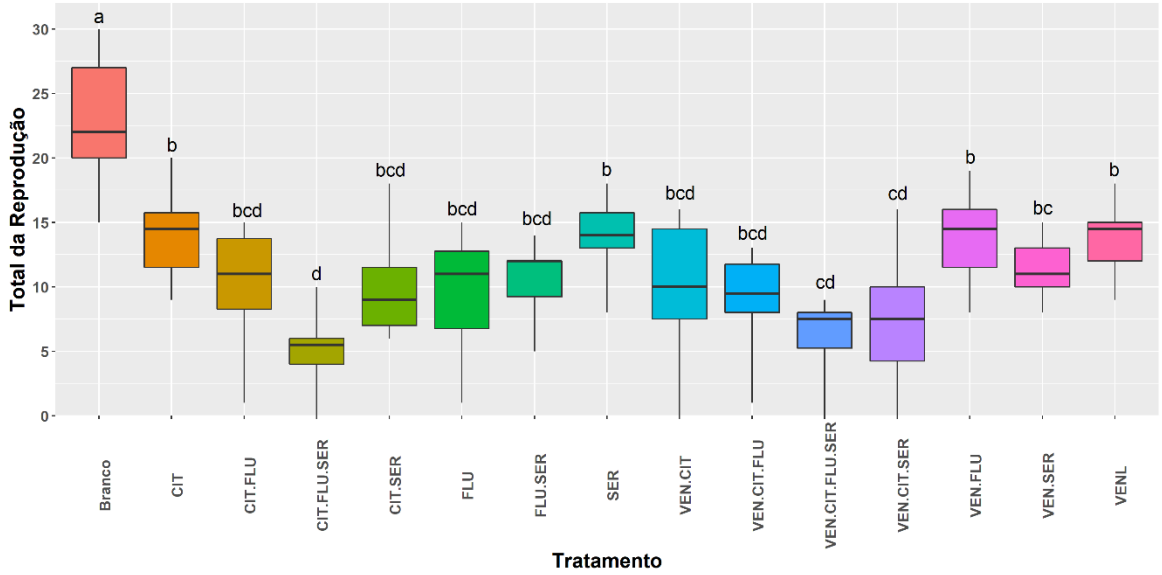


Figura 5.4 - Reprodução da *Daphnia magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER

Tabela 5.5 - Análise descritiva da reprodução da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER

Tratamento	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
Branco	10	22,44	4,98	15	30	a
CIT	10	14,00	3,37	9	20	b
CIT.FLU	10	10,40	4,35	1	15	bcd
CIT.FLU.SER	10	5,30	2,87	0	10	d
CIT.SER	10	9,80	3,91	6	18	bcd
FLU	10	9,60	4,58	1	15	bcd
FLU.SER	10	10,50	3,27	5	14	bcd
SER	10	13,80	2,82	8	18	b
VEN.CIT	10	10,00	5,08	0	16	bcd
VEN.CIT.FLU	10	8,80	4,05	1	13	bcd
VEN.CIT.FLU.SER	10	6,40	2,63	0	9	cd
VEN.CIT.SER	10	7,40	4,62	0	16	cd
VEN.FLU	10	13,80	3,39	8	19	b
VEN.SER	9	11,44	2,46	8	15	bc
VENL	10	13,80	3,05	9	18	b

n: número de observações; **DP**: Desvio-padrão; **Max**: valor máximo; **Min**: valor mínimo; **Tukey**: considerando diferença significativa ($p<0,05$).

Todos os tratamentos, individuais e misturas foram estatisticamente diferentes do controle, ou seja, ocorreu a redução do número de neonatos gerados. Os tratamentos que mais se afastaram do controle foram CIT.FLU.SER; VEN.CIT.SER; VEN.CIT.SER e VEN.CIT.FLU.SER. Entre os tratamentos primários VEN, CIT, FLU e SER, estatisticamente, não foi constatada diferença significativa na reprodução.

Ao contrapor o tratamento primário VEN com os outros tratamentos, no qual está substância aparece, houve uma diferença estatística de reprodução em relação às misturas VEN.CIT.SER e VEN.CIT.FLU.SER. O tratamento primário CIT apresentou diferença significativa do tratamento quaternário VEN.CIT.FLU.SER e terciários CIT.FLU.SER e VEN.CIT.SER. A comparação do tratamento primário FLU com suas devidas misturas (secundárias, terciárias e quaternárias) não resultou em diferença estatística para a reprodução. Os resultados obtidos na comparação do tratamento primário SER são semelhantes aos apresentados pelo CIT, em que ocorreu diferença significativa na reprodução com os tratamentos CIT.FLU.SER; VEN.CIT.SER; VEN.CIT.FLU.SER.

Cabe salientar, que nos tratamentos individuais e suas misturas alguns não tiverem diferença estatística significativa entre si, porém ocorreu redução no número total de indivíduos na reprodução, este fator é de extrema preocupação visto que tal redução pode comprometer a perpetuação da espécie em ambientes que contenham os antidepressivos estudados.

A Figura 5.5 representa a medição no *software* Fiji do tamanho dorsal e ventral da *D. magna*, realizada no 21º dia do experimento.

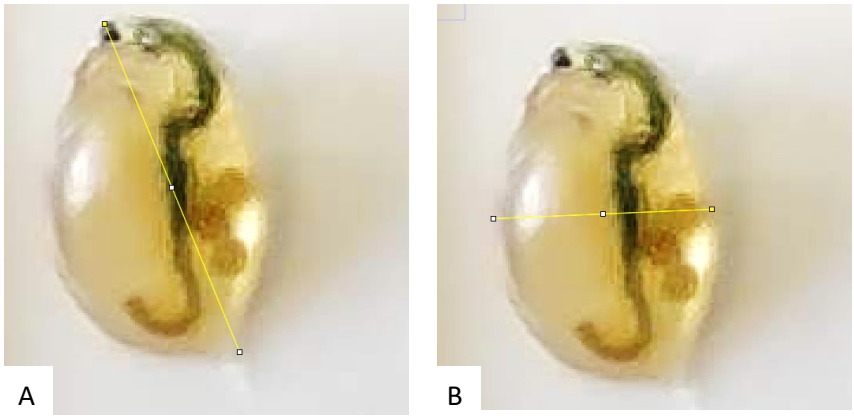


Figura 5.5 Medição do tamanho A) dorsal e B) ventral da *D. magna* no 21º dia utilizando o *software* Fiji.

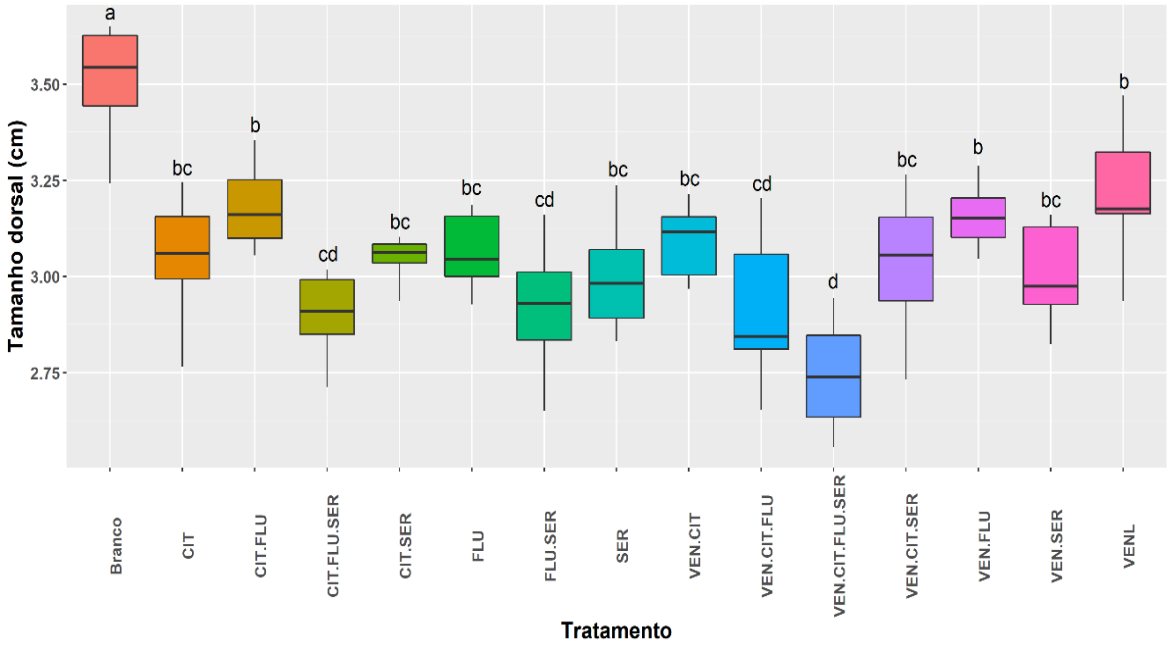


Figura 5.6 - Tamanho dorsal da *Daphnia magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU

Na Figura 5.6 e Tabela 5.6 são apresentados os dados obtidos para a análise do tamanho dorsal do organismo *D. magna* quando expostos ao antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER nas concentrações ambientais determinadas no Rio Piracicaba, SP.

Observa-se que nenhum dos tratamentos foi estatisticamente semelhante ao controle. Entre as substâncias VEN, CIT, FLU e SER não ocorreu diferença significativa entre o tamanho dorsal.

O tratamento primário VEN foi estatisticamente diferente ao tratamento terciário VEN.CIT.FLU e quaternário VEN.CIT.FLU.SER. Os tratamentos primários CIT, FLU e SER apresentaram distinção estatística do tratamento quaternário VEN.CIT.FLU.SER.

Tabela 5.6 - Análise descritiva do tamanho dorsal da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER

Tratamento	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
Branco	10	3,50	0,15	3,24	3,65	a
CIT	10	3,06	0,15	2,77	3,25	bc
CIT.FLU	10	3,18	0,10	3,06	3,35	b
CIT.FLU.SER	8	2,90	0,11	2,71	3,02	cd
CIT.SER	8	3,05	0,06	2,94	3,10	bc
FLU	8	3,06	0,10	2,93	3,18	bc
FLU.SER	10	2,93	0,16	2,65	3,16	cd
SER	8	3,00	0,14	2,83	3,24	bc
VEN.CIT	9	3,09	0,09	2,97	3,21	bc
VEN.CIT.FLU	9	2,91	0,20	2,65	3,20	cd
VEN.CIT.FLU.SER	9	2,73	0,13	2,56	2,94	d
VEN.CIT.SER	8	3,04	0,18	2,73	3,27	bc
VEN.FLU	10	3,15	0,08	3,04	3,29	b
VEN.SER	8	3,00	0,13	2,82	3,16	bc
VENL	9	3,22	0,20	2,94	3,47	b

n: número de observações; **DP**: Desvio-padrão; **Max**: valor máximo; **Min**: valor mínimo; **Tukey**: considerando diferença significativa (p<0,05).

Em relação ao tamanho ventral da *D. magna* a maioria dos tratamentos foram significativamente iguais ao controle, com exceção do CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER (Figura 5.7 E Tabela 5.7).

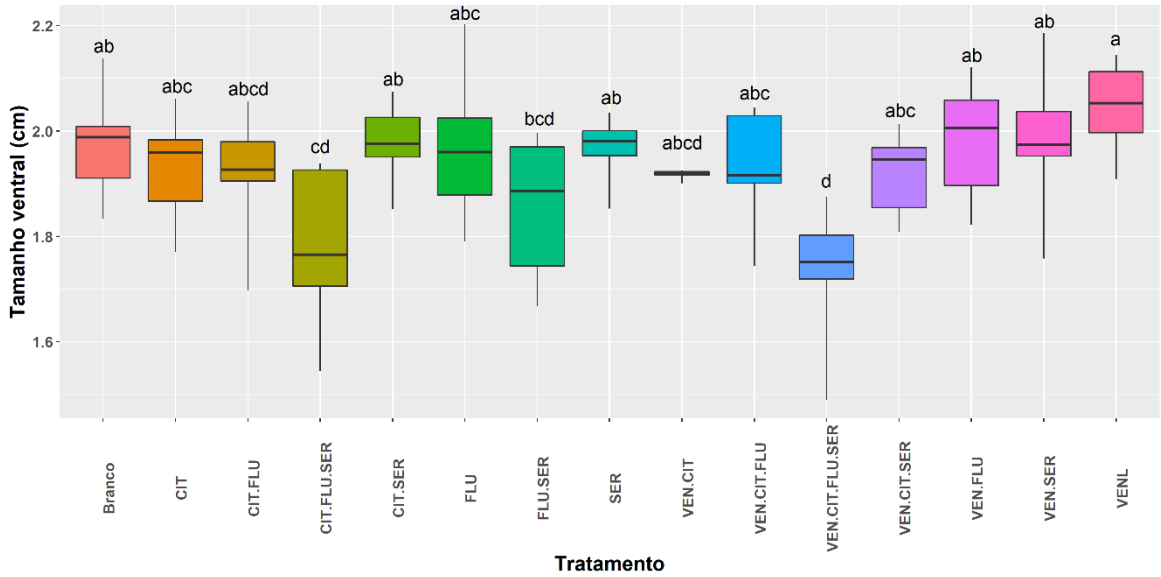


Figura 5.7 - Tamanho ventral da *D. magna* durante 21 dias quando exposta aos tratamentos primários, secundários, terciário e quaternário dos antidepressivos VEN, CIT, FLU e SER

Tabela 5.7. Análise descritiva da variável tamanho ventral

Tratamento	n	Média	DP	Min	Max	Tukey
Branco	10	1,97	0,10	1,83	2,14	ab
CIT	10	1,93	0,09	1,77	2,06	abc
CIT.FLU	10	1,92	0,10	1,70	2,06	abcd
CIT.FLU.SER	8	1,78	0,14	1,54	1,94	cd
CIT.SER	10	1,98	0,07	1,85	2,08	ab
FLU	8	1,96	0,14	1,79	2,20	abc
FLU.SER	10	1,85	0,13	1,67	2,00	bcd
SER	8	1,97	0,06	1,85	2,04	ab
VEN.CIT	5	1,92	0,01	1,90	1,93	abcd
VEN.CIT.FLU	9	1,93	0,09	1,74	2,04	abc
VEN.CIT.FLU.SER	9	1,74	0,12	1,49	1,88	d
VEN.CIT.SER	8	1,92	0,07	1,81	2,01	abc
VEN.FLU	10	1,98	0,10	1,82	2,12	ab
VEN.SER	8	1,99	0,13	1,76	2,19	ab
VENL	8	2,04	0,09	1,91	2,14	a

n: número de observações; **DP**: Desvio-padrão; **Max**: valor máximo; **Min**: valor mínimo; **Tukey**: considerando diferença significativa ($p<0,05$).

A exposição crônica de *D. magna* a SER resultou na redução do número médio de descendentes produzidos em um período de 21 dias, a concentração de efeito não observado (CENO) foi de 0,032 mg L^{-1} e a concentração de efeito observado CEO 0,1 mg L^{-1} (MINAGH et al, 2009). Em um estudo de para avaliar os efeitos transgeracionais de dois antidepressivos SER e VEN na reprodução da *D. magna* a SER aumentou a fecundidade na concentração de 30 µg $L^{-1.}$ No mesmo estudo foi observado que a SER ficou bioacumulada nas algas utilizadas para alimentação dos dáfnídios, ou seja, os organismos estavam expostos diretamente por meio de seu ambiente quanto indiretamente por meio de sua alimentação (MINGUEZ et al., 2015) Ao avaliar os efeitos crônicos da SER em *Gammarus locusta* nas concentrações de 8 ng L^{-1}, 40 ng L^{-1} e 200 ng L^{-1} não foi detectado mudanças significativas na sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de movimento (NEUPARTH et al., 2019).

A VEN pode afetar as respostas, comportamentos e reprodução dos invertebrados (PARROTT; METCALFE, 2017). A exposição a VEN reduziu significativamente a fecundidade da *Daphnia magna* de maneira transitória a 0,3 e 30 µg L^{-1} e durante todo o experimento a 100 µg L^{-1} (MINGUEZ et al., 2015). Na concentração de 0,1 µg L^{-1} Chocos neonatos (*Sepia officinalis*) expostos por 20 dias tiveram capacidade de camuflagem reduzida (BIDEL et al*.,* 2016). A exposição

a VEN em concentrações ambientalmente relevantes de 0,88 e 8,8 µg L^{-1} não causou efeitos adversos em *Pimephales promelas* (PARROTT e METCALFE, 2017).

A exposição crônica a FLU na concentração de 36 µg L^{-1} aumentou significativamente a fecundidade de *Daphnia magna* (FLAHERTY; DODSON, 2005). O CEO para FLU no estudo de Péry et al. (2008) foi de 31 µg L^{-1}, no mesmo estudo FLU alterou o comprimento do neonato de *Daphnia magna*. A diminuição na reprodução em *Ceriodaphnia dubia* após a exposição a FLU, foi relatada por Brooks et al. (2003) o CENO foi de 56 µg L^{-1} e o CEO 112 µg L^{-1}. Ao expor a *Sepia officinalis* a FLU na concentração de 1 ng L^{-1}, o organismo exibiu uma diminuição na eficiência da camuflagem e mostrou um aumento significativo na frequência de comportamentos de escavação da areia, o que pode torná-los altamente visíveis aos predadores na natureza (DI POI et al., 2014).

A CEO do CIT foi de 4,0 mg L^{-1} sendo capaz de reduzir a reprodução da *Ceriodaphnia dubia* (HENRY et al., 2004). Em um estudo de Fong e Roy (2012) o CIT e a VEN foram responsáveis pelo descolamento do pé do substrato em caracóis de água doce, a CEO para VEN foi de 313 pg L^{-1} e para CIT a CEO foi de 405 pg L^{-1}. O CIT foi detectado em cérebro de *Catostomus commersoni* em concentração de 0,07 ng g^{-1} (SCHULTZ et al., 2010).

Os dados apresentados neste estudo divergem das informações relatadas em outros trabalhos, os efeitos na reprodução e tamanho dos organismos obtidos foram na faixa de ng L^{-1}, na literatura os efeitos observados estão em concentrações maiores. Tais diferenças se devem a muitas variáveis como diferentes clones ou espécies de *Daphnia*, pH da solução de teste, o fornecedor das substâncias, a preparação química e a expressão das concentrações (por exemplo, concentrações nominais ou efetivas) (MINGUEZ et al., 2015).

Os resultados demonstram que os antidepressivos possuem efeitos adversos na biota aquática mesmo em baixas concentrações. A mistura dos fármacos, principalmente CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER propiciou os efeitos que mais se afastaram do controle tanto na reprodução quanto no tamanho dos organismos. Tal fator é de extrema preocupação, visto que tais substâncias podem gerar um desequilíbrio no ambiente, além de se biocumular nos organismos desencadeando a biomagnificação em níveis tróficos mais elevados.

Vale ressaltar que no ecossistema aquático existem muitas outras variáveis que devem ser levadas em consideração para análise dos reais efeitos dos antidepressivos, estes que podem ter seus efeitos potencializados ou não pela sinergia, visto que neste ambiente existem muitos outros tipos de medicamentos, pesticidas, organismos em decomposição, materiais em suspensão – galhos, folhas, plásticos, etc. Contudo, os resultados aqui apresentados são o primeiro passo quanto ao entendimento de como se dá comportamento da VEN, CIT, FLU e SER e suas misturas no ambiente.

5.4. Conclusões

O teste de sensibilidade em *D. magna* demonstrou que o organismo estava apto para realização dos testes agudos e crônicos. O CE_{50} de cada substância individualmente foi calculado. A SER foi considerada a mais tóxica entre os quatro antidepressivos testados. A FLU e o CIT foram classificados como moderadamente tóxico e a VEN pouco tóxico. Os antidepressivos não apresentaram risco ambiental agudo para invertebrados, de acordo com o quociente de risco. Os testes agudos conduzidos com a mistura dos antidepressivos nas concentrações ambientais encontradas no Rio Piracicaba não apresentaram organismos mortos ou imóveis no período de 48 horas.

Os testes crônicos realizados com as concentrações ambientais, demonstraram efeitos na reprodução e tamanho dorsal da *D. magna*, tanto os realizados com a substância individual quanto suas misturas. O tamanho ventral do organismo não foi afetado pela exposição individual das substâncias, porém mistura dos fármacos CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER propiciou os efeitos que mais se afastaram do controle. A variável sobrevivência não atingiu as pressuposições para avaliação estatística, dado que a mortalidade no ensaio foi de 5%.

A descarga constante desses fármacos no ambiente aquático pode levar a efeitos adversos ao longo do tempo, assim o monitoramento de longo prazo é imprescindível. Contudo, é necessária a realização de mais trabalhos com os antidepressivos, para a determinação do CE_{50}, CENO, CEO e RQ de suas misturas, além da utilização de outros organismos testes, a interação com outros medicamentos, pesticidas, materiais em suspensão e sedimentos para que

assim, possamos entender o real impacto que essas moléculas causam no ecossistema aquático.

Referências

ABREU, M. S. et al. Dopamine and serotonin mediate the impact of stress on cleaner fish cooperative behavior. **Hormones and Behavior**, v. 125, art.104813, 2020.

ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B. Pulgas-de-água (*Daphnia spp*.). **Revista Ciência Elementar**, v. 5, n. 4, p. 50, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR12713 de 05/2016.** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera) Aquatic. 4. ed. São Paulo, 2016.

BIDEL, F. et al. The antidepressant venlafaxine may act as a neurodevelopmental toxicant in cuttlefish (Sepia officinalis). **NeuroToxicology**, v. 55, p. 142-153, 2016.

BIDWELL, J. R. In vivo ecotoxicology models. In: POPE, C. N.; LIU, J. (Ed.). **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 507-523.

BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost- effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 352-359, 2000. Special Issue.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 194-205, 2017.

BROOKS, B. W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 169-183, 2003.

BROOKS, B. W. et al. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. **Chemosphere**, v. 52, n. 1, p. 135-142, 2003.

BYEON, E. et al. Two antidepressants fluoxetine and sertraline cause growth retardation and oxidative stress in the marine rotifer Brachionus koreanus. **Aquatic Toxicology**, v. 218, art. 105337, 2020.

CHRISTENSEN, A. M. et al. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 85-91, 2007.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA - CFF. **Venda de medicamentos psiquiátricos cresce na pandemia**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <http://covid19.cff.org.br/venda-de-medicamentos-psiquiatricos-cresce-na-pandemia/> Acesso em: 05 mar. 2021.

DI POI, C. et al. Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 36-45, 2014.

DING, J. et al. Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in *Daphnia magna.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 102-109, 2017.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: RIMA, 2008. p. 153-184.

DUARTE, I. A. et al. Depressed, hypertense and sore: long-term effects of fluoxetine, propranolol and diclofenac exposure in a top predator fish. **Science of the Total Environment**, v. 712, art. 136564, 2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. **Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use**. London, 2006. 12 p. (EMEA/CHMP/SWP/4447/00).

EVANGELISTA, P. A. et al. Optimization of a methodology for simultaneous determination of four antidepressants present in fresh water by high efficiency liquid chromatography. **Reget**, v. 24, n. 8, p. 1-20, 2020.

FICK, J. et al. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, 2009.

FLAHERTY, C. M.; DODSON, S. I. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 200-207, 2005.

FONG, P. P. et al. Short-term exposure to tricyclic antidepressants delays righting time in marine and freshwater snails with evidence for low-dose stimulation of righting speed by imipramine. **Environmental Science Pollution Research**, v. 26, p. 7840-7846, 2019.

FONG, P. P.; HOY, C. M. Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 45, n. 2, p. 145-153, 2012.

HENRY, T. B. et al. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2229–2233, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. **Water Quality** - Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – Crustacea). Geneva, 1996. (ISO 6341:1996).

KIM, Y. et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, v. 33, n. 3, p. 370-375, 2007.

KOSMA, C. I. et al. Assessment of multiclass pharmaceutical active compounds (PhACs) in hospital WWTP influent and effluent samples by UHPLC-Orbitrap MS: Temporal variation, removals and environmental risk assessment. **Environmental Research**, v. 191, art. 110152, 2020.

MEJÍAS, C. et al. Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: A review on their distribution and environmental risk assessment. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 30, e00125, 2021.

MERCK. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. **Venlafaxine Hydrochloride**. San Luis, Missouri, 2021. 9 p. (Millipore- 5.06135). Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/Web-AT-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=EMD_BIO-506135&DocumentType=MSD&DocumentId=506135_SDS_BR_Z9.PDF&DocumentUID=209124289&Language=Z9&Country=BR&Origin=null> Acesso em: 09 abr. 2021.

MINAGH, E. et al. Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 434-440, 2009.

MINGUEZ, L. et al. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? **Chemosphere**, v. 108, p. 314-319, 2014.

MINGUEZ, L. et al. Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p.1148–1155, 2015.

NEUPARTH, T. et al. Does the antidepressant sertraline show chronic effects on aquatic invertebrates at environmentally relevant concentrations? A case study with the keystone amphipod, *Gammarus locusta.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, art. 109486, 2019.

NKOOM, M. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 11-18, 2019.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidelines for testing of chemicals**: Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Paris, 2012.

PAPAGEORGIOU, M.; KOSMA, C.; LAMBROPOULOU, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 547–569, 2016.

PARK, N.; JEON, J. Emerging pharmaceuticals and industrial chemicals in Nakdong River, Korea: Identification, quantitative monitoring, and prioritization. **Chemosphere**, v. 263, art. 128014, 2021.

PARROT, J. L.; METCALFE, C. D. Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 403-411, 2017.

PÉRY, A. R. R. et al. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. **Chemosphere**, v. 73, p. 300-304, 2008.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology** – Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. London: Taylor & Francis, 1995. p. 3-67.

RITZ, C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 29, p. 220-229, 2010.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 302-316, 2013.

SCHLÜSENER, M. P. et al. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 247-256, 2015.

SCHULTZ, M. M. et al. Antidepressant Pharmaceuticals in Two US Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1918-1925, 2010.

SEHONOVA, P. et al. Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. **Environmental Pollution**, v. 254, pt. A, art. 112999, 2019.

SILVA, L. J. G. et al. Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. **Environmental Pollution**, v. 197, p. 127-143, 2015.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia magna Straus* 1820 (Crustacea: Cladocera) under different hardness conditions. **Acta Limnologica Brasilis**, v. 15, n. 2, p. 51-55, 2003.

TKACZYK, A. et al. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. **Science of the Total Environment**, v. 763, art. 143038, 2021.

WAWRYNIUK, M.; PIETZAK, A.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G. Evaluation of direct and indirect photodegradation of mianserin with high-performance liquid chromatography and short-term bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 144-151, 2015.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. 2. ed. São Carlos: RIMA, 2008.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division. **Standard evaluation procedure**: Acute toxicity test for freshwater fish. Washington, DC: USEPA, 1985. (EPA 540/9-85-006).

ZURITA, J. L. et al. Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 106-115, 2007.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a ocorrência de antidepressivos residuais como a FLU, CIT, VEN e SER em amostras de água coletadas em quatro pontos Rio Piracicaba, SP, bem como analisou os efeitos ecotoxicológicos agudos e crônicos no organismo *Daphnia magna* quando exposto a concentrações ambientais de cada substância e suas misturas, determinou o CE_{50} de cada substância e calculou o quociente de risco para o teste agudo.

A metodologia para detecção dos antidepressivos foi adaptada e validada de acordo com as recomendações da Anvisa. O método se mostrou exato e preciso, permitindo assim a determinação dos compostos FLU, CIT, VEN e SER.

Todos os antidepressivos estudados foram detectados e a faixa de concentração determinada variou de 1,0 a 4,48 ng L^{-1}. Em alguns pontos foi detectado a presença dos antidepressivos FLU e a SER durante os sete dias de coleta.

Na classificação efetuada quanto a toxicidade aguda, a FLU e o CIT foram classificados como moderadamente tóxicos, a VEN pouco tóxica e a SER foi considerada muito tóxica. O quociente de risco calculado com base no teste agudo sugere que as substâncias nas concentrações ambientais determinadas não oferecem risco agudo para os organismos. Isto é confirmado pelo teste agudo individual e com a mistura dos antidepressivos sob concentrações ambientais, que não apresentaram organismos mortos ou imóveis.

Os testes crônicos demonstraram efeitos na reprodução e tamanho dorsal da *Daphnia magna* quando expostos as concentrações ambientais, tanto os realizados com a substância individual quanto suas misturas. O tamanho ventral organismo não foi afetado pela exposição das substâncias testadas individualmente, porém o ensaio utilizando a mistura dos fármacos CIT.FLU.SER e VEN.CIT.FLU.SER propiciou os efeitos que mais se afastaram do controle.

Diante do exposto, foi averiguado que as águas do Rio Piracicaba, SP estão contaminadas com os antidepressivos alvo desse estudo, mesmo que em baixas concentrações. Quantidades estas que podem acarretar danos na biota local, que é exposta constantemente a tais contaminantes e muitos outros que são lançados diariamente no corpo d’água.

Contudo, espera-se que esta pesquisa possa contribuir com o despertar do interesse das autoridades ambientais, para que haja um aprofundamento nos estudos ecotoxicológicos e melhor caracterização dos riscos associados à introdução contínua dessas substâncias no ambiente, para que assim ocorra a inclusão desses compostos nos programas de monitoramento e na legislação ambiental do país. Entretanto, os resultados apresentados são apenas o início do entendimento sobre a ocorrência e efeitos dos antidepressivos no ambiente, visto que o ecossistema aquático é um meio complexo e muitas variáveis ainda precisam ser estudadas.