UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE

VIVIANE DA SILVA CARVALHO

Identificação e avaliação toxicológica dos subprodutos de desinfecção da clorexidina

São Paulo
2022

VIVIANE DA SILVA CARVALHO

Identificação e avaliação toxicológica dos subprodutos de desinfecção da clorexidina

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade.

Área de Concentração:

Sustentabilidade

Orientador:

Profa. Dra. Renata Colombo

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, com os dados inseridos pelo(a) autor(a)
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Carvalho, Viviane da Silva
Identificação e avaliação toxicológica dos subprodutos de desinfecção da clorexidina / Viviane da Silva Carvalho; orientadora, Renata Colombo. -- São Paulo, 2022.
80 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2022.
Versão corrigida

1. Biocidas. 2. DBPs. 3. Cloração. 4. Contaminantes emergentes. 5. QSAR. I. Colombo, Renata, orient. II. Título.

Nome: CARVALHO, Viviane da Silva

Título: Identificação e avaliação toxicológica dos subprodutos de desinfecção da clorexidina

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade.

Área de Concentração:

Sustentabilidade

Aprovado em: 22 / 03 / 2022

Banca Examinadora

Prof. Dr.	Marcelo Nolasco	Instituição:	USP
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	
Prof. Dr.	Káthia Honorio	Instituição:	USP
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	
Prof. Dr.	Mauro Santos	Instituição:	UFABC
Julgamento:	Aprovado	Assinatura:	

Dedico essa dissertação a todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha mãe Maria, ao meu pai Osvaldo e à minha irmã Vanessa que são a minha base, sempre me apoiaram e incentivaram a correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço aos meus familiares, em especial meu tio José Carlos, minha tia Margarete e meus primos Amanda, Diego, Karine e Thiago que sempre me incentivaram nos estudos e estiveram presentes no decorrer da minha jornada.

Agradeço ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado, sendo uma pessoa atenciosa e paciente.

Agradeço aos meus amigos de vida, alguns dos quais tenho mais de 20 anos de amizade, por sempre estarem comigo nos momentos bons e ruins, me dando conselhos.

Agradeço aos meus amigos da graduação que estiveram comigo durante os 4 anos de faculdade, almoçando junto, dando risada, estudando e entrando em desespero.

Agradeço aos meus amigos do mestrado que tornaram o caminho da pós-graduação menos solitário e mais leve.

Agradeço à minha orientadora Renata, que me acompanha por 6 anos, desde a iniciação científica. Agradeço por ser uma pessoa incrível, prestativa, atenciosa, gentil, paciente e uma excelente docente, seja nos ensinamentos da pesquisa ou nos ensinamentos em sala de aula.

Agradeço ao professor Marcelo Nolasco pela disponibilização de seu laboratório e seus equipamentos para a realização da minha pesquisa. Agradeço também aos colegas de laboratório, os grupos GEFAPAR e GEPASS, por serem prestativos.

Agradeço a todos os meus professores, pois cada um foi parte fundamental na minha trajetória para que eu me tornasse quem eu sou hoje.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro (processo nº 2016/16646-5) para a realização das minhas pesquisas durante a iniciação científica.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(SCHOPENHAUER, 1851, p. 115)

RESUMO

CARVALHO, Viviane da Silva. **Identificação e avaliação toxicológica dos subprodutos de desinfecção da clorexidina**. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Versão corrigida.

O biocida clorexidina é amplamente empregado como desinfetante e conservante em diversos produtos de uso humano e veterinário e já foi detectado em sedimentos, águas superficiais e subterrâneas, bem como, em efluentes de estações de tratamento. Por ser uma base catiônica, a clorexidina tem potencial de interagir com o cloro usado durante o tratamento das águas convertendo-se à subprodutos de desinfecção (DBPs, do inglês *Disinfection By-Products*), os quais podem ser mais tóxicos do que a molécula precursora. Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo estudar o comportamento deste biocida em meio clorado e avaliar a toxicidade dos eventuais DBPs formados. Para isso, foram realizados experimentos com uma solução de clorexidina a 5 mgL^{-1}, a qual foi submetida a diferentes condições: concentração de cloro, pH, temperatura, tempo reacional e ausência/presença de luz. As análises das soluções foram feitas por HPLC-MS, com o uso de uma coluna Shim-pack XR-ODS II (100 x 3,0 mm x 2,2 µm) e fase móvel composta por água e acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico. Os testes toxicológicos foram realizados pelos modelos preditivos de Relações Estrutura-Atividade Quantitativas (QSAR) presentes na plataforma VEGA. Os experimentos de degradação mostraram que a molécula de clorexidina interagiu com o cloro formando 30 DBPs, sendo que alguns se formam em condições específicas, enquanto outros se formam em diferentes faixas de pH, concentração de cloro e tempo reacional. Constatou-se que tais variáveis (pH, concentração de cloro e tempo reacional) influenciam no comportamento da clorexidina e na formação dos DBPs, enquanto a temperatura e a presença/ausência de luz foram variáveis não significativas. A avaliação toxicológica dos DBPs da clorexidina por meio dos modelos preditivos mostraram que alguns desses DBPs podem apresentar efeitos de mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade para organismos aquáticos. Destes 30 DBPs avaliados, destacam-se os DBPs 6, 8 e 17 que apresentaram atividade em muitos dos modelos preditivos e se formam em diversas condições de cloração. Contudo, muitos DBPs ficaram fora do domínio de aplicabilidade dos modelos, evidenciando a necessidade de mais estudos ecotoxicológicos acerca do biocida clorexidina e seus subprodutos.

Palavras-chave: Biocidas. DBPs. Cloração. Contaminantes emergentes. QSAR.

ABSTRACT

CARVALHO, Viviane da Silva. **Identification and toxicological evaluation of chlorhexidine disinfection by-products**. 2022. 80 p. Dissertation (Master of Sustainability) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2022. Corrected version.

The chlorhexidine biocide is widely used as a disinfectant and preservative in several products for human and veterinary use and has already been detected in sediments, surface and groundwater, as well as in effluents from treatment plants. As a cationic base, chlorhexidine has the potential to interact with the chlorine used during water treatment, converting it to Disinfection By-Products (DBPs), which can be more toxic than the precursor molecule. Based on this, this work aimed to study the behavior of this biocide in chlorinated medium and evaluate the toxicity of any DBPs formed. For this, experiments were carried out with a 5 mgL^{-1} chlorhexidine solution, which was subjected to different conditions: chlorine concentration, pH, temperature, reaction time and absence/presence of light. The analyzes of the solutions were performed by HPLC-MS, using a Shim-pack XR-ODS II column (100 x 3.0 mm x 2.2 µm) and a mobile phase composed of water and acetonitrile, both with 0.1% formic acid. Toxicological tests were performed by predictive models of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) present in the VEGA platform. The degradation experiments showed that the chlorhexidine molecule interacted with chlorine forming 30 DBPs, some of which are formed under specific conditions, while others are formed in different ranges of pH, chlorine concentration and reaction time. It was found that such variables (pH, chlorine concentration and reaction time) influence the behavior of chlorhexidine and the formation of DBPs, while temperature and the presence/absence of light were non-significant variables. The toxicological evaluation of chlorhexidine DBPs through predictive models showed that some of these DBPs may have mutagenicity, carcinogenicity and toxicity effects for aquatic organisms. Of these 30 DBPs evaluated, DBPs 6, 8 and 17 stand out, which showed activity in many of the predictive models and formed under different chlorination conditions. However, many DBPs were outside the domain of applicability of the models, highlighting the need for more ecotoxicological studies on the biocide chlorhexidine and its by-products.

Keywords: Biocides. DBPs. Chlorination. Emerging contaminants. QSAR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável..... 17
Figura 2 - Molécula de Clorexidina..... 20
Figura 3 - Condições utilizadas para realização dos experimentos de degradação da clorexidina..... 32
Figura 4 - Cromatograma TIC da solução de digluconato de clorexidina (5 mgL^{-1}, 0 minutos de degradação, pH 9, 20 °C e na presença de luz natural)..... 36
Figura 5 - Espectro de massas da solução de digluconato de clorexidina (5 mgL^{-1}, 0 minutos de degradação, pH 9, 20 °C e na presença de luz natural)..... 36
Figura 6 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 2 horas de degradação com 1,8 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na presença de luz natural..... 38
Figura 7 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na presença de luz natural..... 39
Figura 8 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural..... 39
Figura 9 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural..... 39
Figura 10 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 2 horas de degradação com 3,4 mgL^{-1} de NaOCl, pH 9 e 20 °C e na presença de luz natural..... 40
Figura 11 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 40 °C e na presença de luz natural..... 40
Figura 12 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7 e 20 °C e na presença de luz natural..... 41

Figura 13 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural..... 41
Figura 14 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural..... 41
Figura 15 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural..... 42
Figura 16 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6 e 20 °C e na presença de luz natural..... 43
Figura 17 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6, 20°C e na presença de luz natural..... 43
Figura 18 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 5,0 mgL^{-1} de NaOCl, pH 9, 20°C e na presença de luz natural..... 44
Figura 19 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 5,0 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na ausência de luz natural..... 44
Figura 20 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6 e 20 °C e na presença de luz natural..... 45
Figura 21: Molécula proposta para o DBP 1 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 46
Figura 22 - Molécula proposta para o DBP 2 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 47
Figura 23 - Molécula proposta para o DBP 3 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 47
Figura 24 - Molécula proposta para o DBP 12 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 48

Figura 25 - Molécula proposta para o DBP 4 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 48
Figura 26 - Molécula proposta para o DBP 5 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 49
Figura 27 - Molécula proposta para o DBP 6 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 49
Figura 28 - Molécula proposta para o DBP 8 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 50
Figura 29 - Molécula proposta para o DBP 9 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 50
Figura 30 - Molécula proposta para o DBP 10 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 51
Figura 31 - Molécula proposta para o DBP 11 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 51
Figura 32 - Molécula proposta para o DBP 7 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 52
Figura 33 - Molécula proposta para o DBP 13 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 52
Figura 34 - Molécula proposta o DBP 14 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 53
Figura 35 - Molécula proposta para o DBP 15 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 53
Figura 36 - Molécula proposta para o DBP 16 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 54
Figura 37 - Molécula proposta para o DBP 17 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 54
Figura 38 - Molécula proposta para o DBP 18 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 55
Figura 39 - Molécula proposta para o DBP 19 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 55
Figura 40 - Molécula proposta para o DBP 20 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 56

Figura 41 - Molécula proposta para o DBP 21 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 57
Figura 42 - Molécula proposta para o DBP 22 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 55
Figura 43 - Molécula proposta para o DBP 23 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 58
Figura 44 - Molécula proposta para o DBP 24 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 58
Figura 45 - Molécula proposta para o DBP 25 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 59
Figura 46 - Molécula proposta para o DBP 26 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 59
Figura 47 - Molécula proposta para o DBP 27 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 60
Figura 48 - Molécula proposta para o DBP 28 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 61
Figura 49 - Molécula proposta para o DBP 29 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 61
Figura 50 - Molécula proposta para o DBP 30 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detecção da clorexidina em diferentes matrizes aquáticas..... 21
Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na análise da clorexidina e dos derivados formados..... 33
Tabela 3 - Condições espectrométricas empregadas na análise da clorexidina e dos derivados formados..... 33
Tabela 4 - Dados cromatográficos e espectrométricos dos compostos identificados em cada um dos experimentos realizados (continua)..... 37
Tabela 4 - Dados cromatográficos e espectrométricos dos compostos identificados em cada um dos experimentos realizados (continuação)..... 38
Tabela 5 - Resultados dos testes de ecotoxicidade em peixes (LC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA..... 67
Tabela 6 - Resultados dos testes de ecotoxicidade em *Daphnia magna* (LC_{50} e EC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA..... 68
Tabela 7 - Resultados dos testes de ecotoxicidade em algas (EC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA..... 68
Tabela 8 - Classificação de perigo de substâncias perigosas de acordo com a Diretiva 93/67/EC..... 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Predição de toxicidade dos DBPs da clorexidina por modelos QSAR pela plataforma VEGA-QSAR (continua)..... 64

Quadro 1 – Predição de toxicidade dos DBPs da clorexidina por modelos QSAR pela plataforma VEGA-QSAR. (continuação)..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDCM	Bromodiclorometano
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DBCM	Dibromoclorometano
DBPs	*Desinfeccion by-products* (subprodutos de desinfecção)
EC	Efeito da concentração
ECCC	*Environment and Climate Change Canada*
ECHA	*European Chemicals Agency* (Agência Europeia de Produtos Químicos)
EM	Espectrômetro de massas
ESI	*Electrospray ionization*
HPLC	*High Performance Liquid Cromatography*
IDA	Índice de Domínio de Aplicabilidade
LC	Concentração letal
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	*Mass Spectrometry*
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PCA	p-cloroanilina
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
QSAR	*Quantitative Structure-Activity Relationship*
SAR	*Structure-Activity Relationship*
TBM	Tribromometano
TCM	Triclorometano
TIC	Cromatograma de íons totais
THM	Trihalometano
TR	Tempo de Retenção
UE	União Europeia
WHO	*World Health Organization*

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	17
2	**OBJETIVOS**.....	30
3	**MÉTODOS**.....	31
3.1	REAGENTES E PADRÕES.....	31
3.2	INSTRUMENTOS.....	31
3.3	SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA.....	31
3.4	EXPERIMENTOS DE CLOREXIDINA EM MEIO CLORADO.....	31
3.5	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS).....	33
3.6	ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS DBPs DA CLOREXIDINA.....	34
3.7	PREDIÇÃO TOXICOLÓGICA DOS DBPs DA CLOREXIDINA.....	34
4	**RESULTADOS**.....	36
4.1	EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO DA CLOREXIDINA EM MEIO CLORADO E ANÁLISES POR LC-MS.....	36
4.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS DE CLOREXIDINA.....	45
4.3	PREDIÇÃO (ECO)TOXICOLÓGICA DOS DBPs.....	62
4.3.1	RESULTADOS DA PREDIÇÃO TOXICOLÓGICA.....	64
4.3.2	RESULTADOS DA PREDIÇÃO ECOTOXICOLÓGICA.....	67
5	**CONCLUSÃO**.....	72
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

As questões ambientais começaram a ganhar destaque a partir da Conferência das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento e Meio Ambiente, ocorrida em 1972 em Estocolmo. Nesta conferência foram discutidos temas como poluição atmosférica, poluição da água e do solo, além da criação do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (CETESB, 2022). A partir deste marco e de perspectivas científicas sobre a interdependência da sociedade e do meio ambiente, na década de 1980, surgiu o conceito de Desenvolvimento Sustentável e diversos outros tratados visando a preservação ambiental e a sustentabilidade passaram a ser estabelecidos (KATES, 2011). Entre eles está a Conferência da ONU sobre meio ambiente e desenvolvimento, conhecida como Rio-92, ocorrida no Rio de Janeiro no ano de 1992. Nesta conferência foi criada a Agenda 21, posteriormente reformulada para a Agenda 2030, na qual constam os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), como pode ser observado na Figura 1 (ODS BRASIL, 2022; MMA, 2022).

Figura 1: 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável

Fonte: ODS BRASIL (2022).

Dentre os objetivos da Agenda 2030, o objetivo 3 se relaciona com a saúde e qualidade de vida buscando assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para toda a população,

sendo que um de seus pontos é reduzir o número de mortes e doenças causadas por produtos químicos perigosos, contaminação e poluição do ar, da água e do solo (ODS BRASIL, 2022).

O objetivo 6 se relaciona com água potável e saneamento buscando garantir disponibilidade da água e saneamento para todos. Tem como base alcançar o acesso universal e equitativo à água potável e segura, bem como melhorar a qualidade da água, reduzir a poluição, eliminar o despejo e minimizar a liberação de produtos químicos e materiais perigosos, reduzindo a proporção de águas residuais não tratadas e aumentando a reciclagem e reutilização (ODS BRASIL, 2022).

Em relação à contaminação das águas, os contaminantes emergentes têm levantado preocupações acerca de seus riscos para a saúde humana e os ambientes aquáticos. Esses compostos são substâncias químicas, sintéticas ou naturais, presentes nos produtos de uso cotidiano e englobam tanto moléculas que estão sendo comercializadas recentemente quanto moléculas já empregadas há muitas décadas, mas que ainda não possuem regulamentação (CAREGHINI et al., 2015).

Apesar de todas as matrizes ambientais estarem suscetíveis a contaminação por estas substâncias, o ambiente aquático é o mais afetado. O lançamento dessas substâncias nos corpos d’água ocorrem por diversas vias de descarte, tais como, lançamento de efluentes e esgotos domésticos, industriais e hospitalares diretamente nas águas e descarte de embalagens e/ou produtos no solo que pelo do processo de escoamento e infiltração alcançam o meio aquático (LIU; WONG, 2013; CORSELLAS, 2015; HAMZA, 2016).

Nas últimas décadas avaliações sobre a segurança do uso e eliminação destas substâncias vêm ganhando destaque, devido à sua persistência em ambientes aquáticos e seus efeitos nocivos, tais como, desregulação endócrina, carcinogenicidade, citotoxicidade e indução de resistência bacteriana (LIU; WONG, 2013; HE et al., 2016; YANG et al., 2017).

Além da nocividade destas substâncias para o meio ambiente, dados da literatura mostram ainda que muitos destes poluentes não são removidos completamente das águas pelos atuais métodos empregados nas estações de tratamento de água e esgoto. Após as etapas de tratamento muitas destas substâncias são detectadas com suas estruturas originais ou convertidas em subprodutos (LIU et al., 2017; YANG et al., 2017).

Há diversas classes de substâncias detectadas como poluentes em matrizes ambientais entre elas fármacos, produtos de higiene pessoal e os biocidas.

Os biocidas são substâncias utilizadas em produtos comerciais para destruir ou inibir quaisquer organismos indesejados, podendo ser classificados, de acordo com seu padrão de uso, como: desinfetantes, conservantes, controle de pragas e outros produtos biocidas (LIU et al.,

2017). Apesar de sua utilização estar regulamentada por legislações nacionais e internacionais, como a regulamentação n° 34/2010 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que trata sobre produtos saneantes desinfetantes e a resolução n° 528/2012 da União Europeia que trata sobre produtos biocidas, dados sobre sua rota de transporte e comportamento nas águas ainda são escassos (ECHA, 2012).

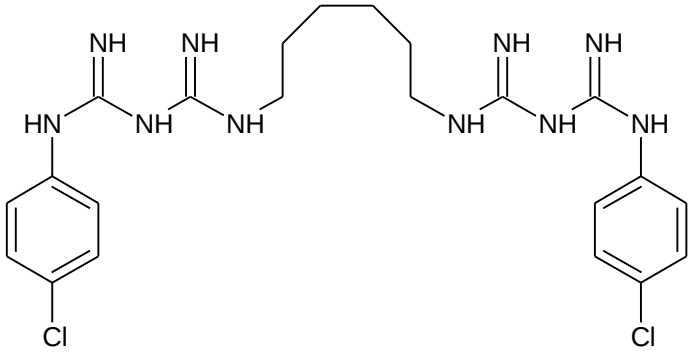
Os biocidas têm despertado interesse nos últimos anos devido aos seus efeitos na biota de ambientes em que estão presentes, visto que podem atuar sobre os microrganismos aquáticos da mesma forma que agem sobre os patógenos humanos (ALENCAR et al., 2019). Um dos microrganismos comprovadamente afetado pelos antimicrobianos são as cianobactérias. Estudo desenvolvido por Alencar et al. (2019) mostrou os potenciais efeitos dos resíduos biocidas nas cianobactérias em virtude da semelhança morfológica e bioquímica desses organismos com outras bactérias. Apesar de serem as principais responsáveis pelo processo de eutrofização, a alteração da população de cianobactérias, ocasionada por compostos antimicrobianos, pode interferir negativamente no equilíbrio do ecossistema aquático. As cianobactérias são parte fundamental do ecossistema aquático, estando presentes na base das cadeias tróficas como produtores primários. Além disso, participam de importantes ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do carbono, onde atuam como fixadoras de carbono pelo processo de fotossíntese e do ciclo do nitrogênio, no qual as cianobactérias fixam o nitrogênio atmosférico convertendo-o em amônio que será utilizado nas reações biológicas, podendo também associarem-se a outros organismos para realizar este processo de fixação de nitrogênio (PINOTTI; SEGATO, 1991; FERRÃO-FILHO; BRANDÃO, 2008; MOLICA; AZEVEDO, 2009).

Dentre esses biocidas, cuja presença tem sido frequentemente relatada no ambiente aquático e que tem levado a alterações nas populações de microrganismos e cianobactérias, está a clorexidina.

1.2 CLOREXIDINA

Caracterizada pela presença de dois anéis de clorofenol e dois grupos bisguanidas ligados por uma cadeia de hexametileno (Figura 2), a clorexidina é um biocida que possui um amplo espectro de ação, atuando em microrganismos gram-positivos e em gram-negativos, sendo que os gram-positivos são mais suscetíveis a sua ação. (BARBIN, 2008; HORTENSE et al. 2010).

Figura 2 - Molécula de Clorexidina



Fonte: Autoria própria.

Em virtude da sua considerável atuação antibacteriana de amplo espectro, a clorexidina vem sendo um dos principais biocidas regulamentado a ser utilizado no Brasil e no mundo e está na lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (ZANATTA; ROSING, 2007; HORTENSE et al., 2010; WHO, 2019).

Por ser praticamente insolúvel em água, geralmente é utilizada na forma de sal, sendo o digluconato de clorexidina a forma mais utilizada (LIM; KAM, 2008; HORTENSE et al., 2010; KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2015).

Seu emprego é feito na forma de formulações desinfetantes e antissépticas para desinfeção e esterilização de superfícies inanimadas e tecidos vivos, respectivamente, com aplicação em especial para ambientes hospitalares e odontológicos. É utilizada também na forma de conservante de diversos produtos comerciais (cremes, pastas de dentes, desodorantes, shampoo, preservativos, entre outros) (AZEVEDO et al., 2019; BESCOS et al., 2020). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde recomendou o uso de gel antisséptico à base de clorexidina para aplicação em cordão umbilical (DRAIKO et al., 2021).

Devido a seu uso em diferentes aplicações esse composto é amplamente descartado por indústrias, hospitais e por usos domésticos, podendo chegar aos ambientes aquáticos em sua forma livre ou como metabólitos (AZEVEDO et al., 2019).

Estudos em diferentes locais têm mostrado a presença de clorexidina em águas superficiais e efluentes. Alguns desses estudos indicaram ainda que os procedimentos utilizados nas estações de tratamento não removem completamente este biocida (YAVUZ, 2013; ÖSTMAN et al., 2017; AZEVEDO et al., 2019). A Tabela 1 reúne tais estudos, bem como as concentrações de clorexidina encontradas em cada um deles.

Tabela 1 - Detecção da clorexidina em diferentes matrizes aquáticas

Local estudado	Tipo de amostra	Concentração de clorexidina detectada (µg/L)	Referência
Canadá	Estação de tratamento de água	0,0339 a 4,470 (água que entra para o tratamento) 0,0188 a 0,448 (água que sai do tratamento)	ECCC, 2019
Argentina	Efluentes hospitalares tratados	382	AZEVEDO et al., 2019
Suécia	Estação de tratamento de água	1,305 (água que entra para o tratamento) 0,028 (água que sai do tratamento)	ÖSTMAN et al., 2017
Turquia	Águas superficiais Estação de tratamento de água residuais	0,0014 a 0,01 0,0016 a 0,0024	YAVUZ, 2013
Japão	Estação de tratamento de águas hospitalares	85 a 1940	MATSUSHIMA; SAKURAI, 1984

Fonte: Autoria própria.

Apesar de ser considerada atóxica para os seres humanos, por possui baixa toxicidade sistêmica, é classificada como ambientalmente perigosa para o ambiente aquático (BARBIN, 2008; HORTENSE et al., 2010; SARKAR et al., 2014).

O Artigo 19º do Regulamento para Produtos Biocidas da União Europeia n° 528/2012 dispõe de uma série de critérios que o produto biocida deve contemplar, dentre eles: não apresentar efeitos de resistência ou resistência cruzada nos organismos alvo; nem o produto biocida e nem seus resíduos devem apresentar efeitos adversos na saúde dos seres humanos e dos animais, seja de forma direta ou por meio da água potável, alimentos ou pelo ar; tanto o biocida quanto seus resíduos não devem apresentar efeitos nocivos ao meio ambiente, levando-se em conta: o destino e a distribuição do produto no ambiente, a contaminação das águas superficiais, subterrâneas e água potável, o seu impacto nos organismos não alvos, na biodiversidade e no ecossistema (ECHA, 2012).

Dados divulgados pela *Environment and Climate Change Canada* (ECCC), pelo documento *Screening Assessment Chlorhexidine and its Salts*, mostram que a clorexidina pode ser persistente em água, sedimento e solo. Além disso, esse documento apresenta dados de estudos toxicológicos agudos e crônicos sobre os efeitos da clorexidina em organismos aquáticos. Os dados toxicológicos agudos indicam que essa substância é tóxica para algas e microcrustáceos e pode causar efeitos adversos em peixes. Quanto aos estudos toxicológicos crônicos, os dados indicam que a clorexidina pode levar à eliminação de protozoários, além de mudanças na biomassa de algas, cianobacterias e bactérias (ECCC, 2019).

Além desse documento da ECCC, outros estudos também verificaram os efeitos da clorexidina sobre organismos aquáticos. Nuñez e Moretton (2007) desenvolveram um estudo acerca da resistência bacteriana à produtos desinfetantes em águas residuais de um hospital em Buenos Aires e concluíram que a clorexidina pode desencadear uma resistência em diversas famílias de bactérias.

Um estudo sobre os efeitos letais e sub letais da clorexidina sobre organismos aquáticos foi desenvolvido por Jesus et al. (2013). Nesse estudo, utilizou-se os organismos modelo: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o crustáceo *Daphnia magna* e os embriões do peixe *Danio rerio*, onde foi verificado que a clorexidina apresentou alta toxicidade para os espécimes de algas e crustáceos testados e baixa toxicidade para peixes e bactérias. Os autores alertam para a necessidade de mais estudos sobre a toxicidade da clorexidina, pois seus efeitos sobre algas e crustáceos são preocupantes, visto que estes organismos estão na base das cadeias alimentares aquáticas.

Azevedo et al. (2019) realizaram um estudo acerca dos efeitos da clorexidina sobre o crescimento e produção de clorofila em algumas cepas de cianobactérias. Nesse estudo, os autores isolaram duas cepas de cianobactérias presentes em um lago localizado em uma área de proteção ambiental em Minas Gerais e utilizaram solução padrão de clorexidina para a realização dos experimentos. A partir disso, constatou-se que, dependendo da concentração de clorexidina, algumas espécies de cianobactérias podem ter sua produção de clorofila inibida. Além disso, esse estudo ressalta que a escassez de dados sobre a concentração de clorexidina no meio ambiente é preocupante do ponto de vista do impacto ambiental que essa substância pode causar.

1.3 PROCESSO DE CLORAÇÃO

Para a remoção de organismos patogênicos e de moléculas orgânicas indesejáveis, durante o processo de desinfeção nas estações de tratamento de águas, o gás cloro e o hipoclorito são agentes mais comumente aplicados em todo o mundo, devido aos seus altos potenciais de oxidação (1,36 e 1,49 Volts, respectivamente) (TOMINAGA; MIDIO, 1999; MEYER, 1994; PINTO; BALTAZAR, 2020).

A reação destes agentes com as águas de abastecimento (que apresentam valores de pH entre 5 a 10) dão origem ao ácido hipocloroso (HOCl) e ao íon hipoclorito (OCl^-) (DEBORDE; GUNTEN, 2008).

O HOCl é a principal espécie de cloro reativa atuante durante o processo de desinfecção. As reações desta espécie com os compostos orgânicos presentes nas águas, especialmente as de oxidação, adição e substituição eletrofílica, são as responsáveis pela degradação dos poluentes durante o processo de desinfecção (DEBORDE; GUNTEN, 2008).

A reatividade do cloro é condicionada e limitada pelos grupos funcionais presentes nas moléculas orgânicas, podendo gerar oxidação completa da molécula ou degradação parcial da mesma (DEBORDE; GUNTEN, 2008).

Quando a oxidação é completa são gerados como subprodutos o gás carbônico, íons diversos (provenientes das estruturas destas moléculas) e espécies de cloro (HOCl e OCl^-) excedentes, definidas como cloro residual livre (MEYER, 1994; DEBORDE; GUNTEN, 2008).

As legislações de potabilidade de águas nacional e internacional preconizam que o processo de desinfecção seja realizado com teores de cloro na faixa de 0,2 a 2 mgL^{-1} e que, após o tratamento, a água deve conter, em qualquer ponto do sistema de abastecimento, um teor mínimo de cloro residual livre de 0,2 mgL^{-1} e um máximo de 5 mgL^{-1} (WHO, 2011; MINITÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Quando a oxidação é parcial, as espécies de cloro podem reagir com os compostos orgânicos gerando subprodutos (MEYER, 1994).

Quando amônia e/ou compostos nitrogenados estão presentes nas águas pode ocorrer a formação de cloraminas (monocloramina, dicloramina e tricloramina) ou tricloreto de nitrogênio. Estas substâncias cloradas são denominadas de cloro residual combinado e por serem extremamente tóxicas seus teores máximos em águas tratadas são regulamentados (MEYER, 1994).

No entanto, dependendo da estrutura dos compostos orgânicos naturais e/ou poluentes presentes nas águas outras substâncias derivadas podem ser formadas, sendo denominadas de subprodutos de desinfecção (DBPs). Os DBPs mais frequentemente relatados são os trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (HAAs), no entanto, dados da literatura mostram

que vários outros DBPs podem se formar a partir da reação entre o cloro e os diferentes poluentes encontrados em águas (DEBORDE; GUNTEN, 2008).

Deborde e Gunten (2008) descreveram as reações e os DBPs formados pelo cloro com diversos compostos orgânicos e inorgânicos, dentre eles alguns desreguladores endócrinos e produtos farmacêuticos. Esses autores relataram a possibilidade de o cloro reagir com a molécula de poluente por diferentes vias, dependendo dos grupos funcionais presentes no composto. Além disso, os autores alertam para a necessidade de investigar se a cloração da água potável é benéfica para minimizar a exposição humana a esses compostos.

Estudos mostram que os DBPs estão associados a doenças e disfunções nos organismos vivos e por isso nos últimos anos a concentração máxima permitida destes subprodutos em águas potáveis tem sido estabelecida por agências regulamentadoras de diversos países (MEYER, 1994). Meyer (1994) relatou a formação de THM e seus efeitos carcinogênicos em animais e em humanos. Neste estudo é apontada a relação entre THM e a ocorrência de câncer de estômago e câncer de cólon em humanos. Pinto e Baltazar (2020) além de descreverem o desenvolvimento de câncer associado aos níveis de THMs na água, também apontaram alguns estudos que indicam que a exposição a THMs pode ser associada a infertilidade de homens.

Hamidin et al. (2008) analisaram as concentrações de exposição e os efeitos adversos de 6 DBPs presentes em água potável clorada. Dentre esses DBPs estão triclorometano (TCM), bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) e tribromometano (TBM). Esses autores determinaram que alguns desses DBPs estudados são detectados em concentrações maiores que a permitida pela Organização Mundial da Saúde, sendo sua formação influenciada por características físicas e químicas da água, como pH e temperatura, bem como pelo processo de cloração da água nas estações de tratamento. Os testes toxicológicos realizados em animais mostraram que todos esses DBPs causam efeitos adversos na reprodução e desenvolvimento dos organismos testados, sendo que alguns DBPs podem ser carcinogênicos, como o TCM. Para humanos o resultado foi semelhante, mostrando que esses compostos podem desencadear diversos tipos de doenças dependendo de sua concentração e do tempo de exposição a esses DBPs (HAMIDIN et al., 2008).

Em relação à clorexidina, estudos mostram que ela é extremamente reativa, sofrendo degradação parcial pelo processo de hidrólise quando exposta por longos períodos (7-14 dias) em uma ampla faixa de temperatura (36,5 – 90°C) e pH entre 0,5 e 9,0. Sob condições de cloração, a sua degradação tem como principal DBP a p-cloroanilina (PCA) (ZONG; KIRSCH, 2012). A PCA é rapidamente absorvida e metabolizada pelo organismo, sendo considerada

carcinogênica, pois há interação do PCA com a hemoglobina e as proteínas do fígado e do rim por meio de ligações covalentes (ZONG; KIRSCH, 2012).

Apesar dos DBPs já serem relatados em amostras de águas há décadas, ainda não há estudos sobre a reação da clorexidina com cloro nas condições aplicadas nas estações de tratamento de água.

A análise desses DBPs pode ser feita por diversas técnicas analíticas e o avanço da sensibilidade de tais técnicas, como a cromatografia líquida, tem permitido a sua detecção mesmo em baixas concentrações.

1.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida teve seu início na década de 1950 e desde então essa técnica tem avançado sendo impulsionada pelo desenvolvimento de colunas mais eficientes, seletivas e estáveis. Esses avanços possibilitaram também o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou *High Performance Liquid Cromatography* (HPLC), que é uma técnica muito utilizada para análises químicas ambientais. Por se tratar de uma técnica de análise muito sensível e precisa, a CLAE é muito empregada no monitoramento de poluentes em água, tendo em vista que estes poluentes se encontram em baixas concentrações (na ordem de μgL^{-1} e ng^{-1}). A CLAE atua separando compostos orgânicos em misturas complexas, sendo que essa separação ocorre com base nas propriedades físico-químicas dos compostos (MALDANER; JARDIM, 2009; SILVA; COLLINS, 2011)

A separação dos compostos ocorre pela sua interação com a fase estacionária (presente na coluna) e a fase móvel (solventes). A coluna geralmente é composta por micropartículas de sílica ou sílica modificada com grupos orgânicos, como cadeias de carbono (denominadas de coluna C_8 e C_{18}), grupo ciano e grupo fenila. As fases móveis mais comumente empregadas nas análises são misturas de metanol e água ($MeOH:H_2O$) ou acetonitrila e água ($ACN:H_2O$), puras ou com adição de modificadores, como ácido fórmico, acetato de amônio, amônia, entre outros. A adição desses modificadores na fase móvel tem como objetivo favorecer o processo de ionização dos analitos pelo ajuste de pH do meio, assim, as interações da amostra com a fase móvel e a fase estacionária é melhorada (SILVA; COLLINS, 2011). Quando os compostos da amostra entram em contato com micropartículas da fase estacionária, os que possuem maior interação ficam mais tempo retidos na coluna e os que possuem menos interação fluem mais rapidamente com a fase móvel (COLLINS et al., 2006).

A CLAE pode ser utilizada individualmente ou acoplada a outras técnicas de análise, sendo que o espectrômetro de massas (EM) ou *Mass Spectrometry* (MS) é uma das técnicas mais utilizadas no acoplamento devido aos bons limites de detecção, além da possibilidade de confirmação estrutural dos compostos analisados (SILVA; COLLINS, 2011). Os componentes da mistura que foram separados pela CLAE são introduzidos no espectrômetro de massas, em seguida são ionizados e separados na relação massa/carga (*m/z*). O método de ionização mais utilizado é a ionização por eletronebulização (ESI, do termo em inglês *Electrospray ionization*) por se tratar de uma forma de ionização mais versátil para analitos com polaridade mediana a muito polares e pouco voláteis, como é o caso da maioria dos fármacos. Nesse método as moléculas da amostra, eluídas da coluna do cromatógrafo, são direcionadas para um capilar mantido numa voltagem de 3 a 6 kV, onde o líquido é nebulizado e forma gotículas. A aplicação de um forte campo elétrico na superfície destas gotículas leva à ionização da molécula. Posteriormente, as moléculas da amostra perdem um elétron, gerando um radical molecular ($M^{\cdot}$), ou se ionizam de modo positivo/negativo pela adição ou remoção de prótons, gerando um íon molecular ($[M+H]^+$ ou ($[M-H]^-$) (SILVERSTEIN et al., 2005; SILVA; COLLINS, 2011).

A partir da análise por LC-MS sequencial (*tandem mass spectrometry*, em inglês) a molécula de interesse pode ser submetida a múltiplas fragmentações para determinação de estruturas desconhecidas. Com base nisto, os íons que foram formados inicialmente são separados pela relação massa-carga na primeira etapa da espectrometria de massas (MS1). Os íons de interesse são selecionados (íons precursores) e fragmentados gerando seus íons produtos. Por fim, os íons produtos são então separados e detectados em uma segunda fase de espectrometria de massas (MS2). Este segundo processo de ionização pode ser feito por diferentes processos, como dissociação induzida por colisão, reação iônica-molécula, fotodissociação, entre outros. Há diferentes maneiras de se fazer a seleção e o monitoramento dos íons quando o espectrômetro de massas é do tipo quadrupolo. No modo de varredura (*full scan*, em inglês), o primeiro quadrupolo Q1 é configurado para selecionar um íon de uma massa conhecida, que é fragmentada em Q2. O terceiro quadrupolo Q3 é então configurado para escanear todo o intervalo *m/z* e fornece informações sobre os fragmentos gerados (SILVERSTEIN et al., 2005; COLLINS et al., 2006).

Diversos estudos têm sido apresentados na literatura para a determinação de poluentes emergentes em matrizes aquosas, utilizando métodos analíticos por CLAE com detecção por ESI–MS (YAVUZ et al., 2015; ZHANG et al., 2015; ÖSTMAN et al., 2017; FERNANDES, 2018). Os métodos analíticos utilizando HPLC–ESI–MS/MS podem atingir limites de detecção e quantificação na ordem de ngL^{-1} (SILVA; COLLINS, 2011).

De acordo com Zhang et al. (2015), a combinação dessas técnicas com tal modo de ionização é normalmente empregado para determinar traços de compostos quaternários de amônio em amostras ambientais. Esta técnica vem sendo empregada também para determinação de clorexidina em águas residuais e efluentes tratados, como pode ser visto nos estudos de YAVUZ et al. (2015) e ÖSTMAN et al. (2017), mencionados na Tabela 1.

A determinação desses poluentes em amostras ambientais, pelas técnicas analíticas mencionadas, possibilita a análise de suas características e riscos para o meio ambiente e os organismos por meio dos testes toxicológicos.

1.6 TESTES TOXICOLÓGICOS

A regulamentação de uma substância química como poluente em um compartimento ambiental é realizada a partir da avaliação de risco à saúde humana e ao meio ambiente, bem como seu potencial de bioacumulação, seu transporte e destino nos diferentes compartimentos ambientais e sua concentração no ambiente. Esses estudos envolvem diferentes áreas da ciência e são fundamentais para se conhecer os riscos associados à exposição de novos compostos (MONTAGNER et al., 2017).

O efeito nocivo que uma determinada substância, presente no meio ambiente, exerce sobre indivíduos, populações e comunidade de organismos (plantas, animais, peixes, bactérias, etc.), além do ser humano, é determinado por meio dos estudos toxicológicos. Neste estudo o causador do efeito tóxico é denominado de agente químico, o meio onde ocorre a interação do agente químico é denominado de sistema orgânico e as consequências resultantes desse processo para o meio ambiente é a nocividade. Testes toxicológicos são exigidos atualmente por diversos órgãos ambientais nacionais e internacionais visando determinar a qualidade de águas e efluentes (COSTA et al., 2008).

Os testes que empregam organismos vivos são denominados de bioensaios. Os bioensaios determinam o grau ou o efeito biológico da substância teste em uma cultura de células vivas ou em um organismo-teste. Dependendo do tempo de exposição do organismo-teste à substância testada, o bioensaio pode ser classificado como agudo ou crônico. Os testes de toxicidade aguda são realizados com a utilização de uma única dose da substância testada ou após múltiplas dosagens em até 24 horas; a resposta negativa eventualmente obtida durante este teste não significa, no entanto, que a substância não seja tóxica para este organismo. Testes de exposição prolongada, denominados de ensaio de ecotoxicidade crônica, são então executados, visando confirmar estes resultados de segurança. Os testes de toxicidade crônica

são realizados em função do tempo de vida do organismo e mostra CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) (COSTA et al., 2008).

A escolha dos seres vivos utilizados durante os bioensaios é definida pelos parâmetros como: se os mesmos são de grande representação ecológica, se sua constituição biológica é bem definida e se apresentam facilidade de cultivo em laboratório. Roedores, bactérias, algas, crustáceos e peixes são os organismos mais comumente utilizados. No entanto, a fim de evitar o uso excessivo e aleatório de testes em animais, agências reguladoras têm incentivado o desenvolvimento e uso de métodos alternativos para a determinação de informações sobre a segurança de substâncias químicas. O uso de métodos de testes alternativos não baseados em animais foi previsto no Regulamento de Produtos de Biocidas N° 528/2012 UE (ECHA, 2012).

Um dos métodos alternativos que vêm ganhando destaque são os modelos preditivos. Os modelos baseados na relação estrutura-atividade (SAR, do termo em inglês *Structure-Activity Relationship*), são alternativas amplamente reconhecidas aos métodos clássicos *in vivo*. A SAR é baseada no conceito em que a atividade biológica de uma substância química alvo pode estar relacionada à sua estrutura molecular. Quando essa atividade é quantificável, esta relação é determinada pelo método QSAR (do termo inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Um modelo QSAR usa os dados reais e conhecidos de toxicidade experimental de várias substâncias químicas para construir uma estrutura de modelo que vincula a toxicidade observada experimentalmente com detalhes moleculares, a fim de prever a toxicidade das substâncias em estudo (CASSANO et al., 2014; CAPPELLI et al., 2015; BENFENATI et al., 2020; BLÁZQUEZ et al., 2020; BOUHEDJAR et al., 2020).

Diversas plataformas estão disponíveis atualmente para a aplicação dos modelos SAR e QSAR, incluindo a VEGA-QSAR. O VEGA é uma plataforma gratuita que reúne diferentes modelos, os quais avaliam o grau de toxicidade dos compostos. Para cada modelo, um conjunto de características químicas (fragmentos moleculares ou grupos funcionais) que exibem uma correlação estatisticamente relevante com o modelo selecionado é usado para avaliar as informações de toxicidade da substância alvo (BENFENATI et al., 2020).

Um modelo QSAR é considerado válido se: *i)* o modelo for reconhecido como cientificamente válido; *ii)* a substância testada estiver dentro do domínio de aplicabilidade do modelo; *iii)* os resultados estiverem adequados para classificação, rotulagem e para avaliação de risco; e *iv)* a documentação adequada dos métodos for fornecida (CAPPELLI et al., 2015; BLÁZQUEZ et al., 2020).

Dentro do conceito dos biocidas, considerando o impacto destas substâncias e dos seus metabólitos, produtos de degradação e transformação que são liberados para o meio ambiente,

modelos computacionais específicos que permitem estimar o impacto deste tipo de substâncias nos organismos de água doce já existem. Estes modelos estão implementados em ferramentas consolidadas na área de toxicologia computacional, como a plataforma VEGA e o ToxRead.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi verificar o comportamento e a rota de degradação do biocida clorexidina em meio clorado, bem como avaliar a toxicidade dos subprodutos formados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- determinar a rota de transformação da clorexidina em meio clorado, mediante simulação das condições aplicadas nas estações de tratamento água;
- detectar e elucidar a estrutura dos subprodutos de degradação da clorexidina formados em meio clorado;
- avaliar a toxicologia desses subprodutos, pelos modelos preditivos QSAR.

3 MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PADRÕES

Para os experimentos da clorexidina em meio clorado foram utilizados: padrão de digluconato de clorexidina, grau de pureza 98%, da marca Fagron (solução à 20%); hipoclorito de sódio, grau P.A., da marca Nalgon (teor de cloro livre de 10-12%); água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação de água da marca Megapurity (resistividade 18.2 MΩ cm); hidróxido de sódio, grau P.A., da marca Química Nova.

Para as análises do LC-MS foram utilizados ácido fórmico, grau HPLC, da marca Sigma-Aldrich e acetonitrila, grau HPLC, da marca J.T. Baker.

3.2 INSTRUMENTOS

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas. O cromatógrafo é da marca Shimadzu, consistindo de: duas bombas, modelo LC-20AD XR; um injetor automático, modelo SIL-20AXR; um forno, modelo CTO-20A; uma controladora, modelo CBM-20A e um detector UVVis/ DAD, modelo SPD-M20A. O espectrômetro de massas também é da marca Shimadzu, modelo LCMS 8030.

3.3 SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA

Para os experimentos de clorexidina em meio clorado foi utilizada uma solução de digluconato de clorexidina na concentração de 5,0 mgL^{-1} para facilitar a detecção no equipamento, pois com concentrações menores há dificuldade de detecção. Essa solução foi obtida a partir da diluição de 100 µL do padrão de digluconato de clorexidina à 20% para 100 mL de água deionizada (gerando uma solução estoque de 200 mgL^{-1}). Posteriormente foi realizada uma diluição a partir de 500 µL desta solução estoque (200 mgL^{-1}) para 20 mL de água deionizada, obtendo-se a concentração desejada (5,0 mgL^{-1}).

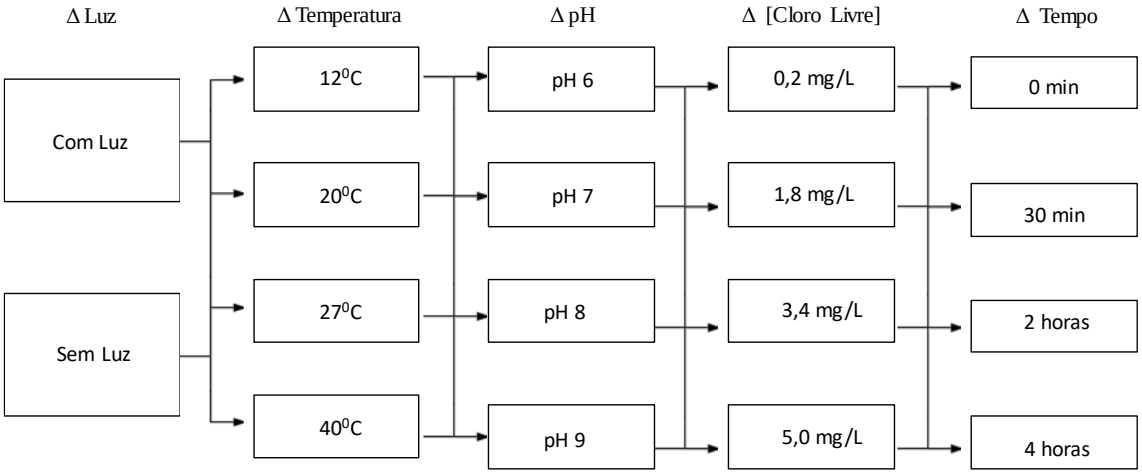
3.4 EXPERIMENTOS DE CLOREXIDINA EM MEIO CLORADO

Todos os experimentos acerca do comportamento da clorexidina em meio clorado foram realizados utilizando 20 mL da solução de digluconato de clorexidina (5,0 mgL^{-1}). Esta solução

teve seu pH corrigido para os intervalos definidos neste estudo (6, 7, 8 e 9), pela adição de uma solução de hidróxido de sódio 0,03 $molL^{-1}$. Posteriormente, foram adicionados diferentes volumes de hipoclorito de sódio até a obtenção das concentrações de cloro livre definidos neste estudo (0,2; 1,8; 3,4 e 5,0 mgL^{-1}). A mistura foi então submetida a diferentes temperaturas (12, 20, 27 e 40 °C) na presença e ausência de luz.

Os valores estudados para cada variável foram definidos de acordo com o intervalo previsto na legislação sobre tratamento e parâmetros de qualidade de água (concentração de cloro livre na faixa de 0,2 a 5,0 mgL^{-1}, temperatura do sistema entre 12 e 40 °C e pH de 6 a 9) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A presença e ausência de luz natural foram avaliadas visando simular as condições das águas quando expostas a luz natural (nos tanques de tratamento e reservatórios naturais durante o dia) e na ausência de luz natural (redes subterrâneas de distribuição e reservatórios naturais no período noturno). Todos os experimentos elaborados estão apresentados no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Condições utilizadas para realização dos experimentos de degradação da clorexidina



Fonte: Autoria própria.

Para obter as concentrações de cloro livre estudadas, uma alíquota de 0,1 mL da solução de hipoclorito de sódio concentrado (11%) foi diluída para 10 mL de água deionizada (gerando uma solução a 1100 mgL^{-1}). Em seguida uma alíquota de 1 mL desta solução (1100 mgL^{-1}) foi diluída para 10 mL de água deionizada, gerando uma solução a 110 mgL^{-1}. Diferentes volumes desta solução à 110 mgL^{-1} foram então adicionados à solução de clorexidina. Cada condição estudada foi monitorada por um tempo reacional de 4 horas sendo que em 0 min e após 30 min, 2 e 4 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL, realizada a filtração destas alíquotas em membranas de 0,45 μm e analisadas imediatamente por LC-MS. Uma solução de clorexidina

nas condições de cada experimento sem a adição do hipoclorito de sódio (alíquota de 0 minutos) foi utilizada como referência (branco da amostra).

3.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)

As análises de monitoramento da clorexidina e seus derivados formados, foram realizadas de acordo com a metodologia otimizada. Nas Tabelas 2 e 3 estão descritas as condições cromatográficas e espectrométricas empregadas nas análises.

Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na análise da clorexidina e dos derivados formados.

Parâmetro	**Condições**
Coluna	Shim-pack XR-ODS II (100 x 3,0 mm x 2,2 µm)
Fase Móvel	Água (A) e acetonitrila (B), ambos com 0,1% de ácido fórmico
Modo de Eluição	Gradiente (0-5 min: 60-100% B; 5-8 min: 100% B)
Fluxo da fase móvel	0,6 $mL.min^{-1}$
Temperatura do forno	40 °C

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Condições espectrométricas empregadas na análise da clorexidina e dos derivados formados.

Parâmetro	**Condições**
Método de ionização	*Eletrospray* (ESI)
Modo ionização	positivo
Modo de Varredura	Varredura (*full scan*), intervalo *m/z* 100-1000 Da
Temperatura da interface (DL)	250 °C
Temperatura do bloco de aquecimento	400 °C
Gás secante e de nebulização	nitrogênio
Fluxo do gás de nebulização	3 L min^{-1}
Fluxo do gás secante	15 L min^{-1}

Fonte: Autoria própria.

3.6 ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS DBPs DA CLOREXIDINA

Todas as alíquotas analisadas por LC-MS tiveram os seus resultados devidamente processados. Inicialmente foi analisado o cromatograma de íons totais (TIC) visando verificar a existência e/ou desaparecimento do pico referente à clorexidina e o aparecimento de demais picos referentes ao surgimento dos derivados. Cada um dos picos observados foi registrado em função do seu tempo de retenção (TR), íon molecular e fragmentos, sendo os dois últimos parâmetros obtidos por meio dos espectros de massas. Devido à baixa sensibilidade do equipamento para a detecção das substâncias em questão foi realizado um processamento dos dados utilizando recursos disponíveis no software LabSolution® do equipamento. Um destes recursos permite a exclusão da linha de base, eliminando parte do ruído e permitindo a visualização mais precisa dos picos das substâncias. Outro recurso utilizado foi o de confirmação do íon molecular e dos fragmentos, obtidos para cada substância, em relação ao seu respectivo pico no TIC. Após estes tratamentos dos dados deu-se início a etapa de elucidação estrutural destas substâncias. Para a elaboração das estruturas, simulação das fragmentações, bem como confirmação das massas molares das estruturas propostas, utilizou-se o software ACD/ChemSketch®, versão gratuita C10E41, ano 2015.

3.7 PREDIÇÃO TOXICOLÓGICA DOS DBPs DA CLOREXIDINA

Os possíveis efeitos adversos dos DBPs identificados à saúde e ao meio ambiente foram preditados utilizando modelos de Relações Estrutura-Atividade Quantitativas (QSAR) e a plataforma VEGA.

Para avaliar a toxicidade dos DBPs sete parâmetros foram utilizados: Mutagenicidade, Carcinogenicidade, Receptor de Estrogênio, Receptor de Androgênio, Receptor de Tiroide A, Receptor de tiroide B e Hepatotoxicidade. Para prever essas atividades foram empregados quatro modelos para mutagenicidade (CAESAR, SarPy/IRFMN, ISS, KNN/Read-Across); seis modelos de carcinogenicidade (CAESAR, ISS, IRFMN/Antares, IRFMN/ISSCAN-CGX, IRFMN/carcinogenicidade oral, IRFMN/carcinogenicidade por inalação), dois modelos de receptor de estrogênio (IRFMN, IRFMN/CERAPP), um modelo de receptor de androgênio (IRFMN/COMPARA), um modelo de receptor de tiroide A (NRMEA), um modelo de receptor de tiroide B (NRMEA) e um modelo de hepatoxicidade (IRFMN). Tais parâmetros foram escolhidos por estarem contemplados no Artigo 19º do Regulamento para produtos biocidas da União Europeia nº 528/2012. Dentre os critérios estabelecidos neste regulamento constam os

parâmetros que devem ser avaliados nos produtos para que estes sejam considerados seguros. Desse modo, devem ser considerados dados referentes à mutagenicidade do produto, à carcinogenicidade, à toxicidade e deve-se avaliar se o produto apresenta propriedades que possam ser prejudiciais ao sistema endócrino (ECHA, 2012).

Em relação a avaliação de ecotoxicidade utilizou-se modelos preditivos para toxicidade em peixes, em *Daphnia magna* e em algas. Esses organismos foram escolhidos para a avaliação de ecotoxicidade porque as algas, a *Daphnia* e os peixes são organismos modelos considerados representativos para o ecossistema aquático, pois pertencem a diferentes níveis tróficos (LUNGHINI et al., 2020).

Para os testes de ecotoxicidade foram empregados cinco modelos para peixes, estando todos eles presentes na plataforma VEGA: SarPy/IRFMN, KNN/Read-Across, NIC, IRFMN e IRFMN/Combase. Para *Daphnia magna* foram utilizados quatro modelos: EPA, DEMETRA, IRFMN E IRFMN/Combase. Para algas utilizou-se três modelos: IRFMN e duas versões do ProtoQSAR/Combase.

Os modelos de toxicidade e ecotoxicidade empregados abrangem avaliações qualitativas quanto quantitativas. Para os modelos de respostas quantitativas foi realizada uma validação dos valores preditos pela plataforma VEGA pela comparação destes valores com valores determinados por testes *in vivo*.

Esta validação foi feita comparando os valores de LC_{50} para peixe e *Daphnia magna* e os valores de EC_{50} para *Daphnia magna* e alga, obtidos para a clorexidina, com os valores dos testes com organismos vivos amplamente disponíveis na literatura científica e em legislações.

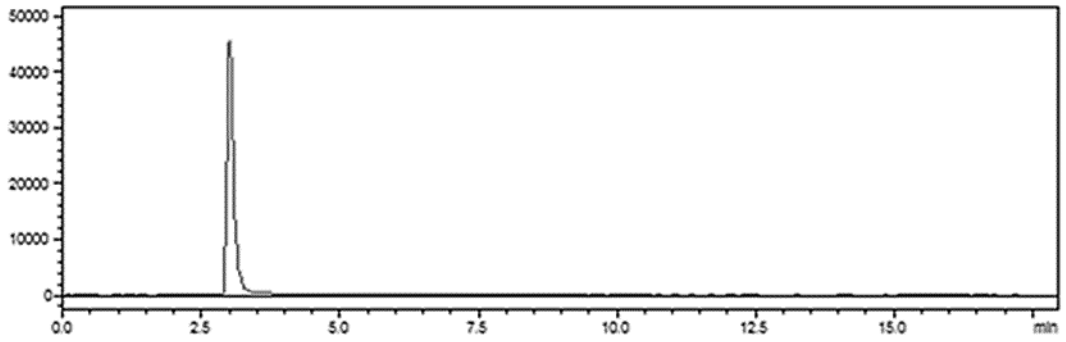
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO DA CLOREXIDINA EM MEIO CLORADO E ANÁLISES POR LC-MS

As análises por LC-MS iniciaram-se pelas alíquotas 0 min (branco da amostra) de cada experimento. Nestas análises foi observado apenas o pico da clorexidina, sem nenhum contaminante e/ou substância derivada.

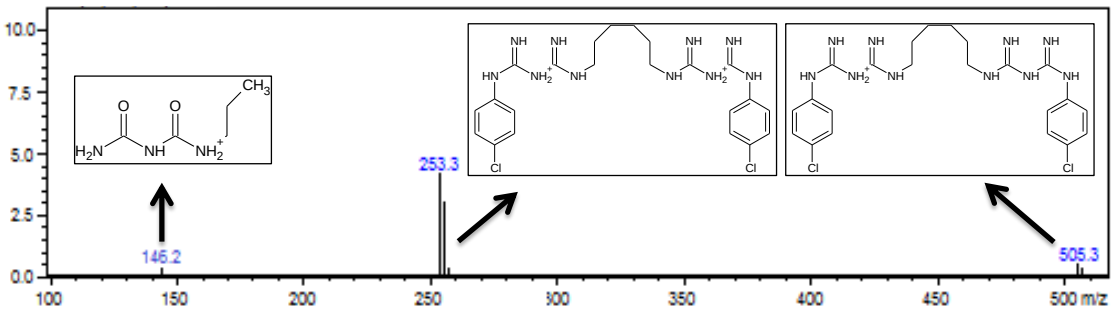
Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados, respectivamente, o TIC (cromatograma de íons totais) e o espectro de massas da solução de clorexidina, representativo do branco da amostra. Com as condições espectrométricas definidas no método foi possível a obtenção do íon molecular da clorexidina e seu respectivo isótopo de cloro (m/z 505 e 507) e também o fragmento majoritário m/z 253 (e seu isótopo m/z 255), referente ao íon molecular duplamente carregado. Estes resultados corroboram com outros estudos já apresentados na literatura sobre análise da clorexidina por LC-MS (HISHINUMA et al., 2006; BARBIN, 2008).

Figura 4 - Cromatograma TIC da solução de digluconato de clorexidina (5 mgL^{-1}, 0 minutos de degradação, pH 9, 20 °C e na presença de luz natural)



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Espectro de massas da solução de digluconato de clorexidina (5 mgL^{-1}, 0 minutos de degradação, pH 9, 20 °C e na presença de luz natural).



Fonte: Autoria própria.

Após a avaliação preliminar do branco da amostra, foram realizadas as análises das alíquotas dos experimentos de cloração apresentados na Figura 3 do item 3.4, descritos na parte experimental.

As análises mostraram que a molécula de clorexidina reage com as espécies livres de cloro, quando exposta às condições nas quais as águas são submetidas nas estações de tratamento de água e na rede de distribuição.

A interação da clorexidina com as espécies ativas de cloro ocorreu por diferentes rotas e com intensidades variáveis, em função das condições do meio. Em algumas das condições testadas foi possível constatar que a interação ocorrida mantém parte das moléculas de clorexidina sem alteração como, por exemplo, na condição de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 30 minutos de degradação, na presença de luz e à 20°C. No entanto, em outras condições constatou-se que a molécula de clorexidina é totalmente degradada e ocorre a formação de DBPs.

As análises por LC-MS das frações (30 min, 2 e 4 horas) de cada experimento permitiu a determinação de 30 DBPs derivados. Na Tabela 4 estão apresentados os dados cromatográficos (tempo de retenção) e espectrométricos (íon molecular e fragmentos) dos DBPs detectados nos experimentos realizados.

Tabela 4 - Dados cromatográficos e espectrométricos dos compostos identificados em cada um dos experimentos realizados. (continua)

DBPs	**Rt (min)**	**$[M+H]^+$**	**Fragmentos (*m/z*)**
1	10.4	429	385; 297; 217; 173; 150 e 124
2	10.0	383	279; 217; 146; 136 e 122
3	7.9	313	217 e 146
4	10.3	301	279; 217; 145; 136 e 122
5	6.5	284	146 e 122
6	5.0	256	208; 167; 146 e 122
7	10.7	217	173 e 122
8	0.9	208	167; 146; 122 e 106
9	4.1	332	214; 208; 183; 173; 162; 146 e 122
10	5.5	304	162; 146 e 122
11	5.1	290	217; 162 e 122
12	7.2	167	122 e 105
13	7.2	146	115; 105 e 102
14	8.1	289	146
15	9.8	537	507; 449; 419; 405; 361; 217 e 146
16	6.9	633	374; 277 e 146
17	11.4	473	429; 341; 297; 217; 173
18	10.0	354	150; 146 e 115

Tabela 4 - Dados cromatográficos e espectrométricos dos compostos identificados em cada um dos experimentos realizados. (continuação)

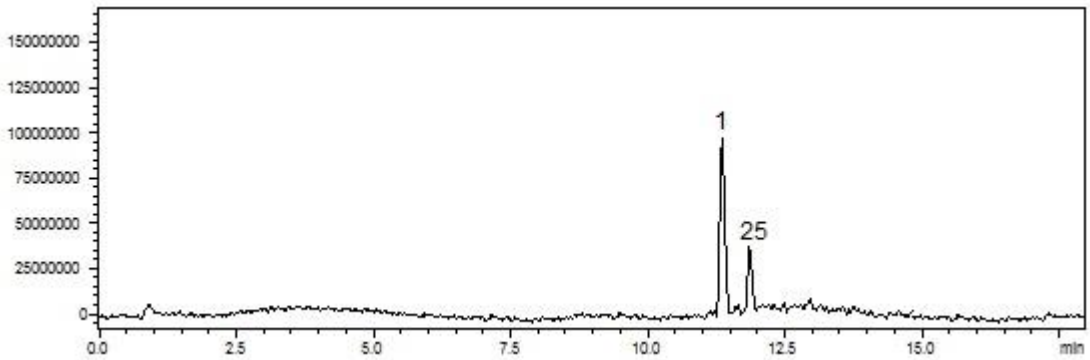
19	8.4	337	312 e 146
20	13.7	413	217; 162; 136 e 115
21	8.6	359	217 e 162
22	5.2	274	208; 162 e 122
23	9.7	249	217 e 136
24	10.2	575	493; 449; 383; 355; 279 e 128
25	11.8	425	355; 217; 173; 145
26	9.8	493	449; 361; 236 e 145
27	10.1	494	383; 281; 217 e 146
28	9.9	449	405; 217; 173; 146 e 105
29	12.9	610	217, 150; 145 e 136;
30	10.9	548	463; 425; 419; 375 e 145

Fonte: Autoria própria.

Dos subprodutos de desinfecção detectados observou-se que alguns se formaram em todos (ou praticamente todos) os experimentos realizados enquanto outros foram específicos para determinadas condições.

Em relação aos DBPs que se formaram em todas, ou quase todas as condições testadas, estão os DBPs 1 e 25. Com exceção do experimento contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro, o DBP 25 foi detectado em todas as concentrações de cloro a pH 7, após 2 e 4 horas de degradação e nas temperaturas de 20 e 40°C. Já o DBP 1 foi formado em todas as condições (Figura 6).

Figura 6 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 2 horas de degradação com 1,8 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na presença de luz natural.

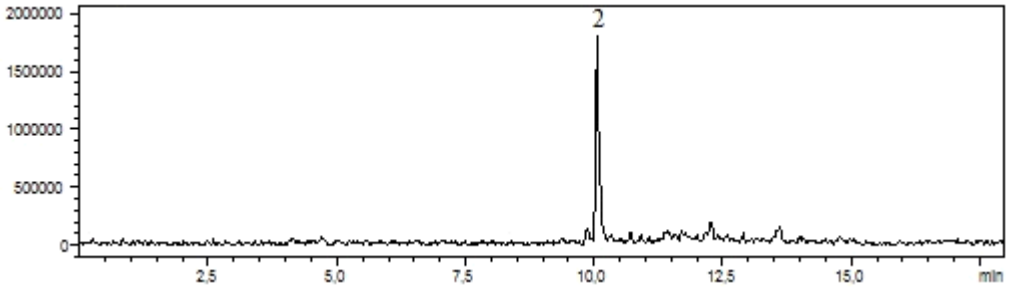


Fonte: Autoria própria.

Todos os demais DBPs se formaram em condições mais específicas. Os DBPs 3, 16 e 27 foram formados apenas nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 8, após 30 minutos de degradação na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C e os DBPs 2 e 15 foram

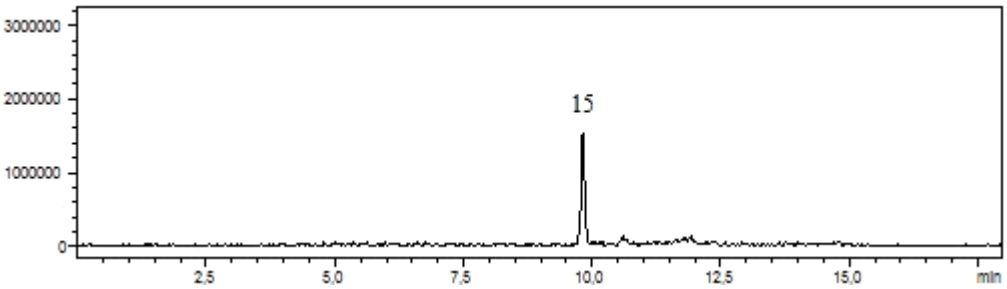
detectados apenas nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

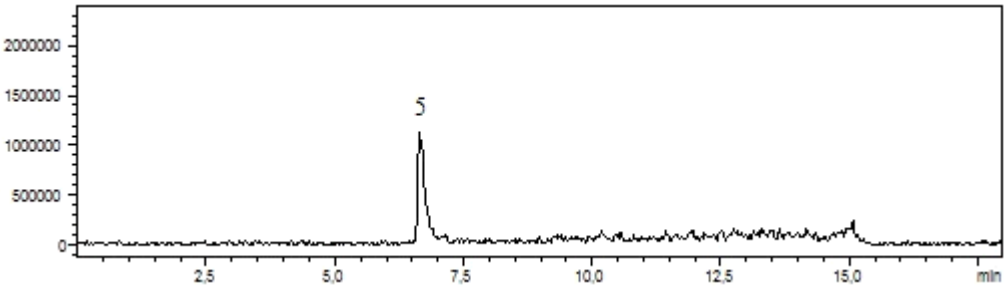
Figura 8 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 5 foi detectado nos experimentos de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 8, após 30 minutos e 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 a 40°C (Figura 9).

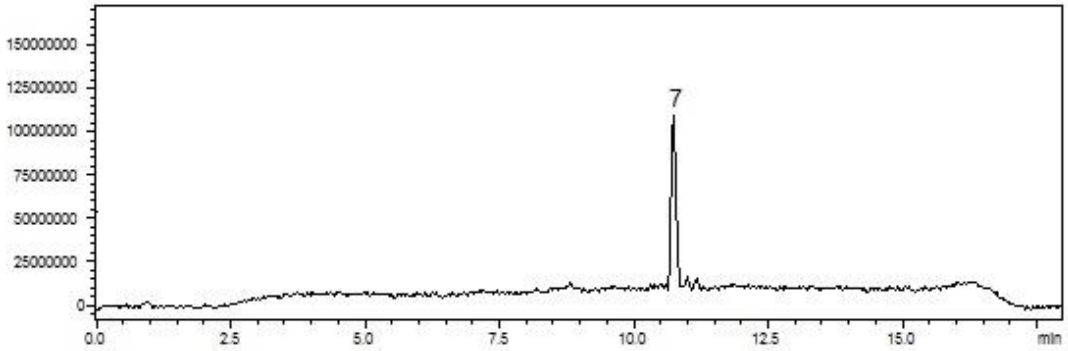
Figura 9 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

A detecção do DBP 7 ocorreu apenas nos experimentos contendo 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 2 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C (Figura 10).

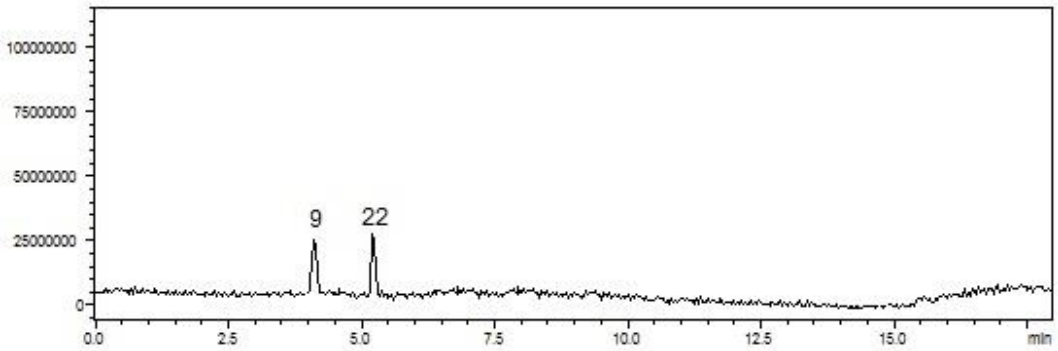
Figura 10 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 2 horas de degradação com 3,4 mgL^{-1} de NaOCl, pH 9 e 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

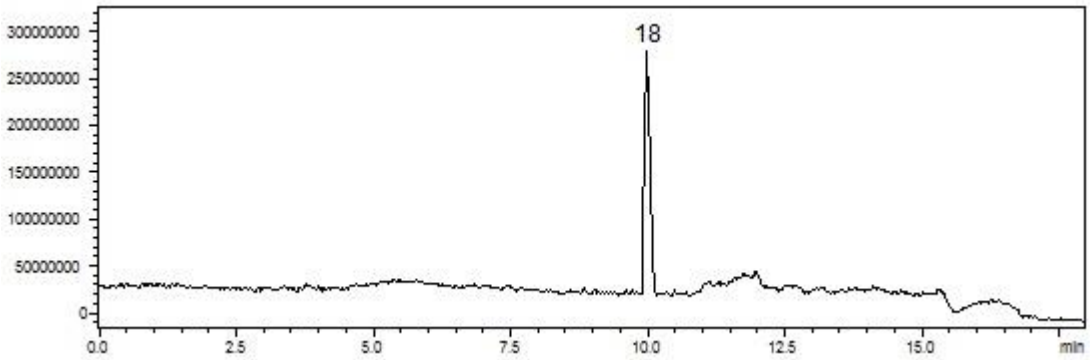
Os DBPs 9, 18 e 22 foram formados apenas nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 30 minutos de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 40 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

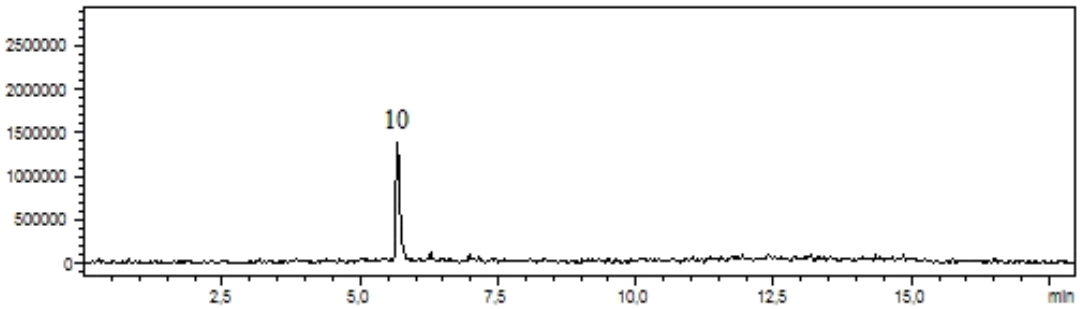
Figura 12 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7 e 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

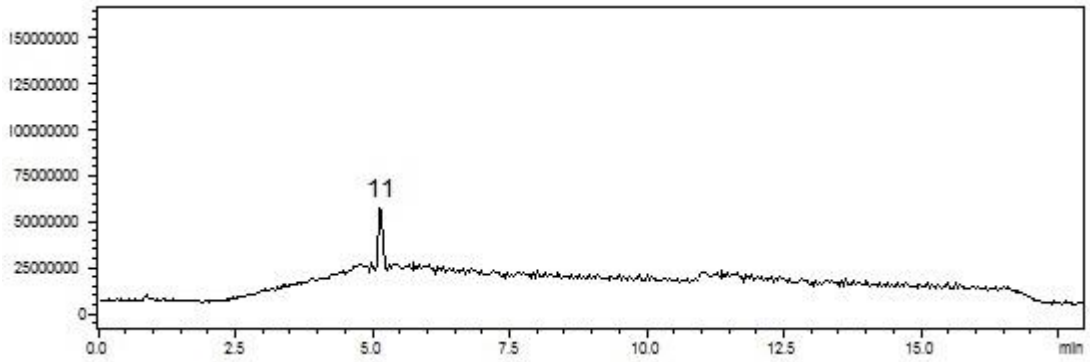
Os DBPs 10 e 11 se formaram nos experimentos de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 8 e 9, após 30 minutos e 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 a 40°C (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

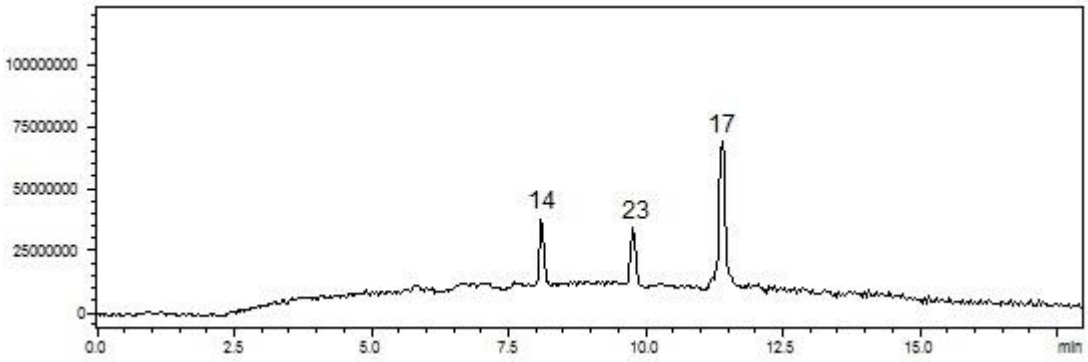
Figura 14 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

Em relação ao DBP 14, este foi detectado nos experimentos de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 8, após 4 horas de degradação, na condição de 1,8 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 2 e 4 horas de degradação e na condição de 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 4 horas de degradação, todos na presença de luz e temperatura de 20 a 40°C. Na Figura 15, além do DBP 14 há também a presença dos DBPs 17 e 23. O DBP 17 se formou nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7 e 8, após 2 e 4 horas de degradação e nos experimentos com 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 2 horas de degradação, todos à 20 e 40°C. Já o DBP 23 se formou em todas as condições.

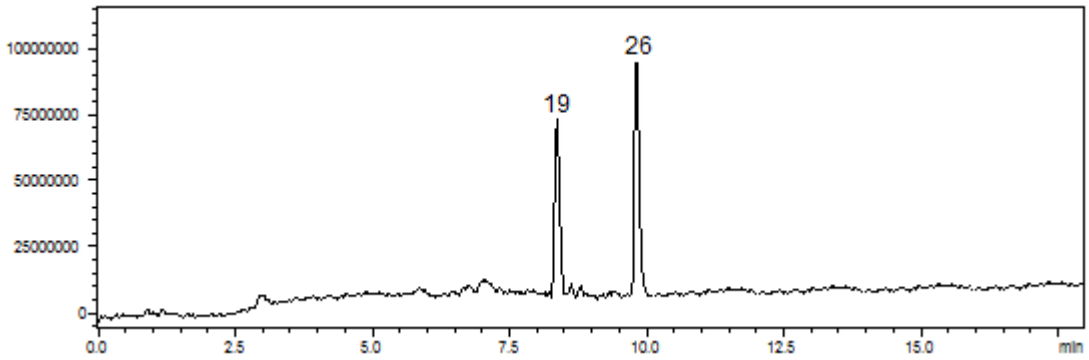
Figura 15 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 8, 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 26 se formou especificamente nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C. Na Figura 16 é possível observar que nesta condição também ocorre a formação do DBP 19, contudo, ao contrário do DBP 26 que se forma em experimentos específicos, o DBP 19 se forma em diversas condições. Dentre essas condições estão: 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6 e 7, após 4 horas de degradação; 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 4 horas de degradação, todos na presença de luz e temperatura de 20 a 40°C.

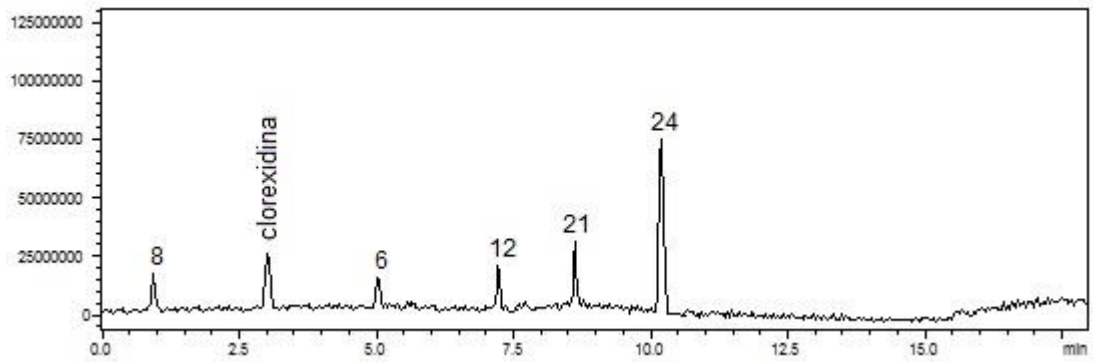
Figura 16 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6 e 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 24 foi formado apenas nos experimentos contendo 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 30 minutos de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C. Além deste DBP, nessa condição também se nota a presença da clorexidina e dos DBPs 6, 8, 12 e 21, como é possível observar na Figura 17. Os DBPs 8 e 21 foram detectados em todas as condições avaliadas. O DBP 6 foi detectado nos experimentos de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 30 minutos de degradação, na presença de luz, todos à 20 e 40°C e nos experimentos de 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 30 minutos de degradação, na presença de luz, a 20 e 40°C. Já o DBP 12 se formou nas condições de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6, após 30 minutos de degradação; nos experimentos de 1,8 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 30 minutos de degradação; e nos experimentos de 3,4 e 5,0 mgL^{-1} de cloro livre, ambos com pH 9 e após 30 minutos de degradação, todos na presença de luz e temperatura de 20 a 40°C.

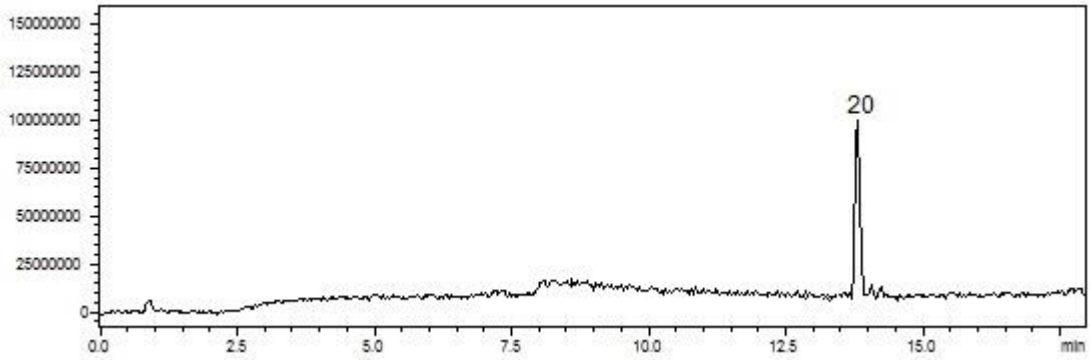
Figura 17 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6, 20°C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 20 foi detectado apenas nos experimentos contendo 5,0 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C (Figura 18).

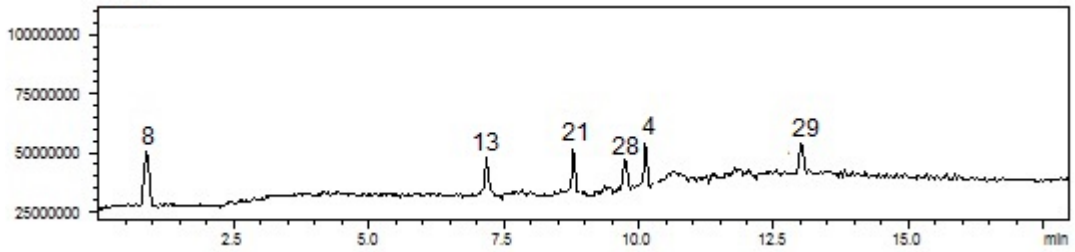
Figura 18 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 5,0 mgL^{-1} de NaOCl, pH 9, 20°C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

A detecção do DBP 29 ocorreu nos experimentos de 5,0 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 4 horas de degradação, na presença de luz e temperaturas de 20 e 40°C. Na Figura 19 observa-se que nesta condição também ocorreu a formação dos DBPs 4, 8, 13, 21 e 28. Além dessa condição, o DBP 13 foi formado nas condições de 1,8 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 2 e 4 horas de degradação e na condição de 5,0 mgL^{-1} de cloro livre, pH 9, após 2 horas de degradação, todos na presença de luz e temperaturas de 20 a 40°C. Os DBPs 4, 21 e 28 foram detectados em todas as condições analisadas, assim como o DBP 8.

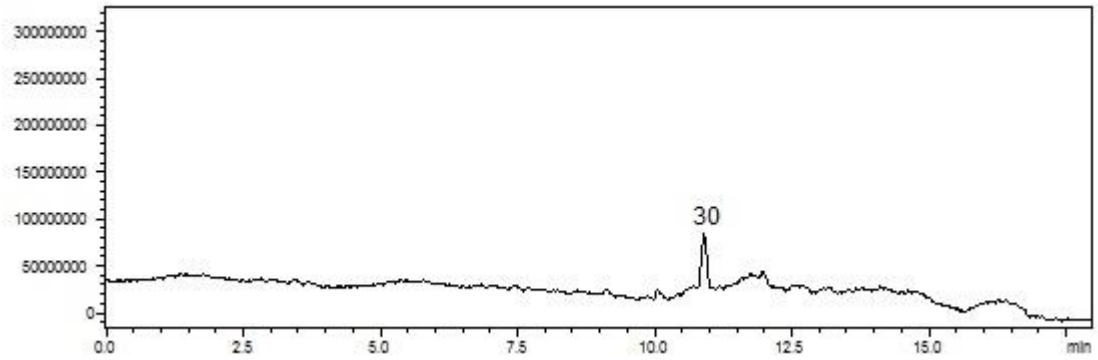
Figura 19 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 4 horas de degradação com 5,0 mgL^{-1} de NaOCl, pH 7, 20 °C e na ausência de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

A formação do DBP 30 ocorreu nos experimentos de 0,2 mgL^{-1} de cloro livre, pH 6 e 7, após 30 minutos de degradação e nos experimentos contendo 3,4 mgL^{-1} de cloro livre, pH 7, após 4 horas na presença de luz, todos à 20 e 40°C (Figura 20).

Figura 20 - Cromatograma TIC da solução de clorexidina na concentração de 5 mgL^{-1}, após 30 minutos de degradação com 0,2 mgL^{-1} de NaOCl, pH 6 e 20 °C e na presença de luz natural.



Fonte: Autoria própria.

Dentre as variáveis avaliadas, constatou-se que o pH, a concentração de cloro e o tempo de reação são as que mais influenciam no comportamento da clorexidina, bem como a formação de DBPs.

Em relação ao pH, nota-se que a degradação da clorexidina foi maior em pH levemente ácido, o que pode ser explicado pelas proporções de OCl^- (hipoclorito) e HOCl (ácido hipocloroso) presentes, visto que, a um pH 6, a forma HOCl é a espécie de cloro que está em maior proporção. Além disso, o ácido hipocloroso é mais reativo que o hipoclorito e, em meio ácido, o grupo amina da clorexidina está presente na forma protonada, favorecendo sua reatividade com o HOCl. A degradação da clorexidina também foi favorecida com a maior dosagem de cloro e tempo de reação.

Por outro lado, a temperatura foi um parâmetro que mostrou não ser significante na formação desses compostos.

4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS DE CLOREXIDINA

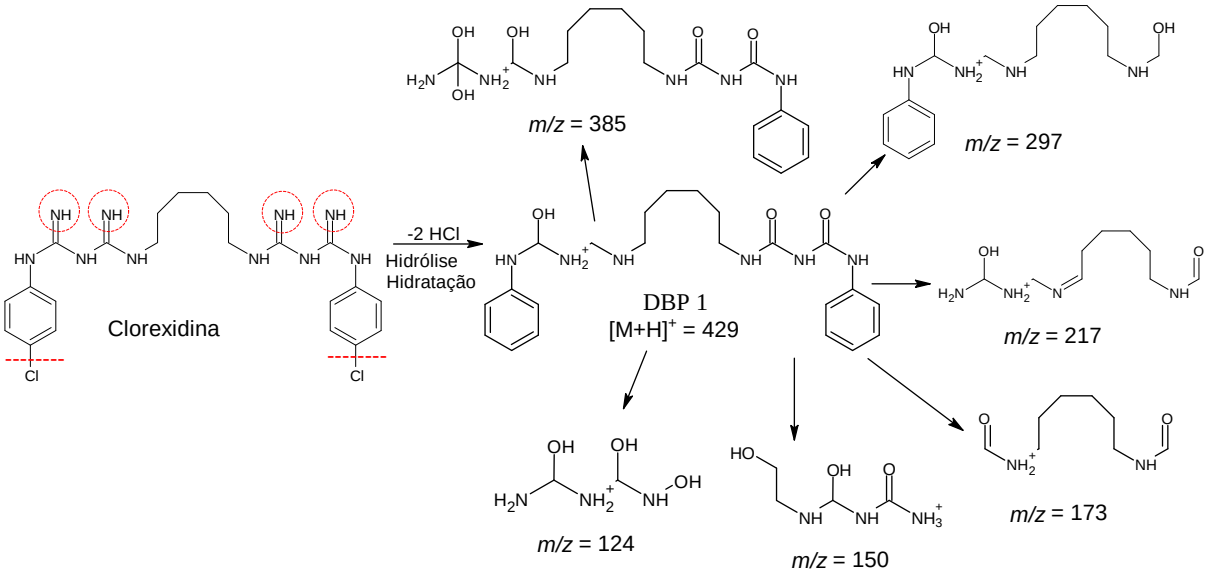
Pelos dados obtidos por LC-MS (íon molecular e fragmentos), bem como dos conceitos teóricos sobre reações, fragmentação e rearranjo de moléculas orgânicas, descritos em literatura (ALLINGER, 1978; MCLAFFERTY; TURECEK, 1993; CAREY, 2011) e em outros trabalhos relatando a reação de iminas e a formação de cloroaminas e de derivados de degradação da clorexidina (LAYER, 1963; BARBIN, 2008; ROCHA, 2008; HU, 2010; YANG, 2012), foi possível propor a fórmula estrutural dos 30 subprodutos detectados nos experimentos.

Nas Figuras 21 a 50 estão apresentadas as fórmulas estruturais, na forma protonada,

propostas para os DBPs identificados e para alguns de seus fragmentos. O processo de formação das moléculas propostas foi baseado na fragmentação e cloração da molécula de clorexidina, bem como nas diversas reações orgânicas possíveis de ocorrerem nos grupos funcionais presentes e/ou formados nesta molécula. Entre estas reações destacam-se: *i)* protonação dos grupos aminas, que ocorreram especialmente em meios ácidos; *ii)* protonação dos grupos iminas, formando sais imínio que são estáveis na presença de íons estabilizadores como o OCl^-; *iii)* hidrólise do grupo imina (catalisada pela presença do OCl^-) gerando grupos carbonilas; *iv)* hidratação das carbonilas formadas pela hidrólise das iminas; *v)* cloração no anel aromático, preferencialmente na posição orto que é orientada pelo grupo amina; *vi)* cloração no grupo amina com a perda de um ou mais hidrogênios; *vii)* cloração do grupo imida (formado pela hidrólise de 2 grupos imina); *viii)* reações de oxidação formando grupos ciano *ix)* oxidação de amina clorinada por OCl^- e *x)* perda de H dos nitrogênios ligados à cadeia de 6 carbonos devido a presença de OCl^-.

O DBP 1 se forma pelas perdas das duas unidades de cloro, ligados aos anéis aromáticos; pela provável hidrólise dos quatro grupos iminas, sendo que em dois deles ocorre a hidratação da carbonila e posterior saída de hidroxilas (Figura 21).

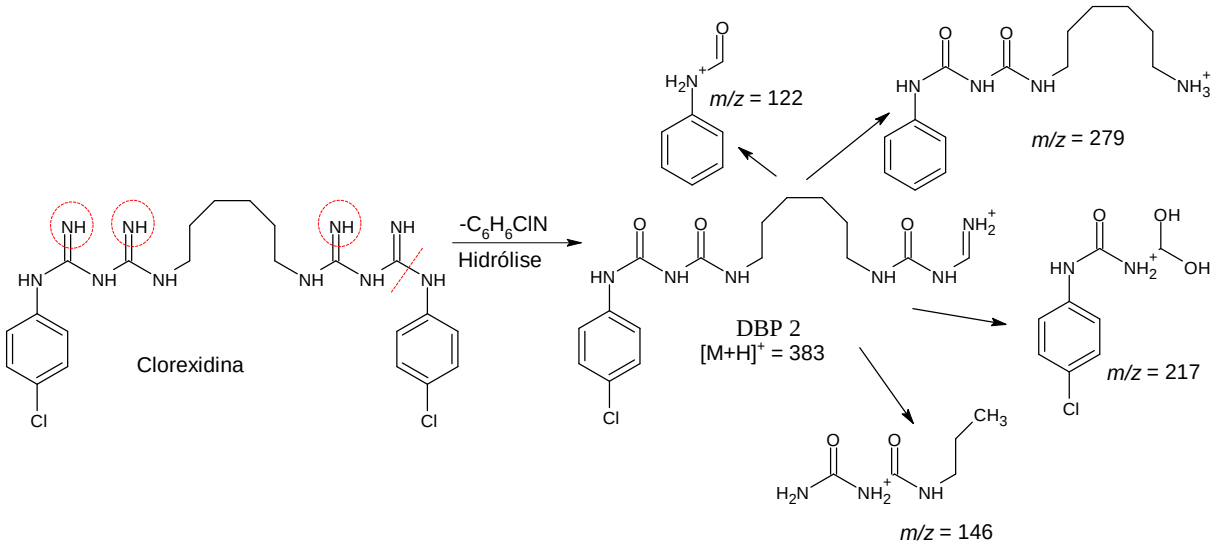
Figura 21: Molécula proposta para o DBP 1 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 2 é formado a partir da saída de cloroanilina e hidrólise dos três grupos iminas (Figura 22).

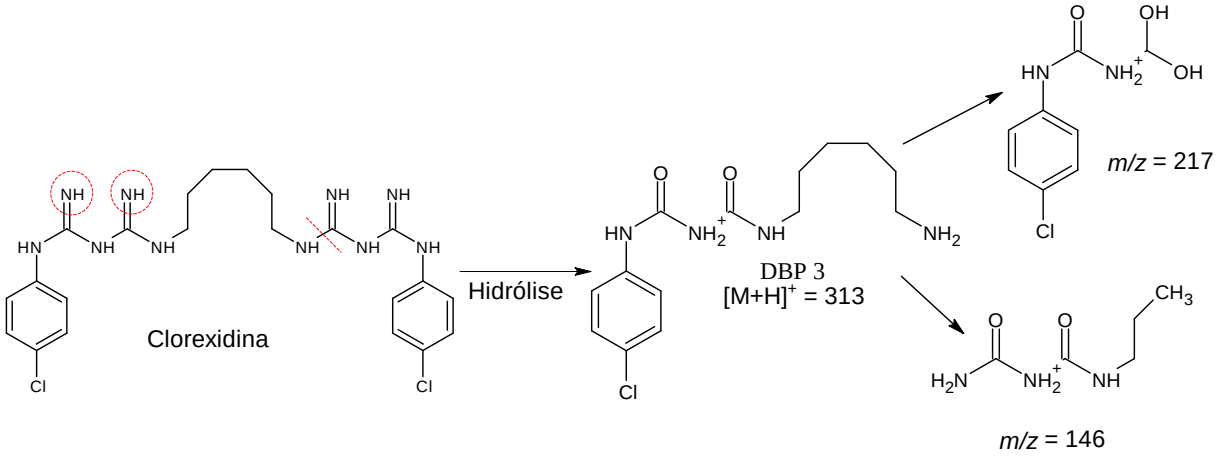
Figura 22 - Molécula proposta para o DBP 2 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

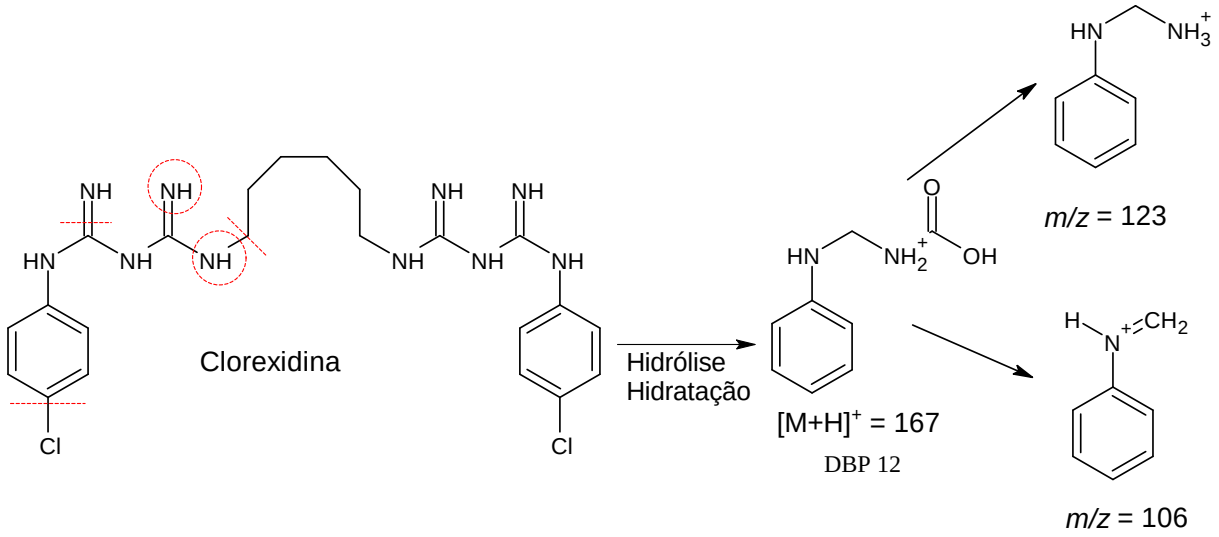
A formação dos DBPs 3 e 12 é proposta a partir do rompimento de uma ligação carbono-nitrogênio e da hidrólise de 2 grupos imina (Figura 23). Para o DBP 12 propõe-se a perda de uma unidade de cloro do anel benzênico, a hidratação de uma das carbonilas do grupo imida e a perda sequencial de uma das hidroxilas proveniente desta hidratação (Figura 24).

Figura 23 - Molécula proposta para o DBP 3 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

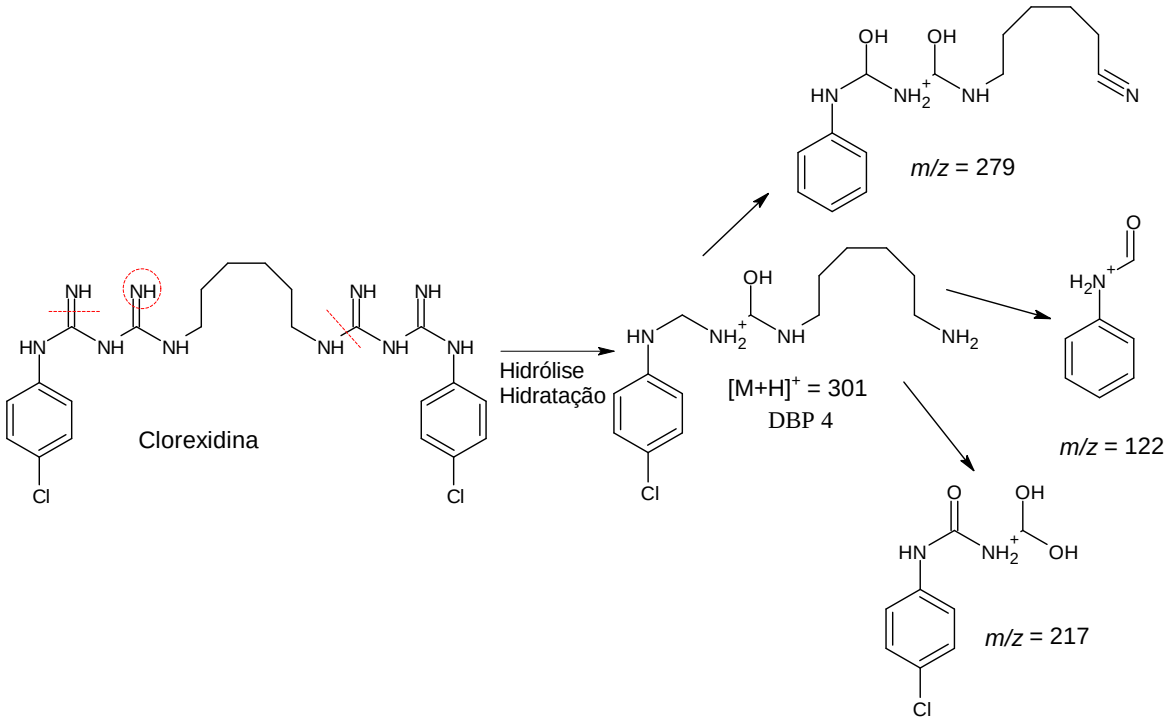
Figura 24 - Molécula proposta para o DBP 12 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 4 é formado pela quebra de uma ligação carbono-nitrogênio (em uma das extremidades da molécula); provável hidrólise de dois grupos iminas com subsequente hidratação das duas carbonilas e perda de uma unidade de hidroxila (Figura 25).

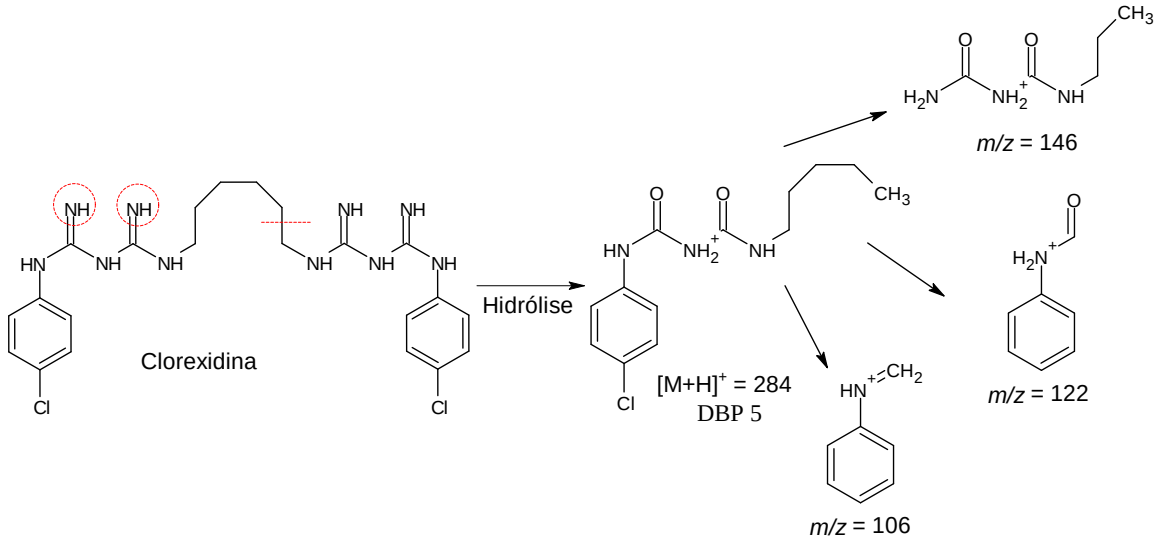
Figura 25 - Molécula proposta para o DBP 4 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

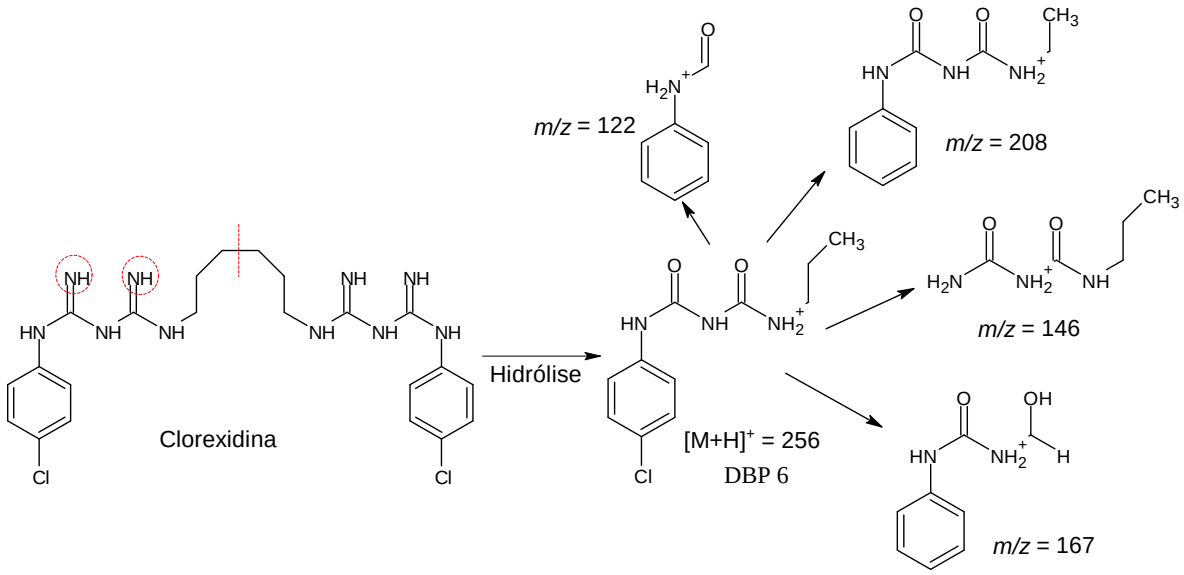
A proposta de formação dos DBPs 5, 6, 8-11 ocorre pelo rompimento da cadeia de carbonos e a hidrólise dos grupos iminas (reação catalisada pela presença do OCl^-), gerando grupos imidas (Figuras 26-31). No DBP 8 ocorre a saída adicional de uma unidade de cloro do anel benzênico (Figura 28). Já nos DBPs 9, 10 e 11 ocorre a entrada de uma unidade de cloro no anel benzênico (Figuras 29-31).

Figura 26 - Molécula proposta para o DBP 5 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



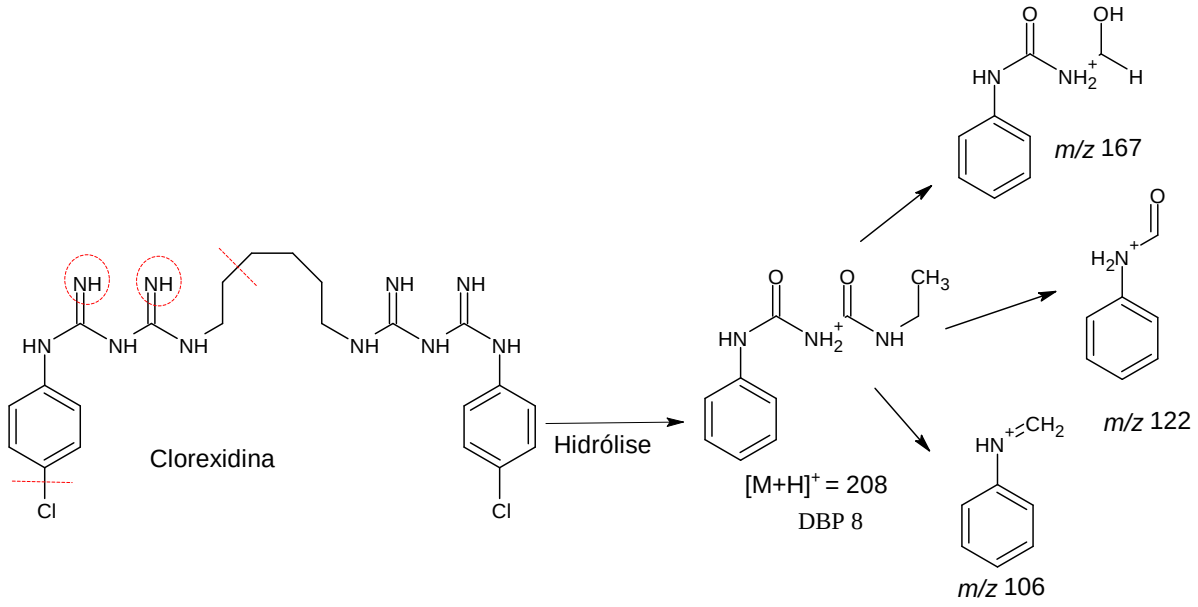
Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Molécula proposta para o DBP 6 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



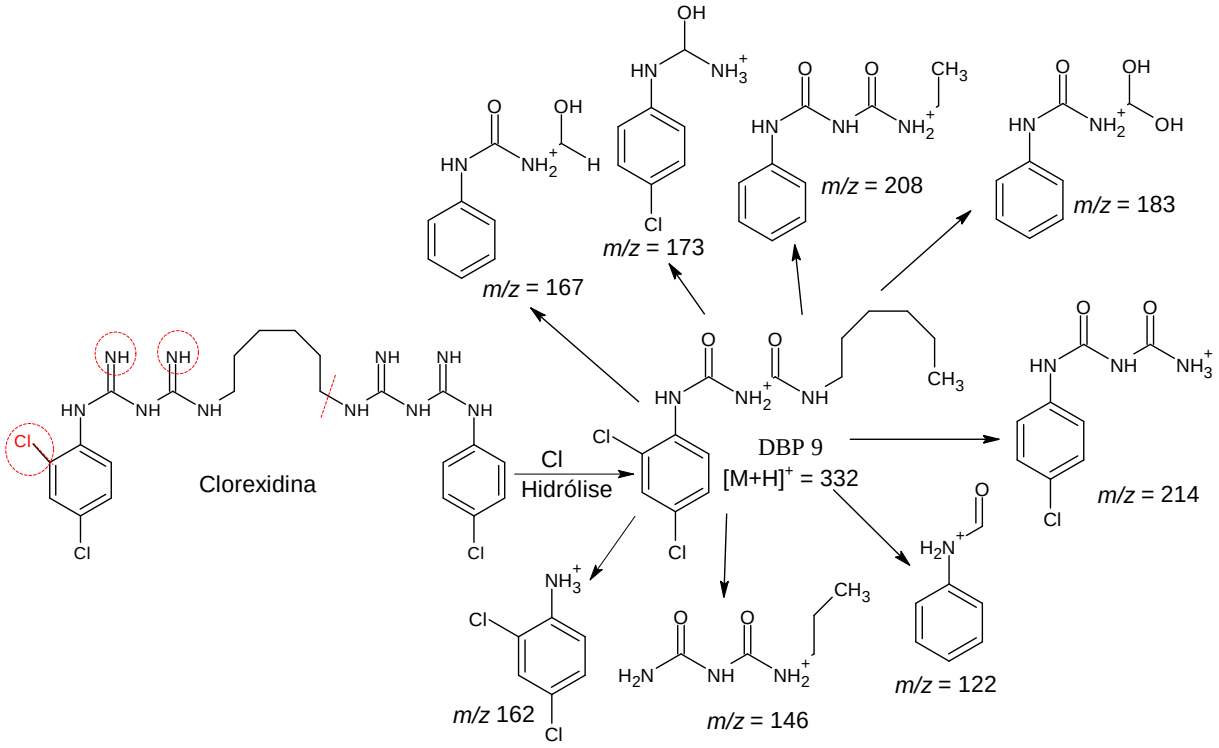
Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Molécula proposta para o DBP 8 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



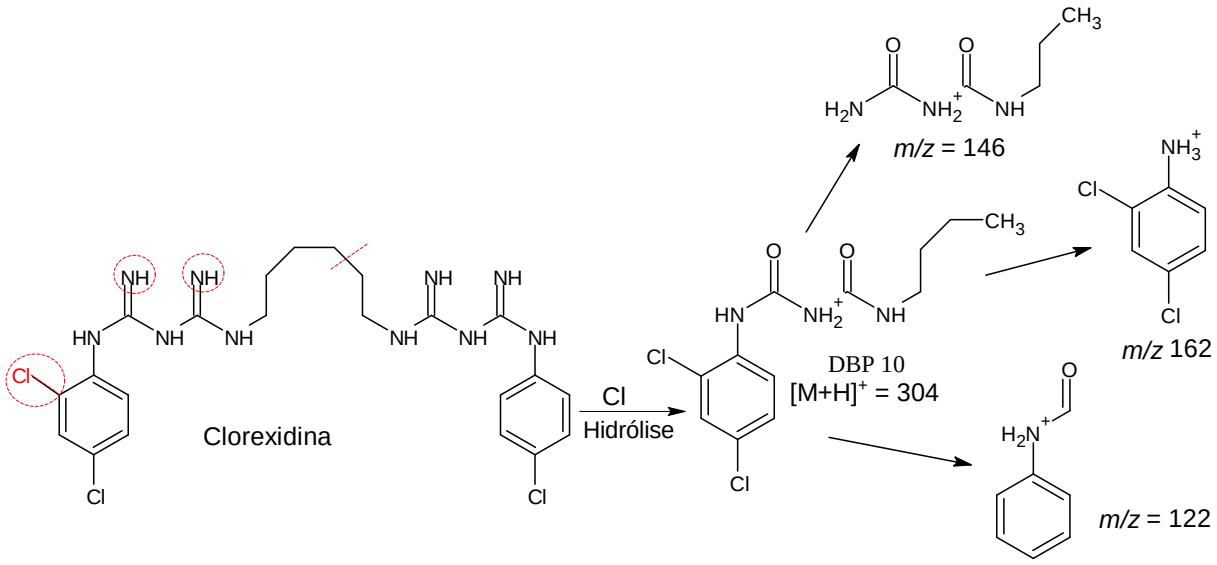
Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Molécula proposta para o DBP 9 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



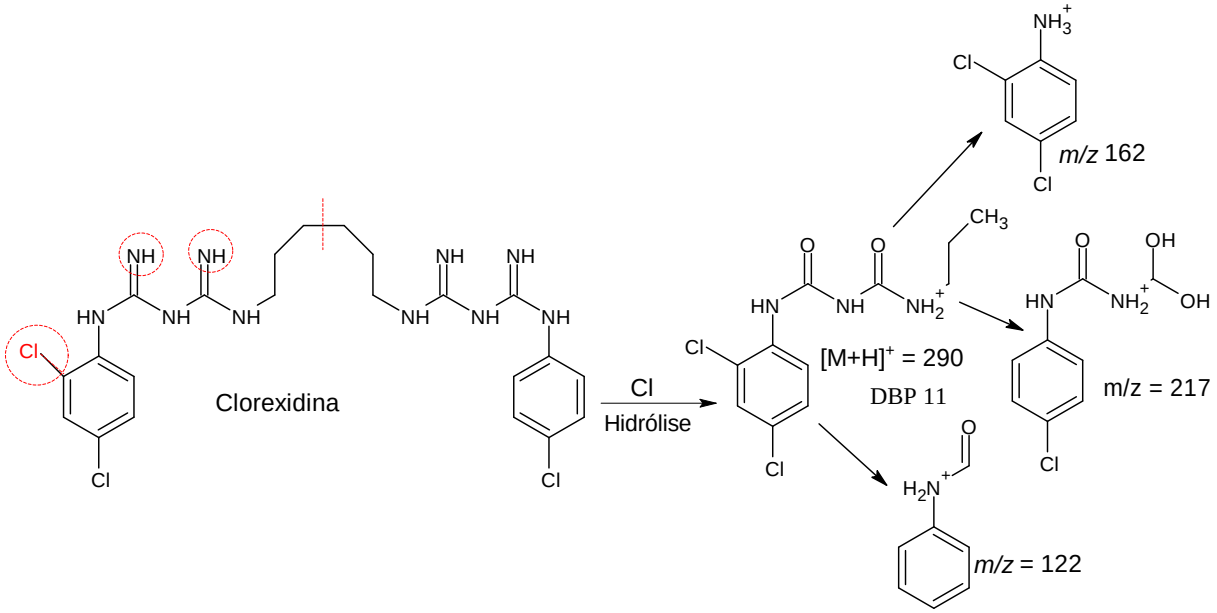
Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Molécula proposta para o DBP 10 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

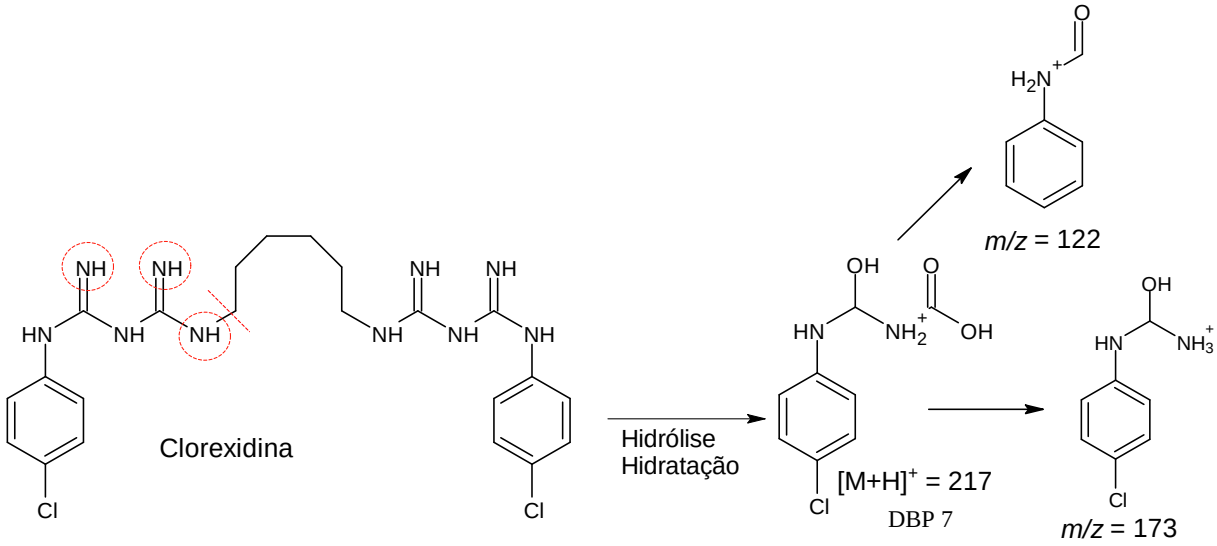
Figura 31 - Molécula proposta para o DBP 11 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Na formação do DBP 7 ocorre a fragmentação de uma das ligações carbono-nitrogênio e hidrólise dos dois grupos iminas. Um dos grupos sofre o processo de hidratação da carbonila gerando duas unidades de hidroxila (Figura 32).

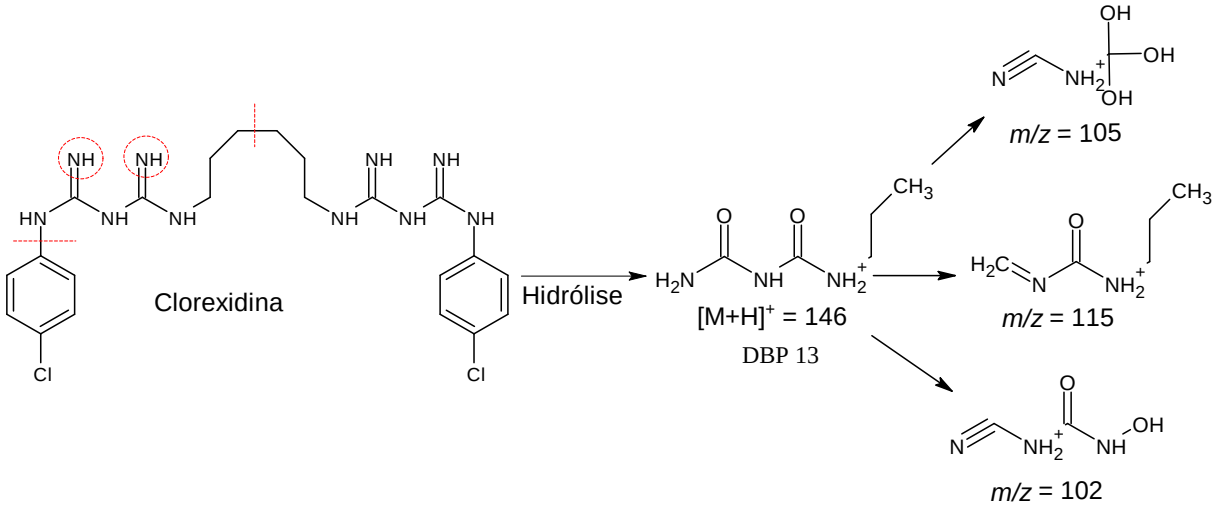
Figura 32 - Molécula proposta para o DBP 7 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Para o DBP 13 é sugerido que ocorra a quebra na cadeia de carbono, seguida da perda do anel benzênico. Posteriormente ocorre a hidrólise dos grupos iminas dando origem a grupos imidas (Figura 33).

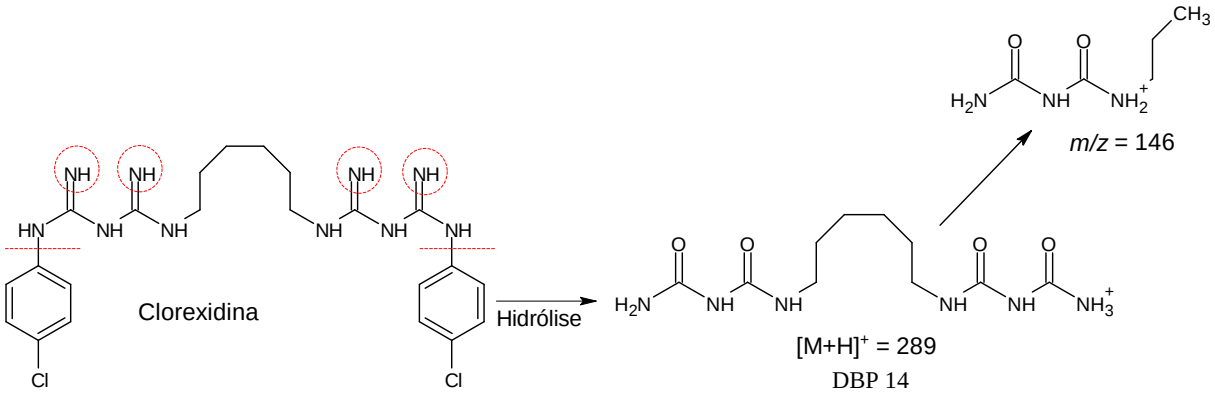
Figura 33 - Molécula proposta para o DBP 13 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Para o DBP 14 propõe-se a perda das duas unidades de clorobenzeno juntamente com a hidrólise dos quatro grupos iminas (Figura 34).

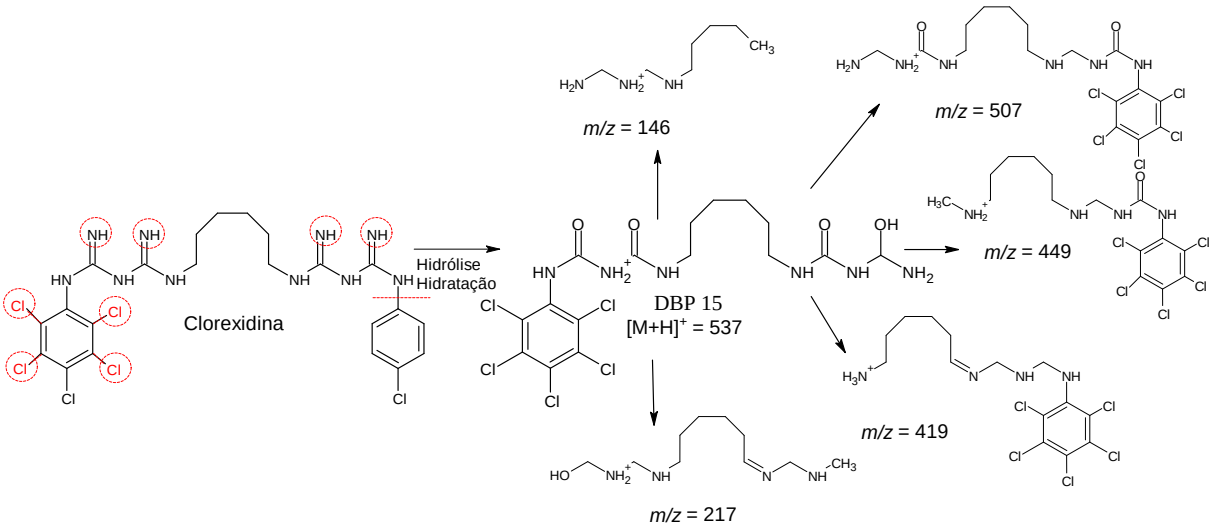
Figura 34 - Molécula proposta o DBP 14 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 15 se forma pela saída da cloroanilina em uma das extremidades da molécula; da cloração do anel benzênico restante (nas posições orto e para) e da hidrólise dos quatro grupos iminas, sendo que em um deles ocorre a posterior hidratação da carbonila e formação de uma hidroxila (Figura 35).

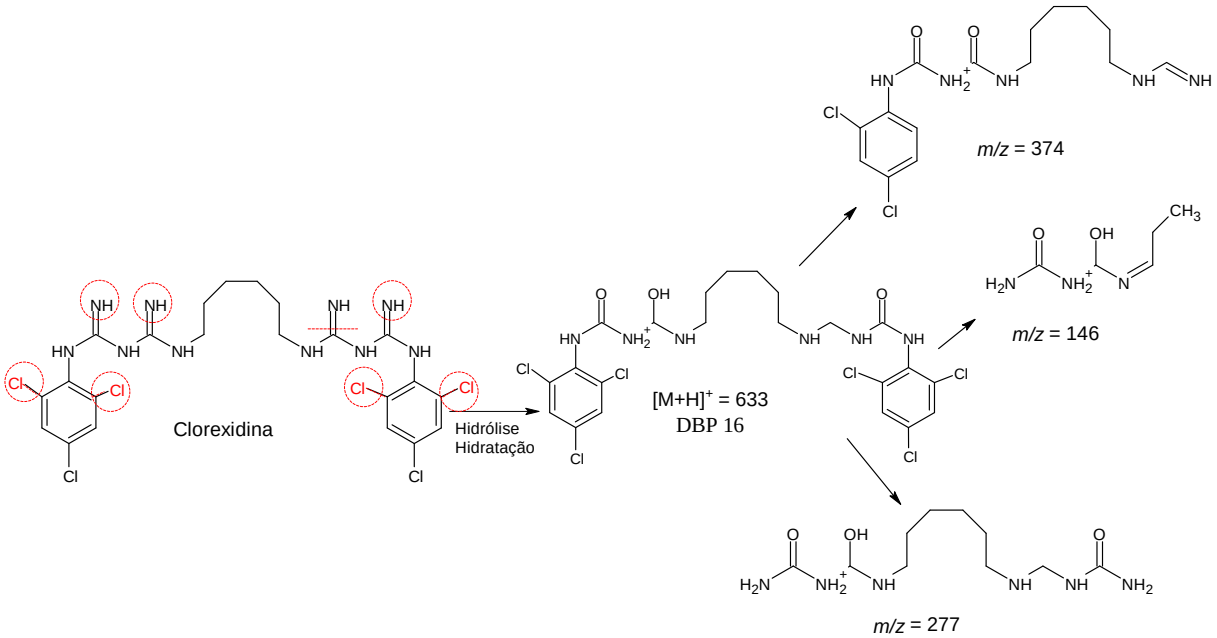
Figura 35 - Molécula proposta para o DBP 15 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 16 é proposto de ser formado pela cloração dos dois anéis aromáticos (na posição orto, orientada pelo grupo amina) e da hidrólise dos quatro grupos iminas, sendo que em um deles ocorre a posterior hidratação da carbonila e saída da hidroxila (Figura 36).

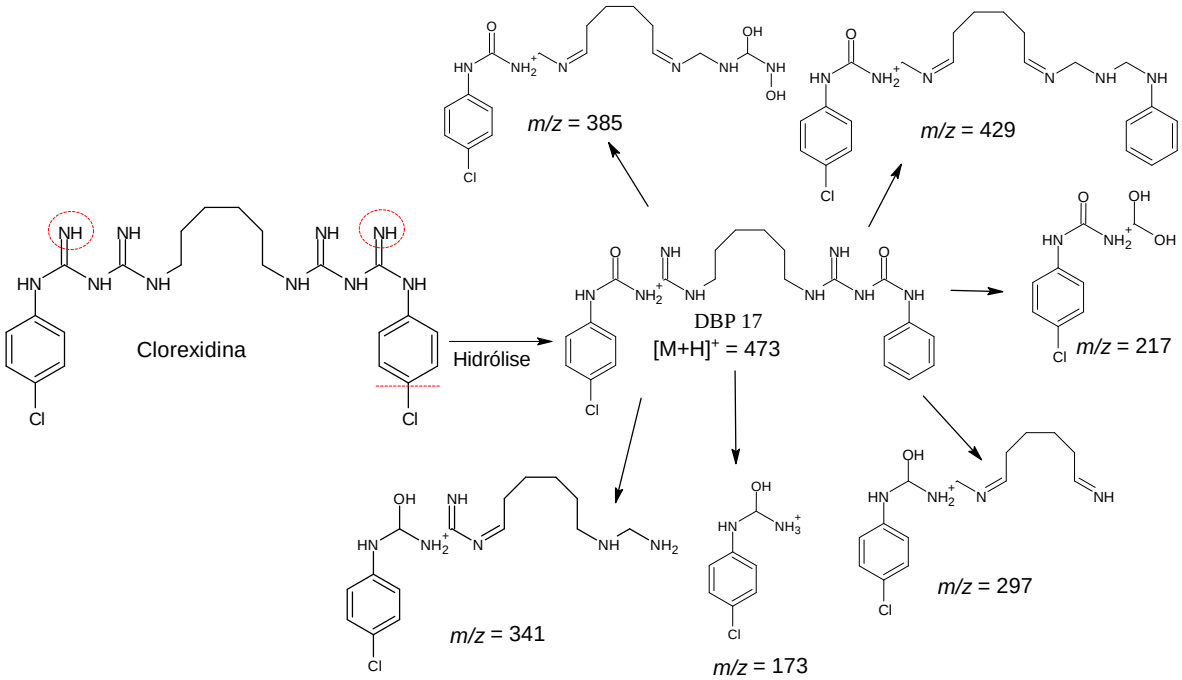
Figura 36 - Molécula proposta para o DBP 16 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 17 é provavelmente originado pela perda de uma unidade de cloro ligado ao anel aromático e a hidrólise de dois grupos iminas (Figura 37).

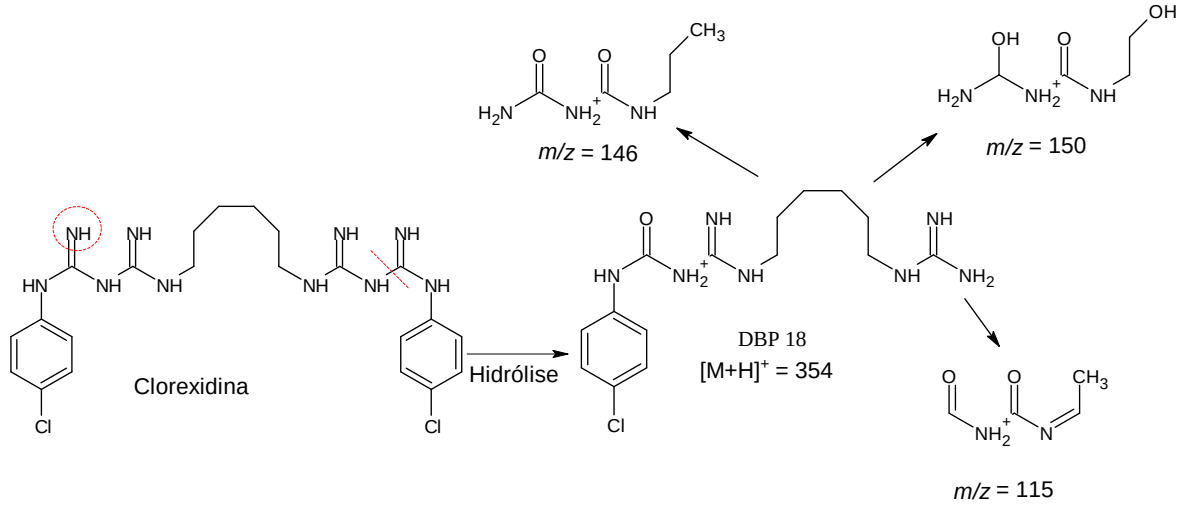
Figura 37 - Molécula proposta para o DBP 17 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

A proposta de formação do DBP 18 é por meio do rompimento de uma ligação carbono-nitrogênio em uma das extremidades e hidrólise de um dos grupos iminas (Figura 38).

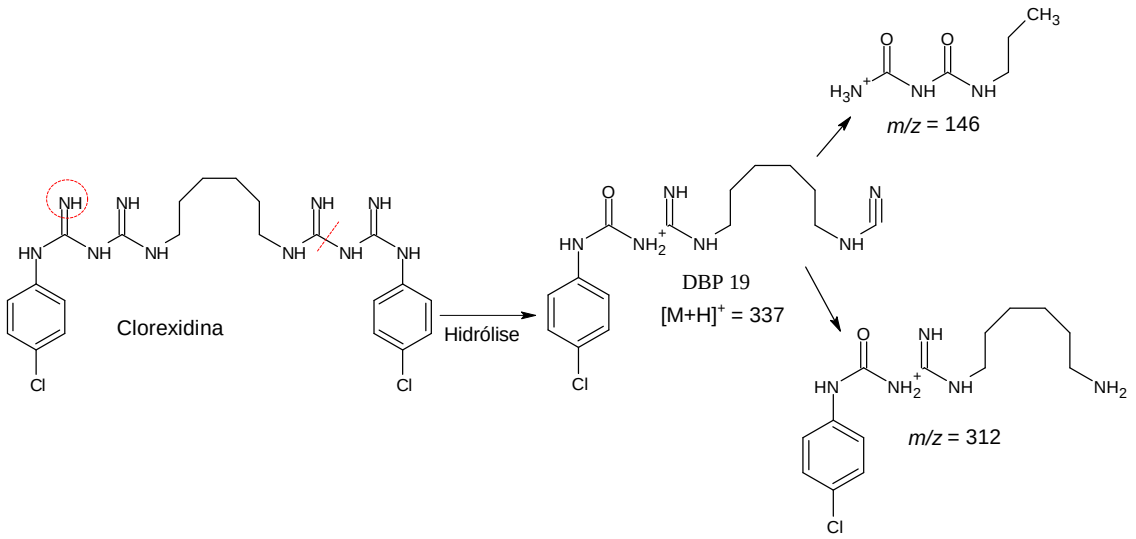
Figura 38 - Molécula proposta para o DBP 18 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

A formação do DBP 19 ocorre a partir da hidrólise de um dos grupos iminas, o rompimento de uma ligação carbono-nitrogênio com consequente formação de grupo ciano (Figura 39). Estruturas semelhantes são propostas na literatura como produtos de degradação da clorexidina (MUSTEATA; PAWLISZYN, 2005).

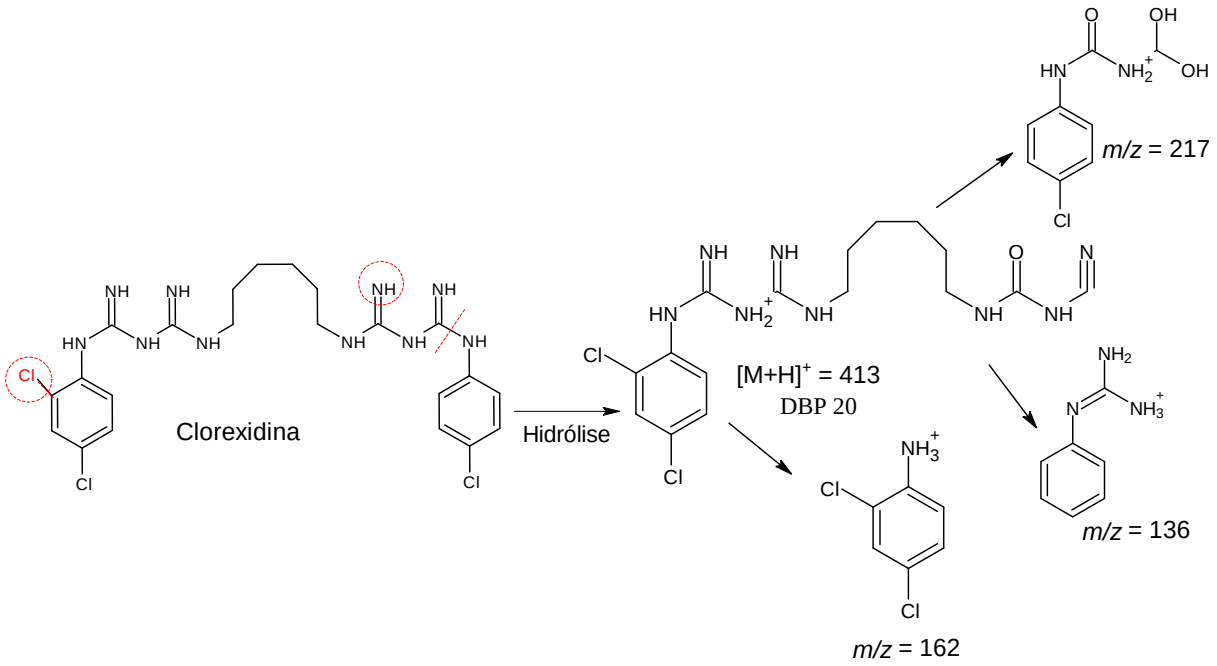
Figura 39 - Molécula proposta para o DBP 19 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 20 foi formado a partir da saída de cloroanilina de uma das extremidades da molécula com formação de grupo ciano, a entrada de uma unidade de cloro no anel benzênico e a hidrolise de um dos grupos iminas (Figura 40).

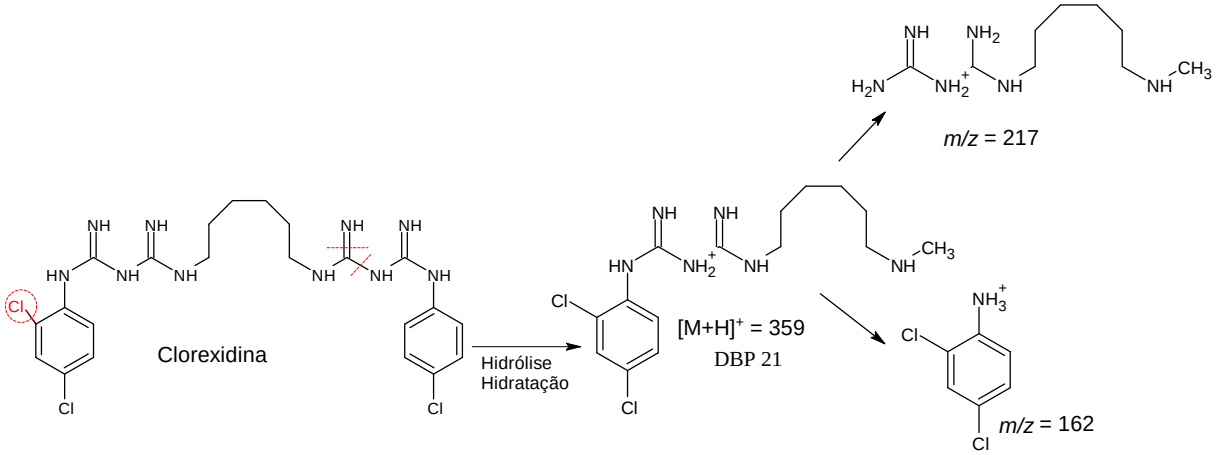
Figura 40 - Molécula proposta para o DBP 20 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Para o DBP 21 é proposto que tenha ocorrido a quebra da ligação carbono-nitrogênio em uma das extremidades da molécula, seguida da hidrólise de um dos grupos imina, formando uma carbonila. Esta carbonila passa pelo processo de hidratação, formando uma hidroxila que posteriormente é perdida (Figura 41).

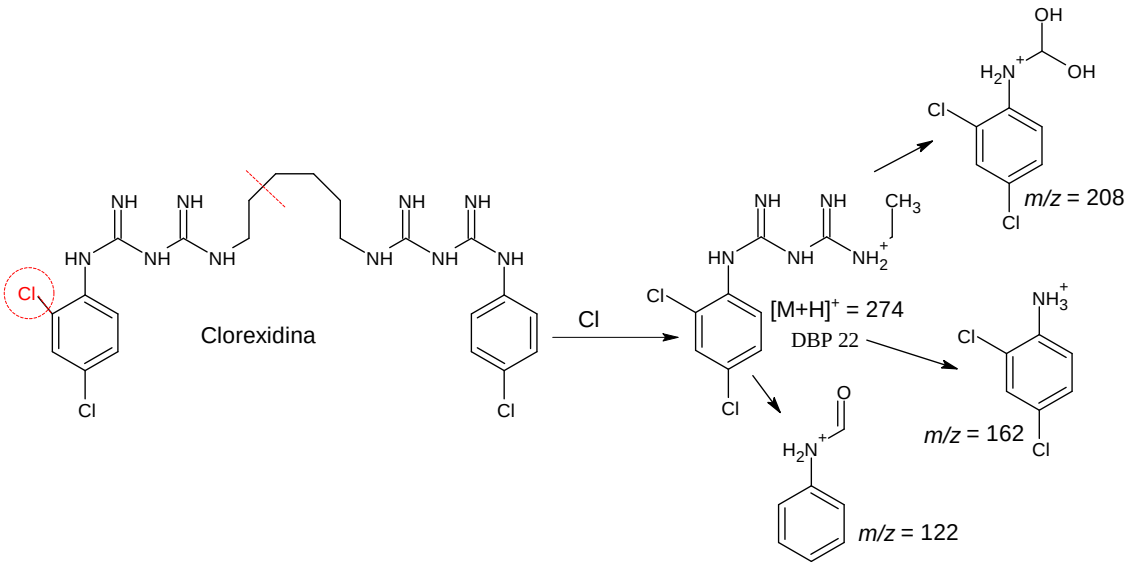
Figura 41 - Molécula proposta para o DBP 21 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 22 é formado apenas pela cloração do anel benzênico (na posição orto) e clivagem da cadeia de carbono (Figura 42).

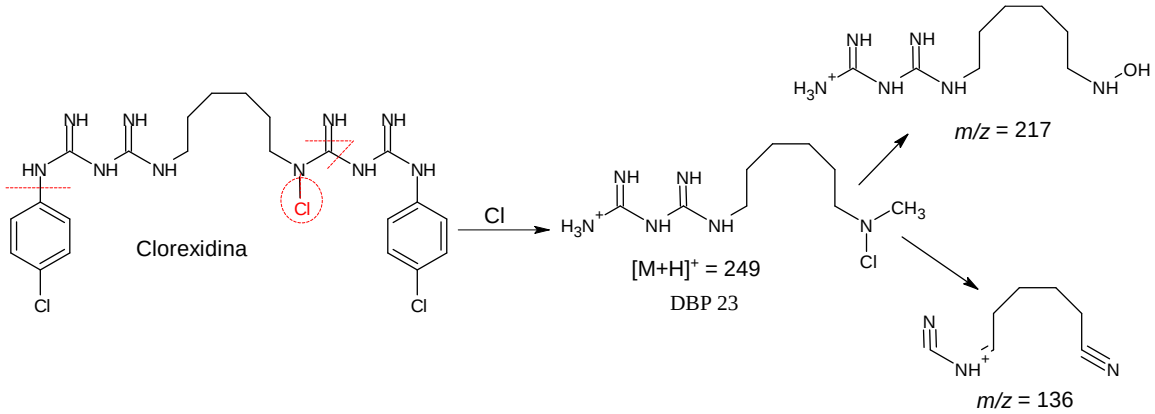
Figura 42 - Molécula proposta para o DBP 22 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 23 se forma pela quebra de uma ligação carbono-nitrogênio (em uma das extremidades) e a entrada sequencial de uma unidade de cloro no nitrogênio. Posteriormente ocorre a perda do clorobenzeno na outra extremidade da molécula de clorexidina (Figura 43).

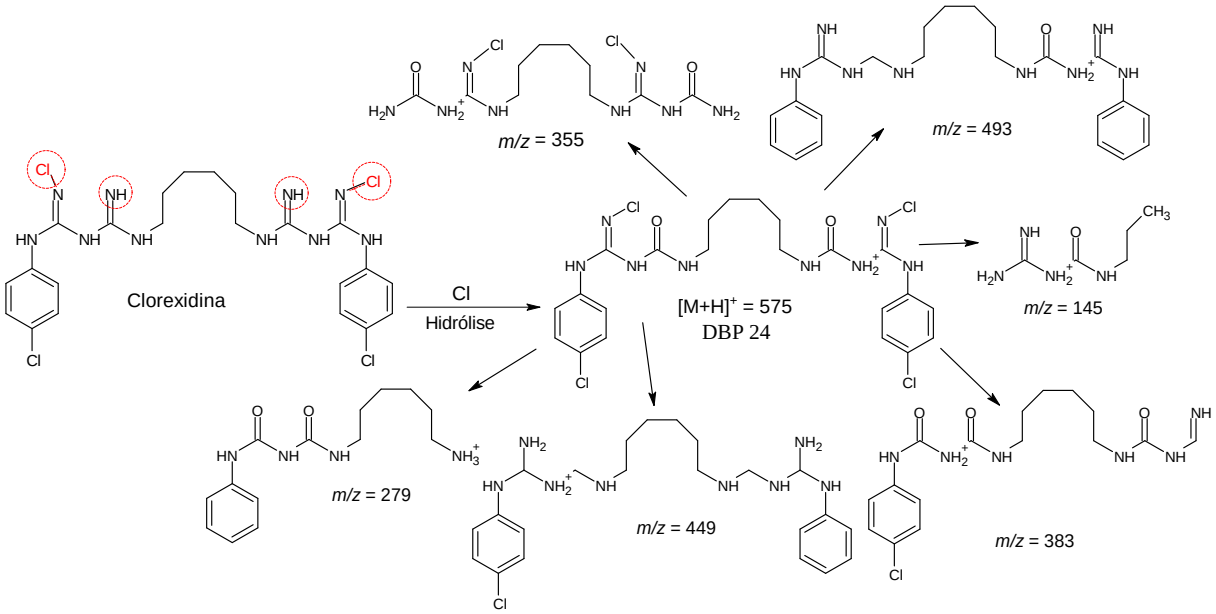
Figura 43 - Molécula proposta para o DBP 23 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 24 é formado a partir da cloração de dois grupos iminas e a hidrólise dos outros dois grupos iminas (Figura 44).

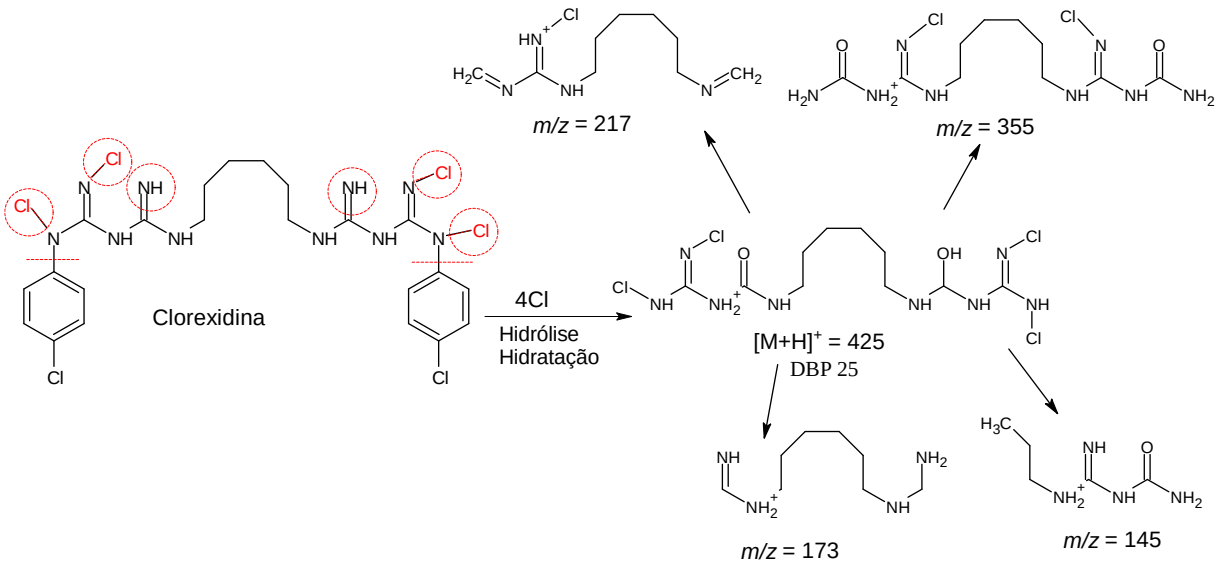
Figura 44 - Molécula proposta para o DBP 24 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

A proposta de formação o DBP 25 se dá pela saída de duas unidades de cloroanilina com a entrada subsequente de um grupo hidroxila em uma das iminas, a hidrólise de um dos grupos imina e a cloração dos outros quatro grupos iminas (Figura 45).

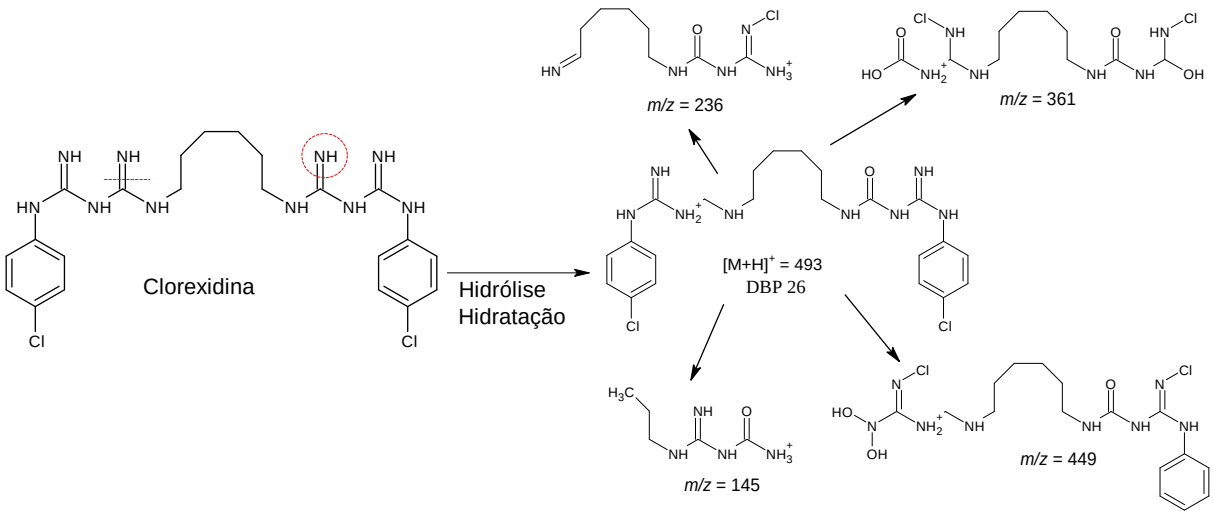
Figura 45 - Molécula proposta para o DBP 25 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

No DBP 26 somente um grupo imina sofre o processo de hidrólise seguida de hidratação com perda da hidroxila formada durante a hidrólise. Esse mecanismo ocorre em meio ácido onde a presença de hidrogênios no meio reacional favorecem a hidrólise do grupo imina e a perda das hidroxilas na forma de água (Figura 46).

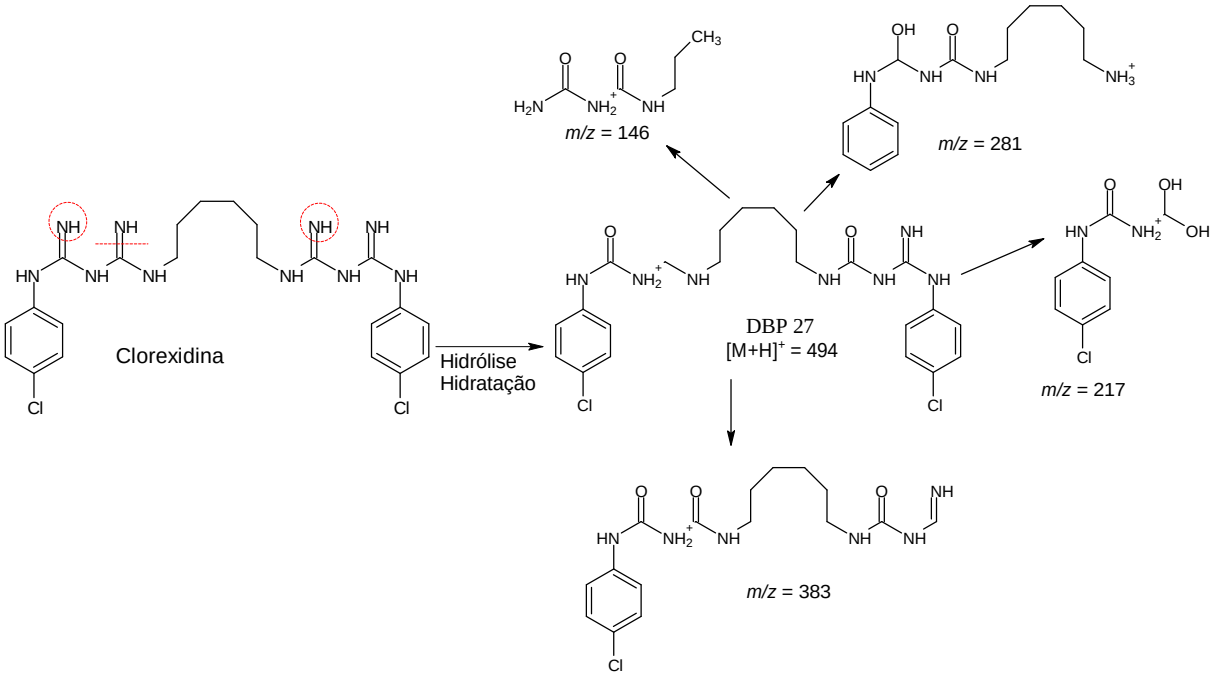
Figura 46 - Molécula proposta para o DBP 26 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Na formação do DBP 27 ocorre a hidrólise de três grupos iminas sendo que uma das carbonilas formada sofre o processo de hidratação com perda sequencial das hidroxilas formadas durante a hidrólise (Figura 47).

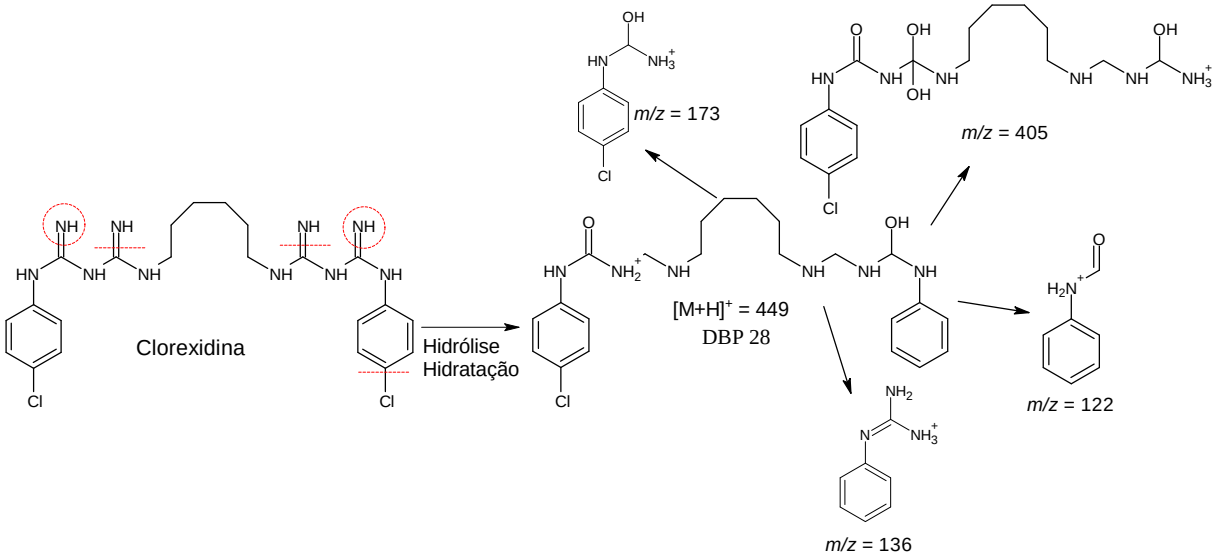
Figura 47 - Molécula proposta para o DBP 27 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Na formação do DBP 28 também ocorre a perda das unidades de cloro de um dos anéis benzênicos e adicionalmente a hidrólise dos quatro grupos iminas. Três destas carbonilas sofrem processo de hidratação da carbonila, sendo que em duas delas ocorre a perda sequencial das hidroxilas formadas durante a hidrólise (Figura 48).

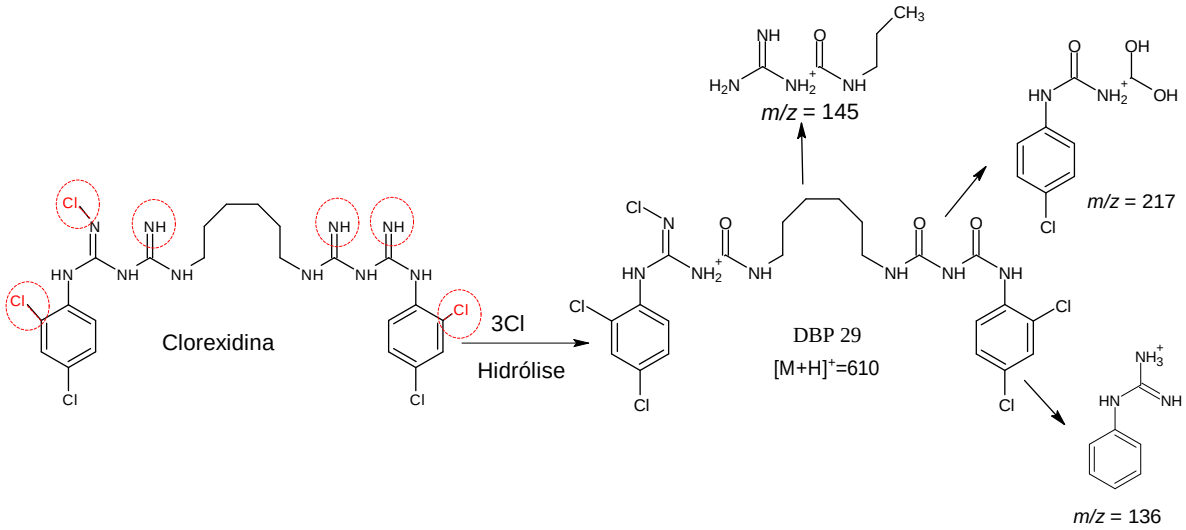
Figura 48 - Molécula proposta para o DBP 28 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

O DBP 29 foi formado pela entrada de duas unidades de cloro uma em cada um dos anéis benzênicos, a hidrólise de três grupos iminas e a cloração de um dos grupos imina (Figura 49).

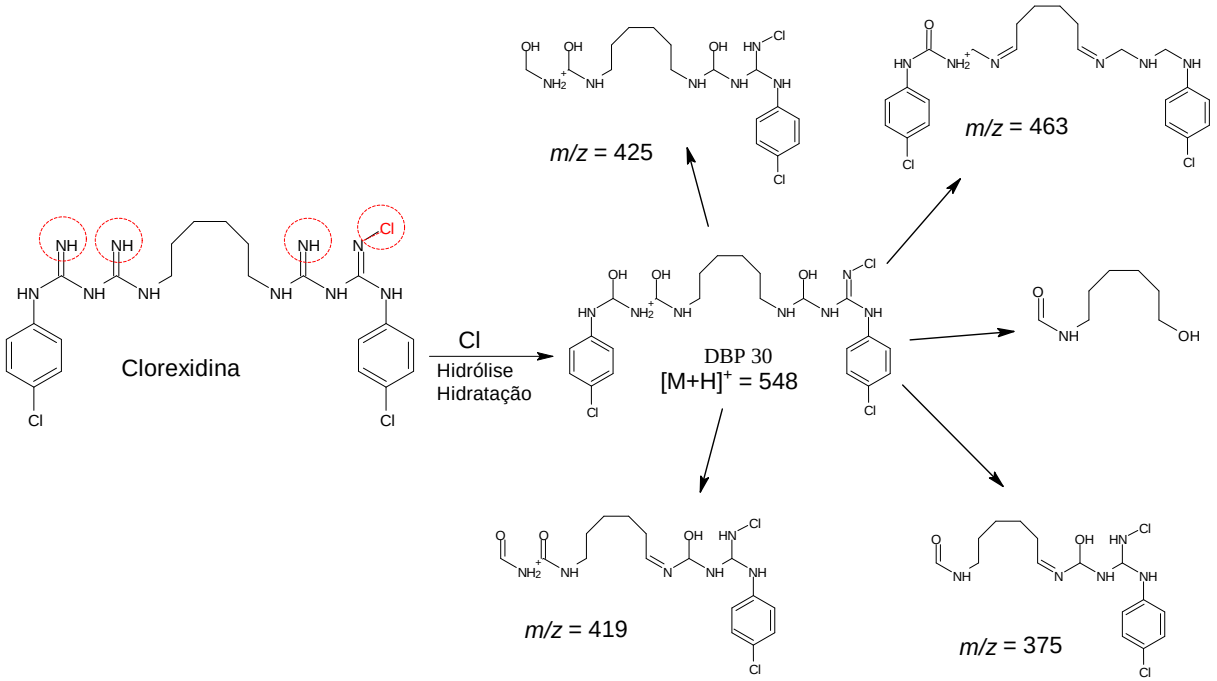
Figura 49 - Molécula proposta para o DBP 29 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

A formação do DBP 30 ocorre pela proposta de cloração do grupo amina e hidrólise de três grupos iminas, com subsequente hidratação das carbonilas e saída de algumas das hidroxilas formadas (Figura 50).

Figura 50 - Molécula proposta para o DBP 30 e para os seus respectivos fragmentos obtidos por LC-MS.



Fonte: Autoria própria.

Tais mecanismos de formação dos DBPs já estão descritos na literatura, tanto para formação de cloroaminas, quanto para derivados de degradação da clorexidina. Contudo, estudos sobre reações da clorexidina submetida a tais condições de concentração de cloro, pH, tempo reacional e temperatura ainda não foram relatados.

4.3 PREDIÇÃO (ECO)TOXICOLÓGICA DOS DBPs

As avaliações da toxicologia e ecotoxicologia dos DPBs foram realizadas utilizando modelos preditivos. Estes métodos preditivos foram empregados visando contribuir com as perspectivas das agências regulatórias quanto à criação e utilização de ensaios alternativos ao de uso em animais para a avaliação da nocividade de substâncias para a saúde humana e o meio ambiente.

O programa VEGA foi escolhido por ser uma plataforma que contém uma ampla gama

de modelos preditivos, além disso, alguns dos seus modelos têm sido citados nos relatórios da Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) (ECHA, 2016). Outra razão é que se trata de um dos sistemas que fornecem informações mais detalhadas sobre os modelos e critérios a serem utilizados para avaliar o resultado.

O VEGA usa os dados de toxicidade experimentais reais e conhecidos de diversos produtos químicos para construir um modelo que relaciona a toxicidade experimentalmente observada com detalhes moleculares dos compostos, a fim de prever a toxicidade de outros produtos químicos (BENFENATI, 2020; GALIMBERTI et al., 2020).

A confiabilidade de cada predição é avaliada pelo Índice de Domínio de Aplicabilidade (IDA). O IDA é calculado agrupando vários outros índices: índice semelhante (verifica a semelhança entre moléculas parecidas, com valor experimental conhecido, e o composto predito); índice de precisão (verifica a precisão da predição para moléculas semelhantes); índice de concordância (leva em consideração a concordância entre o valor predito e os valores experimentais dos compostos mais semelhantes) e índice ACF (verifica a similaridade de um ou mais fragmentos centrados em átomos). O agrupamente destes índices fornece uma avaliação global geral sobre o domínio de aplicabilidade para o composto predito (CASSANO et al., 2014; CAPPELLI et al., 2015; BLACK et al., 2019; BENFENATI et al., 2020; GALIMBERTI et al., 2020).

O índice global varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais confiável é a predição. Valores de IDA superiores a 0,7 indicam que o DBP previsto está dentro do Domínio de Aplicabilidade do modelo, enquanto que os resultados que apresentam IDA abaixo deste valor não são considerados confiáveis por estarem fora do domínio de aplicabilidade do modelo.

Desta forma, neste item serão apresentados e discutidos os resultados das predições toxicológicas e ecotoxicológicas para os DBPs que apresentaram IDA maior ou igual a 0,7 nos diferentes modelos testados. As predições dos demais modelos não serão apresentadas por estarem fora do Domínio de Aplicabilidade do modelo.

De acordo com Lunghini et al. (2020), a falta de aderência de algumas substâncias alvos aos modelos preditivos se deve à ausência e qualidade dos dados experimentais com organismos vivos, o que remete à necessidade de mais dados experimentais acerca das substâncias presentes nos produtos comerciais e seus derivados.

4.3.1 RESULTADOS DA PREDIÇÃO TOXICOLÓGICA

Os modelos empregados na avaliação toxicológica previram apenas a provável atividade dos DBPs (ativos ou inativos) sem uma relação dose-resposta. No quadro 1 estão apresentados os resultados obtidos pelo VEGA-QSAR para os DBPs que apresentaram IDA maior ou igual a 0,7 nos diferentes modelos testados.

Quadro 1 – Predição de toxicidade dos DBPs da clorexidina por modelos QSAR pela plataforma VEGA-QSAR. (continua)

DBP	Predição de toxicidade (IDA)
2	Não mutagênico[2] (0,71), mutagênico[4] (0,81), não carcinogênico[7,9,10] (0,75-0,78), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,75-0,89), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,89), hepatotóxico[16] (0,89).
3	Não mutagênico[1-4] (0,88), carcinogênico[6] (0,74), não carcinogênico[9,10] (0,9), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,9), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,91), hepatotóxico[16] (0,76)
5	Não mutagenico[2-4] (0,74-0,91), carcinogênico[6] (0,76), não carcinogênico[9,10] (0,91), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,91), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,92), hepatotóxico[16] (0,77)
6	Mutagênico[1] (0,70), não mutagênico[2-4] (0,75-0,92), carcinogênico[6] (0,78), não carcinogênico[9,10] (0,92), inativo para receptor de estrogênio[11,12,13] (0,91), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,93), hepatotóxico[16] (0,92)
8	Não mutagênico[1-4] (0,86-0,92), carcinogênico[8] (0,75), não carcinogênico[9,10] (0,90), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,92), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,93), hepatotóxico[16] (0,76)
9	Mutagênico[1] (0,81), não mutagênico[3,4] (0,78-0,89), não carcinogênico[6,9,10] (0,75-0,91), carcinogênico[8] (0,72), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,77-0,91), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,91), hepatotóxico[16] (0,76)
10	Não mutagênico[2-4] (0,74-0,90), não carcinogênico[6,9,10] (0,76-0,92), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,92), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,92), hepatotóxico[16] (0,90)
11	Mutagênico[1] (0,70), não mutagênico[2-4] (0,74-0,91), não carcinogenico[6,7,9,10] (0,73-0,93), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,93), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,92), hepatotóxico[16] (0,91)
12	Não mutagênico[1,3,4] (0,89-0,93), carcinogênico[8] (0,75), não carcinogenico[9,10] (0,76), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[12,13] (0,93), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,93)
13	Não mutagênico[3] (0,77), mutagênico[4] (0,78), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[11,12,13] (0,87-0,93), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,93)
14	Não mutagênico[1,2,4] (0,72-0,80), não carcinogênico[6,9,10] (0,74), inativo para receptor de estrogênio[11,12,13] (0,73-0,88), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,89)

Quadro 1 – Predição de toxicidade dos DBPs da clorexidina por modelos QSAR pela plataforma VEGA-QSAR. (continuação)

17	Não mutagênico[3] (0,85), mutagênico[4] (0,86), não carcinogênico[5,7,9,10] (0,72-0,85), carcinogênico[6] (0,71), inativo para receptor de estrogênio[11,12] (0,72-0,88), ativo para receptor de androgênio[13] (0,78), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,88)
18	Não mutagênico[1-3] (0,70-0,86), carcinogênico[6] (0,72), não carcinogênico[9,10] (0,74-0,87), inativo para receptor de estrogênio[11,12] (0,74-0,88), ativo para receptor de androgênio[13] (0,77), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,89)
19	Não mutagênico[3,4] (0,87), carcinogênico[6] (0,73), inativo para receptor de estrogênio[12] (0,89), ativo para receptor de androgênio[13] (0,76), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,90)
20	Não mutagênico[3] (0,84), mutagênico[4] (0,80), não carcinogênico[6] (0,84), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[12,13] (0,74-0,88), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,87)
21	Não mutagênico[1-4] (0,72-0,86), não carcinogênico[6,7,9,10] (0,73-0,86), inativo para receptor de estrogênio[11,12] (0,73-0,88), ativo para receptor de androgênio[13] (0,77), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,88)
22	Não mutagênico[2-4] (0,72-0,90), não carcinogênico[6,7,9,10] (0,72-0,90), inativo para receptor de estrogênio[11,12] (0,76-0,90), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (093), hepatotóxico[16] (0,95)
23	Não mutagênico[1,2] (0,79), mutagênico[4] (0,74), não carcinogênico[7] (0,79), inativo para receptor de androgênio[13] (0,86), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,90)
26	Não mutagênico[3] (0,71), mutagênico[4] (0,86), não carcinogênico[5,7,9,10] (0,72-0,79), carcinogênico[6] (0,70), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[12,13] (0,73-0,88), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,79-0,87)
27	Não mutagênico[3] (0,72), mutagênico[4] (0,87), não carcinogênico[5,7,9,10] (0,71-0,79), carcinogênico[6] (0,71), inativo para receptor de estrogênio e androgênio[12,13] (0,74-0,89), inativo para receptor de tiroide A e B[14,15] (0,79-0,88)

Fonte: Autoria própria.
Modelos de mutagenicidade: [1]CAESAR; [2]SarPy/IRFMN; [3]ISS; [4]KNN/Read-Across.
Modelos de carcinogenicidade: [5]CAESAR; [6]ISS; [7]IRFMN/Antares; [8]IRFMN/ISSCAN-CGX; [9]IRFMN/carcinogenicidade oral; [10]IRFMN/carcinogenicidade por inalação.
Modelo de receptor de estrogênio: [11]IRFMN e [12]IRFMN/CERAPP.
Modelo de receptor de androgênio: [13]IRFMN/COMPARA.
Modelo de receptor de tiroide Alfa: [14]NRMEA.
Modelo de receptor de tiroide Beta: [15]NRMEA.
Modelo de hepatoxicidade: [16]IRFMN.

Analisando os resultados dos parâmetros de mutagenicidade, carcinogenicidade e receptor de estrogênio, constatou-se que houve divergência de resultados para alguns DBPs entre os diferentes modelos avaliados. Isso provavelmente se deve ao parâmetro adotado por cada modelo para realizar a predição da atividade da molécula alvo (DBP). Em alguns modelos esta atividade é predita com base em fragmentos e/ou estruturas existente na molécula alvo que

já foi experimentalmente correlacionada com a atividade predita. Em outros modelos a atividade é predita com base na similaridade da molécula alvo com moléculas do banco de dados da plataforma identificadas como tendo alto índice de similaridade com a molécula alvo.

Em relação à mutagenicidade, os DBPs que apresentaram atividade em pelo menos um dos modelos testados foram: 2, 6, 9, 11, 13, 17, 20, 23, 26 e 27.

Quanto ao DBP 2, o mesmo foi previsto como não mutagênico pelo modelo SarPy/IRFMN e como mutagênico pelo modelo KNN/Read-across. Ao observar as moléculas utilizadas para descrever a atividade do DBP 2 no modelo KNN/Read-across, nota-se que existe a presença de um anel aromático com dois radicais de nitrogênios na posição orto, sendo esta estrutura a responsável pela atividade mutagênica destas moléculas do modelo. Contudo, apesar da similaridade da molécula do DBP 2 com as moléculas modelos, o DBP 2 não apresenta essa estrutura então considerou-se a predição obtida pelo modelo SarPy/IRFMN como a mais adequada e, portanto, que este DBP pode ser considerado como não mutagênico.

Os DBPs 6, 9 e 11 foram preditos como mutagênicos pelo modelo CAESAR e como não mutagênicos pelos demais modelos. A atividade mutagênica no modelo CAESAR é atribuída à estrutura O=C(NC1CCC(C(C1)Cl)Cl)N(C)C. Esta estrutura está presente nas moléculas dos DBPs 6, 9 e 11 e, portanto, considera-se que a predição de mutagenicidade obtida pelo modelo CAESAR pode ser considerada para estes DBPs.

O modelo ISS previu os DBPs 13, 17, 20, 23, 26 e 27 como não mutagênicos, enquanto o modelo KNN/Read-across previu estes DBPs como mutagênicos. No caso dos DBPs 13 e 23, a previsão de mutagenicidade provavelmente ocorreu devido à presença da estrutura O=NN nos compostos semelhantes, contudo, esta estrutura não está presente nestes DBPs, logo podem ser considerados como não mutagênicos. Em relação aos DBPs 17, 20, 26 e 27, observa-se que as estruturas dos compostos utilizados para comparação são muito diferentes destes DBPs, logo esta predição pode não ser confiável.

Em relação à carcinogenicidade, os DBPs 3, 5, 6, 8, 9, 12, 17, 18, 19, 26 e 27 foram previstos como tendo atividade em pelo menos um dos modelos preditivos.

Os DBPs 3, 5, 6, 17, 18, 19, 26 e 27 foram previstos como carcinogênicos pelo modelo ISS, tendo como destaque o alerta estrutural 31a, que está relacionado à presença de benzeno halogenado, sendo que essa estrutura está presente nestes DBPs. Já o modelo IRFMN/ISSCAN-CGX previu os DBPs 8, 9 e 12 como carcinogênicos devido ao alerta estrutural 42, que se refere à presença da estrutura NC1CCCCC1 que também está presente na estrutura dos referidos DBPs.

Considerando os efeitos disruptores endócrinos avaliados, todos os DBPs avaliados (Quadro 1) não apresentaram atividade como receptor de estrogênio e de tiroide A e B. Como receptor de androgênio, os DBPs 17-19 e 21 se demonstraram ativos pelo modelo IRFMN/COMPARA. A atividade prevista por este modelo foi correlacionada à presença da estrutura NC1CCC(Cl)CC1 nos DBPs, sendo que esse fragmento também está presente nas moléculas de referência que foram utilizadas para avaliar a atividade dos DBPs alvo, neste caso, a predição da atividade destes DBPs pode ser considerada.

Os DBPs 2, 3, 5, 6, 8-11 e 22 foram previstos como hepatotóxicos pelo modelo IRFMN. Para estes DBPs o alerta estrutural destacado foi NCNC1CCCCC1, sendo que alguns compostos do modelo também possuem essa estrutura, o que permite uma maior confiabilidade na predição da atividade desta molécula.

4.3.2 RESULTADOS DA PREDIÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

Nas Tabelas 5-7 estão representados os resultados da predição de ecotoxicidade aquática aguda (de curto prazo) da clorexidina e dos DBPs (com IDA > 0,7) para algas (EC_{50}), *Daphnia magna* (LC_{50} e EC_{50}) e peixes (LC_{50}), respectivamente.

Tabela 5 - Resultados dos testes de ecotoxicidade aguda em algas (EC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA

Composto	**Toxicidade em alga – EC_{50} (mgL^{-1}) ProtoQSAR/Combase**
Clorexidina	-
DBP 3	0,2777
DBP 5	0,3155
DBP 6	0,3586
DBP 8	0,4643
DBP 9	0,2481
DBP 10	0,2824
DBP 11	0,3014
DBP 13	295,75
DBP 14	0,4131

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 - Resultados dos testes de ecotoxicidade em *Daphnia magna* (LC_{50} e EC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA

	Toxicidade D. magna – LC_{50} (mgL^{-1})		**Toxicidade D. magna – EC_{50} (mgL^{-1})**
Composto	**EPA**	**DEMETRA**	**IFRMN/Combase**
Clorexidina	0,0071	0,0380	0,2105
DBP 3	0,1547	-	0,0088
DBP 5	0,2111	-	0,0176
DBP 6	0,2727	6,97	0,03
DBP 8	1,11	11,05	0,2793
DBP 9	0,1344	-	0,0193
DBP 10	0,1774	-	0,0389
DBP 11	0,1986	-	0,0552
DBP 13	19,34	-	23,57
DBP 14	2,44	24,87	-
DBP 17	-	0,0467	-

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Resultados dos testes de ecotoxicidade em peixes (LC_{50}) obtidos pela plataforma VEGA

	Toxicidade peixe - LC_{50} (mgL^{-1})			
Composto	**Sarpy/IRFMN**	**KNN/Read-across**	**NIC**	**IRFMN/Combase**
Clorexidina	1-10	-	0,1248	1,95
DBP 3	1-10	41,65	1,78	0,1624
DBP 5	10-100	41,65	1,15	0,6251
DBP 6	10-100	17,93	3,67	1,69
DBP 8	10-100	102,62	2,98	2,86
DBP 9	1-10	22,82	2,97	0,2019
DBP 10	1-10	23,34	0,3804	0,5545
DBP 11	1-10	14,47	0,3629	0,9161
DBP 12	10-100	360,15	218,86	20,68
DBP 13	>100	3371,7	8,93	9,64
DBP 14	1-10	41,61	21,06	-

Fonte: Autoria própria.

Os dados de toxicidade aguda da clorexidina, realizados com organismos vivos e divulgados na literatura, mostram que ela é tóxica para organismos aquáticos, com efeitos adversos observados em baixas concentrações (< 0,1 mgL^{-1}) (ECCC, 2019). Nestes estudos os valores de EC_{50} para algas ficaram na faixa de 0,0062-0,038 mgL^{-1}, para *Daphnia magna* no intervalo de 0,025-0,42 mgL^{-1} e os valores de LC_{50} para peixes foram da ordem de 0,29-2,08 mgL^{-1}.

Apesar dos estudos ecotoxicológicos da clorexidina já estarem amplamente divulgados na literatura, neste estudo a determinação do EC_{50} e LC_{50} da clorexidina foi realizada visando verificar se os resultados dos modelos QSAR, utilizados para avaliação dos DBPs, apresentam confiabilidade.

O resultado obtido por ProtoQSAR/Combase para algas não se mostrou adequado estando fora do domínio de aplicabilidade do modelo e o modelo KNN/Read-across não conseguiu gerar avaliação para peixes. Os dados preditivos dos modelos EPA e DEMETRA não puderam ser avaliados, pois não foram encontrados na literatura dados de LC_{50} para *Daphnia magna* obtidos por meio dos ensaios com organismos vivos.

Os dados preditivos obtidos para a clorexidina com os demais modelos QSAR (EC_{50} = 0,21 mgL^{-1} para *Daphnia magna;* LC_{50} = 0,13-1,95 mgL^{-1} para peixes) corroboraram com os resultados já divulgados na literatura a partir de ensaios com organismos vivos, confirmando a confiabilidade da relação dose-resposta predita por estes modelos.

Uma vez que os DBPs identificados neste trabalho não possuem LC_{50} e EC_{50} de ensaios com organismos vivos publicados na literatura e/ou padrões disponíveis comercialmente para a realização destes ensaios, a confiabilidade da relação dose-resposta obtidas pelo modelo QSAR para os DBPs não pode ser verificada. No entanto, considerando que a atividade (eco)toxicológica de uma substância está diretamente relacionada às estruturas (fragmentos) presentes em sua molécula, os resultados preditivos do DBP 17 foram comparados com a da clorexidina, pois possuem estruturas semelhantes. O único modelo que forneceu dado preditivo para este DBP foi o DEMETRA (LC_{50} = 0,0467 mgL^{-1} para *Daphnia magna*). Devido à ausência de dados de LC_{50} da clorexidina a partir de organismos vivos, a concentração letal predita foi comparada com a LC_{50} da clorexidina, predita pelo próprio DEMETRA (LC_{50} = 0,038 mgL^{-1}) constatando-se que os valores são similares.

Comparando os resultados de EC_{50} e LC_{50} dos modelos EPA, DEMETRA e IFRMN/Combase para *Daphnia magna* e os modelos KNN/Read-across, NIC e IRFMN/Combase para peixes constatou-se diferença de cerca de uma a duas ordens de grandezas nas predições. Estas divergências são provenientes do procedimento adotado para a geração dos dados com organismos vivos que, por sua vez, posteriormente são utilizados como modelo/base para a construção do modelo computacional. Uma vez que estes procedimentos experimentais geram variações nos valores obtidos com organismos vivos (como pode ser observada na faixa de valores de EC_{50} e LC_{50} para a clorexidina), os modelos disponíveis na plataforma VEGA também geram respostas distintas.

Os dados de ecotoxicidade aguda (EC_{50}) preditos para os DBPs permitiram obter a classificação de risco destes compostos. Com base na Diretiva da Comissão Europeia sobre Segurança de Produtos Químicos (03/67/EC) (KIZEK et al., 2017) (Tabela 8), os DBPs 3, 5, 6 e 8-11 se enquadram como substâncias muito tóxicas para algas e para *Daphnia magna*.

Para o DBP 14 não foi possível obter a predição de EC_{50} para *Daphnia magna* com o modelo IFRMN/Combase utilizado, mas o resultado de EC_{50} obtido pelo modelo ProtoQSAR/Combase enquadrou este subproduto como muito tóxico para algas.

Para o DBP 13, o valor de EC_{50} = 295,75 mgL^{-1} categoriza que este DBP pode causar efeitos adversos a longo prazo para algas e o EC_{50} = 23,57 mgL^{-1} para *Daphnia magna* mostra que este DBP é perigoso para este organismo aquático.

Tabela 8 – Classificação de perigo de substâncias perigosas de acordo com a Diretiva 93/67/EC

EC_{50} ou LC_{50}	**Classificação de Risco**	**Pontuação de Perigo**
< 1 mgL^{-1}	Muito tóxico para organismos aquáticos	1
1 -10 mgL^{-1}	Tóxico para organismos aquáticos	2
11-100 mgL^{-1}	Perigoso para organismos aquáticos	3
> 100 mgL^{-1}	Pode causar efeitos adversos a longo prazo aos organismos aquáticos	4

Fonte: KIZEK et al. (2017).

Os dados de toxicidade preditos para os DBPs indicam também que estas substâncias causam efeitos adversos agudos em peixes. Os peixes parecem ser menos sensíveis aos efeitos dos DBPs do que os dafnídeos, conforme pode ser observado pelo LC_{50} apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Com relação à toxicidade para *Daphnia magna* o DBP 17 se demonstrou ser o subproduto mais tóxico entre eles, apresentando uma concentração letal na ordem de 0,05 mgL^{-1}. Dentre os demais subprodutos avaliados, os DBPs 3, 5, 6, 9-11 apresentam toxicidade intermediária com concentrações letais na faixa de 0,1 a 0,3 mgL^{-1}, seguidos pelo DBPs 8 e 14 que apresentam concentrações letais com uma ordem de grandeza superior (1,1 a 2,4 mgL^{-1}), demonstrando que são ligeiramente menos tóxicos. O DBP 13 foi o que se demonstrou menos tóxico, com concentração letal de 19,3 mgL^{-1}.

Para determinação da concentração letal em peixes, quatro modelos foram avaliados (Sarpy/IRFMN, KNN/Read-across, NIC e IRFMN/Combase). Todos os modelos se

demonstraram adequados para a determinação do LC_{50} dos DBPs 3, 5, 6, 8-14 (com exceção do modelo IRFMN/Combase que não apresentou resultado para o DBP 14), no entanto as diferenças de valores preditos não permitiram agrupar cada um destes DBPs em uma única classificação de risco. De uma forma geral, os DBPs 12, 13 e 14 foram os que se demonstraram menos tóxicos, apresentando concentração letal na faixa de 20,68-360,15 mgL^{-1}, 8,93-3371,7 mgL^{-1} e 21,06-41,61 mgL^{-1}, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Os testes de cloração realizados, mostraram que a molécula de clorexidina é extremamente reativa à presença de cloro, quando exposta a condições nas quais as águas são submetidas nas estações de tratamento e na rede de distribuição. Dentre as variáveis avaliadas, constatou-se que o pH, a concentração de cloro e o tempo de reação influenciam no comportamento da clorexidina gerando fragmentação da molécula e formação de DBPs por diferentes rotas. Já as diferentes temperaturas testadas não influenciaram na formação desses compostos. Após elucidação estrutural dos subprodutos formados, notou-se que parte deles pertence ao grupo das cloraminas, relatadas na literatura como tóxicas aos seres humanos e ao meio ambiente. Até o presente momento, os DBPs identificados neste estudo não estão relatados na literatura.

Com relação às predições, de uma forma geral, os modelos descritos no VEGA foram adequados para prever as possíveis atividades toxicológicas dos DBPs identificados bem como sua ecotoxicidade para peixes, *Daphnia magna* e algas. Vinte dos trinta DBPs identificados apresentaram valores de IDA superiores a 0,7 indicando que os resultados obtidos estavam dentro do Domínio de Aplicabilidade dos modelos de mutagenicidade, carcinogenicidade, modelos para as atividades de disruptor endócrino (receptor de estrogênio, androgênio e tiroide A e B) e hepatotoxicidade utilizados. Para os modelos de ecotoxicidade o Domínio de Aplicabilidade de dez dos trinta DBPs identificados ficaram dentro deste limite aceitável (IDA $\geq$ 0,7).

Os resultados da plataforma QSAR mostraram que alguns dos DBPs identificados se destacam por apresentar diferentes atividades toxicológicas e ecotoxicológicas, tais como, os DBPs 3 e 5 (carcinogênicos, hepatotóxicos e tóxicos para peixes, *Daphnia magna* e alga); o DBP 6 (mutagênico, carcinogênico, hepatotóxico e tóxico para *D. magna* e alga); o DBP 8 (carcinogênico, hepatotóxico e tóxico para *D. magna* e alga); o DBP 9 (mutagênico, carcinogênico, hepatotóxico e tóxico para peixes, *D. magna* e alga); o DBP 11 (mutagênico, hepatotóxico e tóxico para peixe, *D. magna* e alga); o DBP 17 (mutagênico, carcinogênico, ativo para receptor de androgênio e tóxico para *D. magna* e alga) e o DBP 18 (carcinogênico, ativo para receptor de androgênio e tóxico para alga). Dentre estes DBPs, destacam-se os DBPs 6, 8 e 17 que, além de apresentarem diversas atividades tóxicas, foram gerados em muitas das condições testadas.

Os resultados obtidos por este estudo podem servir de base para outros estudos de monitoramento ambiental, assim como para o aperfeiçoamento da etapa de cloração nas

estações de tratamento de águas e como resultados preliminares para a futura regulamentação destes compostos.

REFERÊNCIAS[1]

ALENCAR, E. L. C. et al. Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade do antisséptico bucal gluconato de clorexidina 0,12 % em células meristemáticas de raízes de Allium cepa. **Revinter**, v. 12, n. 2, p. 5-13, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.22280/revintervol12ed2.442

ALLINGER, N. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 961p., 1978.

ANVISA. **Resolução-RDC nº 34, de 16 de agosto de 2010**. Regulamento Técnico para produtos saneantes desinfetantes. Brasil: Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0034_16_08_2010.html. Acesso em 5 mar. 2022.

AZEVEDO, F. C. R. et al. Toxicological effects of ciprofloxacin and chlorhexidine on growth and chlorophyll a synthesis of freshwater cyanobacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, e17661, 2019. DOI: https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217661

BARBIN, L. E. et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 12, p. 1508-1514, 2008.

BRANDÃO, E. T. P. **Cianobactérias e saúde pública no Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1380/1/20231_ulfc080540_tm.pdf. Acesso em: 20 out. 2021.

BENFENATI, E. et al. **VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology**. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Emilio_Benfenati2/publication/287320856_VEGA-QSAR_AI_inside_a_platform_for_predictive_toxicology/links/567a594608ae7fea2e99fa0f.pdf . Acesso em: 20 set. 2021.

BESCOS, R. et al. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, 5254, p. 1-8, 2020. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-020-61912-4

BLACK, G. P. et al. Analyzing a broader spectrum of endocrine active organic contaminants in sewage sludge with high resolution LC-QTOF-MS suspect screening and QSAR toxicity prediction. **Environmental Science: Processes Impacts**, v. 21, n. 7, p. 1099–1114, 2019. DOI: https://doi.org/10.1039/C9EM00190E

BLÁZQUEZ, M. et al. Comparing in vivo data and in silico predictions for acute effects assessment of biocidal active substances and metabolites for aquatic organisms.

[1]De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: 2018.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 205, 111291, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111291

BOUHEDJAR, K. et al. Modelling quantitative structure activity–activity relationships (QSAARs): auto-pass-pass, a new approach to fill data gaps in environmental risk assessment under the REACH regulation. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 31, n. 10, p. 785–801, 2020. DOI: https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1810770

CAPPELLI, C. I. et al. Assessment of *in silico* models for acute aquatic toxicity towards fish under REACH regulation. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 12, p. 977–999, 2015. DOI: https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1104519

CAREGHINI, A. et al. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5711–5741, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5

CASSANO, A. et al. Evaluation of QSAR Models for the Prediction of Ames Genotoxicity: A Retrospective Exercise on the Chemical Substances Registered Under the EU REACH Regulation. **Journal of Environmental Science and Health**, Part C, v. 32, n. 3, p. 273–298, 2014. DOI: https://doi.org/10.1080/10590501.2014.938955

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Amgh Editora, 1257p., 2011.

CETESB. **Conferência de Estocolmo**. São Paulo. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/proclima/conferencias-internacionais-sobre-o-meio-ambiente/estocolmo/. Acesso em: 15 fev. 2022.

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, p. 343-345, 2006.

CORCELLAS, C. et al. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: a case study in Iberian river basins (Spain). **Environment International**, v. 75, p. 110-116, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.007

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. R. S. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—kinetics and mechanisms: a critical review. **Water Research**, v. 42, n. 1-2, p. 13-51, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.025

DRAIKO, C. V. et al. The effect of umbilical cord cleansing with chlorhexidine gel on neonatal mortality among the community births in South Sudan: a quasi-experimental study. **PanAfrican Medical Journal**, v. 38, n. 78, 2021. DOI: https://doi.org/10.11604/pamj.2021.38.78.21713

ECCC. **Screening Assessment Chlorhexidine and its Salts**. Canada: 2019. Disponível em: https://www.canada.ca/content/dam/eccc/documents/pdf/pded/chlorhexidine-moiety/Screening-assessment-chlorhexidine-salts.pdf. Acesso em: 20 abr. 2022.

ECHA. **Regulamento nº 528/2012, de 27 de Junho de 2012**. Relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas. União Europeia: Parlamento europeu. Disponivel em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32012R0528. Acesso em: 20 abr. 2022.

ECHA. **Practical guide How to use and report (Q)SARs: Version 3.1**. European Union: 2016. Disponível em: https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_en.pdf. Acesso em: 20 fev. 2022.

FERNANDES, J. G. **Ocorrência de poluentes emergentes nos rios Piraí, Paraíba do Sul, Guandu e na água de abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro**. 2018. Tese (Doutorado em Conservação de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-28052019-142211/publico/BIT18004_C.pdf. Acesso em: 20 ago. 2021.

FERRÃO-FILHO, A. S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 225-228, 2009.

GALIMBERTI, F. et al. Application of chemometric methods and QSAR models to support pesticide risk. **Water Research**, v. 174, 115583, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115583

HAMIDIN, N. et al. Human health risk assessment of chlorinated disinfection by-products in drinking water using a probabilistic approach. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3263-3274, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.029

HAMZA, R. A. et al. Occurrence, impacts and removal of emerging substances of concern from wastewater. **Environment Technology Innovation**, v. 5, p. 161–175**,** 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.02.003

HE, L. Y. et al. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. **Environment International**, v. 92-93, p. 210-219, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.023

HISHINUMA, T. et al. Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenolethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. **Journal Chromatography B**, v. 831, n. 1-2, p. 105–109, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.051

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de odontologia da Universidade Cidade de São Paulo (Online)**, v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.

HU, J. et al. Halonitromethane formation potentials in drinking waters. **Water Research**, v. 44, n. 1, p. 105-114, 2010. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.006

JESUS, F.T. et al. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 9, p. 1348–1358, 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6

KARPIŃSKI, T.M.; SZKARADKIEWICZ, A.K. Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1321-1326, 2015.

KATES, R. W. What kind of a science is sustainability science? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19449-19450, 2011. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1116097108

KIZEK, O. et al. Risk Evaluation of Seven Personal Care Detergents Based on Chemical and Ecotoxicological Characterization in Synthetic Aqueous Media. **Environment and Ecology Research**, v. 5, n. 1, p. 59-71, 2017. DOI: https://doi.org/10.13189/eer.2017.050107

LAYER, R. W. The Chemistry of Imines. **Chemical Reviews**, v. 63, n. 5, p. 489-510, 1963. DOI: https://doi.org/10.1021/cr60225a003

LIM, K. S.; KAM, P. C. A. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 36, n. 4, p. 502, 2008. DOI: https://doi.org/10.1177/0310057X0803600404

LIU, J. L.; WONG, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environment International**, v. 59, p. 208-224, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012

LIU, W. R. Biocides in wastewater treatment plants: Mass balance analysis and pollution load estimation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 329, p. 310–320, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.057

LUNGHINI, F. et al. Consensus QSAR models estimating acute toxicity to aquatic organisms from different trophic levels: algae, Daphnia and fish. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 31, n. 9, p. 655-675, 2020. DOI: https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1797872

MALDANER, L.; JARDIM, I. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100036

MATSUSHIMA, H.; SAKURAI N. A selected ion monitoring assay for chlorhexidine in medical waste water. **Biomedical Mass Spectrometry**, v. 11, n. 5, p. 203-206, 1984. DOI: https://doi.org/10.1002/bms.1200110502

MCLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. **Interpretation of Mass Spectra**. California: University Science Books, 371 p., 1993.

MMA. **Agenda 21 Global**. Brasil: Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: https://antigo.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21/agenda-21-global.html. Acesso em: 07 mar. 2022.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994. DOI: https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000100011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Da promoção, proteção e recuperação da saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acesso em: 15 out. 2020.

MONTAGNER, C. C. et al. 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. DOI: https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091

MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1015-1024, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.09.055

NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires City hospital wastewater. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 644-648, 2007. DOI: https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400012

ODS. **Indicadores Brasileiros para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Brasil: Objetivos do desenvolvimento Sustentável. Disponível em: https://odsbrasil.gov.br/. Acesso em: 15 mar. 2022.

ÖSTMAN, M. et al**.** Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. **Water Research**, v. 115, p. 318-328, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011

PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina**, v. 12, n. 4, p. 275-280, 1991.

PINTO, M. L.; BALTAZAR, A. L. Presença de trihalometanos na água: potenciais riscos. **Acta portuguesa de nutrição**, v. 21, p. 32-37, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.21011/apn.2020.2107

ROCHA, D. F. de O. **Estudo da redução de iminas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008. Disponível em: http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249529. Acesso em: 20 ago. 2021.

SARKAR, S. et al. Application of ANFIS model to optimise the photocatalytic degradation of chlorhexidine digluconate. **RSC Advances**, v. 4, n. 40, p. 21141-21150, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1039/C4RA00389F

SILVA, C. G. D.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. John wiley & sons, 512 p., 2005.

TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposição humana a trialometanos presentes em água tratada. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 413-421, 1999. DOI: https://doi.org/10.1590/S0034-89101999000400013

WHO, **Guidelines for Drinking-water Quality.** World Health Organization: 2011. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950. Acesso em: 16 out. 2021.

WHO. **World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019.** World Health Organization: 2019. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 10 jan. 2022.

YANG, X. et al. Precursors and nitrogen origins of trichloronitromethane and dichloroacetonitrile during chlorination/chloramination. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 25–32, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.035

YANG, Y. et al. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 596–597, p. 303–320, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102

YAVUZ, M. **Investigation of occurence and fate of biocides in wastewater treatment plants and surface waters**. 2013. Thesis (Master of Science) - Environmental Engineering Department, Middle East Technical University, Turkey, 2013. Disponível em: http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12615634/index.pdf. Acesso em: 14 jun. 2021.

YAVUZ, M., OGGIONI, M. et al. Biocides in drinking water system of Ankara, Turkey. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 12, p. 3253-3262, 2015. DOI: https://doi.org/10.1080/19443994.2014.933626

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZHANG, C. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. **Science of the Total Environment**, v. 518–519, p. 352–362, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.007

ZONG, Z.; KIRSCH, L. Studies on the Instability of Chlorhexidine, Part I: Kinetics and Mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2417-27, 2012.
DOI: https://doi.org/10.1002/jps.23151