

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO AMBIENTAL DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA
DE RIO UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA**

JULIANA BAZZAN ARSAND

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Prof.^a Dra. Tânia Mara Pizzolato

Co-orientador: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

Porto Alegre, março de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO AMBIENTAL DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA
DE RIO UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA**

JULIANA BAZZAN ARSAND

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tânia Mara Pizzolato

Co-orientador: Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

Colaboradores: Dra. Silvia Diaz Cruz e Dr. Damià Barceló (CSIC – ES)

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Abril/2015 e Março/2019, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Tânia Mara Pizzolato e co-orientação do Doutor Rodrigo Barcellos Hoff. A tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutora em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

- Prof. Dr. Marçal Pires – PUCRS
- Prof. Dr. Klester de Souza – IQ/UFRGS
- Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos – PPGQ/UFRGS
- Profa. Dra. Roberta Bussamara – PPGQ/UFRGS

Esse projeto faz parte da chamada PVE-CAPES/CNPq (PVE 163 - Qualidade da água e de alimentos: estudos analíticos avançados para investigação de resíduos de fármacos, agrotóxicos, bem como seus respectivos metabólitos e produtos de degradação em amostras ambientais e em alimentos), que contou com a colaboração do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua* (IDAEA) do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC – Barcelona, Espanha), tendo como pesquisadores envolvidos o Dr. Damiá Barceló e sua equipe.

Os trabalhos desenvolvidos serão apresentados em três grandes capítulos a fim de facilitar a distribuição, apresentação e discussão dos dados.

No Capítulo I, será abordado o desenvolvimento e validação e monitoramento de um método de varredura para determinação de cerca de 300 compostos orgânicos, entre fármacos e pesticidas, que podem ser encontrados em águas superficiais e efluentes urbanos.

No Capítulo II, será abordada a influência da presença de antimicrobianos na água do Arroio Dilúvio e sua consequência na presença de bactérias resistentes.

No Capítulo III, será abordado o comportamento de dois antibióticos largamente utilizados (amoxicilina e ampicilina) no que diz respeito à sua estabilidade frente à fotólise.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível graças ao apoio e contribuição de inúmeras pessoas.

Agradeço à minha família por todo incentivo e apoio para minha qualificação profissional, por todo amor, exemplo, dedicação e compreensão. Em especial aos meus pais, que nunca mediram esforços e me deram todo suporte para que eu chegasse até esta etapa.

A minha orientadora, Prof. Dra. Tânia Mara Pizzolato, por todo apoio e orientação durante esses anos de mestrado e doutorado, sempre me incentivando em busca do conhecimento científico e contribuindo para minha formação como pesquisadora e como pessoa. Por todas as oportunidades que me foram dadas e pela confiança em mim e no meu trabalho. Pela amizade que construímos e pelo exemplo de mulher e profissional que é para mim. Minha eterna gratidão.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Hoff pela amizade e disponibilidade constante, mesmo que de longe, sempre presente me orientando e auxiliando no desenvolvimento do trabalho e na elaboração dos artigos.

À minha amiga Dra. Louíse Jank, por todos os ensinamentos e incentivo que foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Por ter confiado a mim parte do seu projeto de trabalho inicial. Pela nossa amizade, pelos conselhos e apoio e pela nossa parceria de sempre. Obrigada por tudo.

Ao meu querido amigo Dr. Alessandro Dallegrave, que foi essencial para a realização deste trabalho, agradeço pela amizade, parceria, convívio e ensinamentos no decorrer desses anos de doutorado.

A todos os colegas que passaram pelo nosso laboratório nesses 4 anos e colaboraram em alguma etapa do desenvolvimento do trabalho, em especial à Carolina Galeazzi, pela amizade, convívio, parceria e dedicação à realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do LANAGRO/RS pela ajuda, incentivo, amizade, pelos ensinamentos e disponibilidade constante em ajudar.

A toda a equipe do IDAEA/CSIC, que carinhosamente me acolheu no período que estive trabalhando com eles em Barcelona-ES, em especial aos meus supervisores Dra. Silvia Diaz Cruz e Dr. Damià Barceló.

Agradeço às professoras Dra. Roberta Bussamara, Dra. Andreza Martins e Dra. Fátima Bento pela colaboração na realização dos ensaios de PCR. Ao Dr. Alexandre Arezon do Instituto de Ecologia da UFRGS pela realização dos ensaios de ecotoxicidade, e ao Prof. Dr. Adriano Araújo pelo auxílio no tratamento quimiométrico dos dados gerados neste trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

TRABALHOS GERADOS

1. Juliana Bazzan Arsand, Rodrigo Barcellos Hoff, Louíse Jank, Lucas N. Meirelles, M. Silvia Diaz-Cruz, Tânia Mara Pizzolato, Damià Barceló. **Transformation products of amoxicillin and ampicillin after photolysis in aqueous matrices: Identification and kinetics.** *Science of the Total Environment*, 642 (2018) 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.122>.
2. Juliana Bazzan Arsand, Rodrigo Barcellos Hoff, Louíse Jank, Alexsandro Dallegrave, Carolina Galeazzi, Fabiano Barreto e Tânia Mara Pizzolato. **Wide-Scope Determination of Pharmaceuticals and Pesticides in Water Samples: Qualitative and Confirmatory Screening Method Using LC-qTOF-MS.** *Water Air Soil Pollut* (2018) 229:399. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4036-2>.
3. Juliana Arsand, Rodrigo Hoff, Roberta Bussamara, Louise Jank, Alexsandro Dallegrave, Andreza Martins e Tânia Mara Pizzolato. **Antimicrobianos em água de rio e sua relação com a presença de genes de resistência.** Trabalho premiado como um dos melhores trabalhos apresentados na área de Química Ambiental durante o 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e o 7º CIAQA - Congresso Iberoamericano de Química Analítica, realizado de 16 a 19 de setembro de 2018 no Centro de Eventos e Convenções do diRoma em Caldas Novas/GO.
4. Juliana Bazzan Arsand, Rodrigo Barcellos Hoff, Louise Jank, Rafaela Ramalho, Andreza Martins, Roberta Bussamara, Alexsandro Dallegrave, Fatima Menezes Bento, Tânia Mara Pizzolato. **Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic 2 occurrence in an urban river in Southern Brazil.** Submetido.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|---------------|
| INTRODUÇÃO | - 23 - |
| OBJETIVOS | - 26 - |
| Objetivo Geral | - 26 - |
| Objetivos Específicos | - 26 - |
| CAPÍTULO I: Monitoramento ambiental da água do Arroio Dilúvio, Rio Gravataí e Rio dos Sinos, utilizando metodologia analítica desenvolvida e validada para a análise de contaminantes emergentes (fármacos e pesticidas) por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (LC-QTOF-MS). | - 28 - |
| 1. Objetivos Específicos | - 29 - |
| 2. Revisão bibliográfica | - 29 - |
| 2.1. Monitoramento de contaminantes emergentes em amostras ambientais | - 29 - |
| 2.2. Área de estudo | - 32 - |
| 2.3. Metodologias analíticas para identificação de contaminantes emergentes utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (LC-QTOF-MS) .. | - 33 - |
| 2.4. Parâmetros de desempenho de método analítico | - 37 - |
| 2.5. Avaliação de ecotoxicidade | - 38 - |
| 3. Materiais e métodos | - 39 - |
| 3.1. Materiais, solventes, reagentes e padrões analíticos..... | - 39 - |
| 3.2. Equipamentos..... | - 39 - |
| 3.3. Métodos | - 40 - |
| 3.3.1. Limpeza dos materiais de laboratório | - 40 - |
| 3.3.2. Preparo das soluções padrão estoque e de trabalho | - 40 - |
| 3.3.3. Otimização dos parâmetros de espectrometria de massa e de cromatografia líquida para análise de fármacos e pesticidas por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (LC-QTOF-MS)..... | - 41 - |
| 3.3.4. Preparo de amostra | - 43 - |
| 3.3.5. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método | - 43 - |
| 3.3.6. Análises físico-químicas complementares | - 44 - |
| 3.3.7. Monitoramento ambiental: amostragem..... | - 45 - |
| 3.3.8. Tratamento quimiométrico dos dados | - 48 - |
| 3.3.9. Avaliação da toxicidade aguda com o peixe <i>Danio rerio</i> | - 51 - |

| | |
|--|---------------|
| 4. Resultados e discussão | - 52 - |
| 4.1. Validação do método..... | - 52 - |
| 4.2. Monitoramento ambiental | - 61 - |
| 4.2.1. Arroio Dilúvio | - 61 - |
| 4.2.2. Rio dos Sinos e Rio Gravataí..... | - 69 - |
| 4.3. Identificação de compostos untarget | - 73 - |
| 4.4. Avaliação da toxicidade aguda com o peixe Danio rerio | - 76 - |
| 5. Conclusão..... | - 78 - |

CAPÍTULO II: Análise de antimicrobianos Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em tandem associado à análise de genes de resistência a antimicrobianos por Reação em Cadeia da Polimerase. - 80 -

| | |
|--|---------------|
| 1. Objetivos específicos | - 81 - |
| 2. Revisão bibliográfica..... | - 81 - |
| 2.1. Antimicrobianos e desenvolvimento de genes de resistência a antimicrobianos..... | - 81 - |
| 2.2. Avaliação de genes de resistência a antimicrobianos | - 83 - |
| 2.3. Metodologias analíticas para quantificação de antimicrobianos | - 84 - |
| 2.4. Parâmetros de desempenho de método analítico | - 85 - |
| 3. Materiais e métodos..... | - 87 - |
| 3.1. Materiais, solventes, reagentes e padrões analíticos..... | - 87 - |
| 3.2. Equipamentos..... | - 88 - |
| 3.3. Métodos | - 88 - |
| 3.3.1. Amostragem | - 88 - |
| 3.3.2. Preparo de amostra para quantificação de ATBs..... | - 88 - |
| 3.3.3. Otimização dos parâmetros de espectrometria de massas e de cromatografia líquida para análise de antimicrobianos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (LC-MS/MS) | - 89 - |
| 3.3.4. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método por LC-MS/MS..... | - 92 - |
| 3.3.5. Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos em águas superficiais | - 94 - |
| 3.3.5.1. Extração de DNA..... | - 94 - |
| 3.3.5.2. Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos | - 94 - |
| 4. Resultados e discussão | - 95 - |
| 4.1. Validação do método LC-MS / MS | - 95 - |
| 4.2. Concentração de antimicrobianos..... | - 97 - |
| 4.3. Detecção de genes de resistência a antibióticos | - 101 - |
| 4.4. Correlação entre antibióticos e genes de resistência a antibióticos | - 103 - |

| | |
|---|----------------|
| 5. Conclusão..... | - 105 - |
| <i>CAPÍTULO III: Estudo de degradação e identificação de produtos de transformação de fármacos β-lactâmicos.....</i> | - 107 - |
| 1. Objetivos específicos | - 108 - |
| 2. Revisão bibliográfica..... | - 108 - |
| 3. Materiais e métodos..... | - 110 - |
| 3.1. Estudo de cinética de degradação e identificação de metabólitos e produtos de transformação de β -lactâmicos utilizando ensaios de fotólise artificial, seguidos de análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-Orbitrap-MS). - | 110 - |
| 4. Resultados e discussão | - 113 - |
| 4.1. Estudo de cinética de degradação e identificação de metabólitos e produtos de transformação de amoxicilina e ampicilina | - 113 - |
| 4.2. Análise de amoxicilina e ampicilina | - 118 - |
| 4.2.1. Fotólise..... | - 119 - |
| 4.2.2. Identificação de produtos de transformação | - 120 - |
| 4.2.2.1. Ampicilina | - 120 - |
| 4.2.2.2. Amoxicilina | - 122 - |
| 5. Conclusão..... | 126 |
| <i>CONSIDERAÇÕES GERAIS DO TRABALHO DESENVOLVIDO.....</i> | 127 |
| <i>REFERÊNCIAS.....</i> | 130 |
| <i>ANEXO I</i> | 147 |
| <i>ANEXO II</i> | 170 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Resultados do método de triagem em águas superficiais e águas residuais de efluentes. Os círculos em branco representam amostras não detectadas. Os círculos escuros representam uma amostra detectada. Para cada combinação composto / matriz, o limite de detecção de triagem (SDL) é o nível mais baixo, com todas as amostras detectadas corretamente. | 55 |
| Tabela 2. CEs identificados no rio dos Sinos nos meses de amostragem. | 70 |
| Tabela 3. CEs identificados no rio Gravataí nos meses de amostragem. | 70 |
| Tabela 4. Classificação e utilização dos pesticidas encontrados nos rios dos Sinos e Gravataí. | 72 |
| Tabela 5. Resumos dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos por 96 horas e 192 horas pós-fertilização as diferentes amostras avaliadas nos meses de setembro/2017, dezembro de 2017 e março de 2018. | 77 |
| Tabela 6. Resumos dos resultados dos ensaios de toxicidade com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> expostos por 96 horas e 192 horas pós-fertilização às soluções mix. | 77 |
| Tabela 7. Parâmetros de fragmentação dos analitos e padrões internos, obtidos por ionização com <i>electrospray</i> no modo positivo. | 90 |
| Tabela 8. Sequências de <i>primers</i> utilizados nos ensaios de PCR. | 95 |
| Tabela 9. Resultados da validação do método de quantificação de ATBs por LC-MS/MS. | 96 |
| Tabela 10. Presença/ausência dos quatro GRAs que conferem resistência a sulfonamida (<i>sul1</i>), β -lactâmico (<i>blaTEM</i>), eritromicina (<i>ermB</i>) e quinolona (<i>qnrS</i>) em amostras de água do Arroio Dilúvio. | 101 |
| Tabela 11. Base de dados de produtos de transformação de amoxicilina (TPs) para pesquisa em amostras experimentais e reais. | 113 |
| Tabela 12. Base de dados de produtos de transformação de ampicilina (TPs) para pesquisa em amostras experimentais e reais. | 116 |
| Tabela 13. Outros <i>m/z</i> menos intensos para produtos de transformação (TPs) de AMX de acordo com Hirte <i>et al.</i> | 118 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de aquisição de dados Bruker broadbandCID (bbCID): O espectrômetro de massa QTOF alterna rapidamente entre dois canais de massa precisos com varredura completa, um com baixa energia de colisão e o outro em energia de colisão elevada. | 35 |
| Figura 2. Critérios avaliados na identificação e confirmação dos compostos. | 38 |
| Figura 3. Pontos de amostragem realizadas na extensão do Arroio Dilúvio. | 47 |
| Figura 4. Representação gráfica do modelo Tucker3. | 49 |
| Figura 5. Representação da disposição dos dados para inspeção do número de fatores via decomposição de valores singulares (SVD). | 50 |
| Figura 6. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) (acima) e MS2 com fórmula molecular (abaixo) para os isômeros de massa sulfadoxina e sulfadimetoxina. | 54 |
| Figura 7. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) e espectro MS2 de sulfametoxazol, cafeína e atenolol. | 64 |
| Figura 8. Pesos do modelo Tucker no modo “compostos identificados”. | 66 |
| Figura 9. Pesos do modelo Tucker no modo “meses de coleta”. | 67 |
| Figura 10. Pesos do modelo Tucker no modo “pontos de coleta”. | 67 |
| Figura 11. Mapa de distribuição dos compostos obtidos pelo modelo Tucker, espacial e temporal. | 68 |
| Figura 12. Cromatograma de íon extraído (XIC), espectro MS2 e padrão de distribuição isotópica (experimental vs. predito) de benzoilecgonina. O quadrado vermelho (baixo) é a distribuição de isótopos prevista. | 75 |
| Figura 13. Cromatograma de íon extraído (XIC), espectro MS2 do DEET. | 75 |
| Figura 14. Exemplos de <i>D. rerio</i> eclodidos após exposição por 96 h ao grupo controle e a Solução mix (A) Organismo normal (Grupo controle); (B) Organismo com edema pericardial; (C a F) Organismos com má formação de coluna. | 78 |
| Figura 15. Dados da soma da concentração de ATBs, por classe, em cada campanha, nos 6 pontos de amostragem no Arroio Dilúvio. | 98 |
| Figura 16. Soma das concentrações para cada classe em cada campanha. À esquerda, dados do primeiro ano de monitoramento, e a direita, dados do segundo ano. | 99 |

Figura 17. Valores de temperaturas médias máximas e mínimas nos meses de amostragem. 100

Figura 18. Produtos de amplificação por PCR analisados por electroforese em gel de agarose a 2%. (A) junho de 2018 e (B) setembro de 2018 produtos de amplificação blaTEM. (C) de junho de 2018 e (D) setembro de 2018 produtos de amplificação qnrS. (E) junho de 2018 e (F) setembro de 2018 sul1 produtos de amplificação. (G) Junho de 2018 e (H) Setembro de 2018 produtos de amplificação ermB. M: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); C +: Plasmídeo pIDTSmart contendo fragmentos blaTEM, qnrS, sul1 e ermB; 1 a 6: pontos de amostragem. 102

Figura 19. Gráfico de concentração/tempo linearizado de cinéticas de pseudo-primeira ordem para fotólise de AMX. A inclinação da reta de regressão é igual à constante de taxa global k_{AMX} [h^{-1}]. 119

Figura 20. Gráfico de concentração/tempo linearizado de cinética de pseudo-primeira ordem para fotólise de AMP. A inclinação da reta de regressão é igual à constante de taxa global k_{AMP} [h^{-1}]. 119

Figura 21. Cromatograma de íon extraído (XIC) e espectro MS2 para dímero AMP fechado (a), ácido penicilóico AMP (b) e éster metílico do ácido ampicilóico (c). 121

Figura 22. Cromatograma de íon extraído (XIC) e espectro MS2 para PP-2-OH-3- (4-OH) fenilpirazina (a), dissulfeto de penicilamina (b), éster metílico do ácido amoxicilóico (c), dímero do ácido penicilóico AMX-AMX (d), ácido penicilóico AMX (e), ácido penicilóico AMX (f) e 2-amino-2-(4-hidroxifenil)-N-{{Z}-[3-(4-hidroxifenil)-2-oxo-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-1,4-diazepin-5-il]metilideno}-acetamida (g). 125

GLOSSÁRIO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

ACO: acetona

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

AMP: ampicilina

AMX: amoxicilina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil

AS: água superficial

ATBs: antimicrobianos

AZT: azitromicina

bbCID: do inglês *Broadband Collision Induced Dissociation*

BRAs: bactérias resistentes a antimicrobianos

CAD: do inglês *collisionlly activated dissociation*

CE: do inglês *collision energy*

CEs: contaminantes emergentes

CFAP: cefapirina

CFN: cefalônio

CFOP: cefoperazona

CFT: ceftiofur

CFX: cefalexina

CIPRO: ciprofloxacino

CLN: clindamicina

CLX: cloxacilina

CSIC: *Consejo Superior de Investigaciones Cientificas*

CTC: cloxatetraciclina

CUR: do inglês *curtain gas*

CXP: do inglês *Collision Cell Exit Potential*

DANO: danofloxacino

DCX: dicloxacilina

DEs: desreguladores endócrinos

DIFLO: difloxacino

DIKETO: amoxicilina piperazina-2,5-diona

DOXI: doxiciclina

DP: do inglês *declustering potential*

ECOTOX/UFRGS: Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

EF: efluente

EMS: do inglês *extracted matrix standards*

ENRO: enrofloxacino

EP: do inglês *Entrance Potential*

EPA-US: do inglês *Environmental Protection Agency - United States*

ERT: eritromicina

ESI: do inglês *Eletrospray Ionization*

ETEs: Estações de Tratamento de Efluentes

FA: ácido fórmico

FET: do inglês *Fish Embryo Toxicity Test*

FIA: do inglês *flow injection analysis*

FLU: flumequina

GRAs: genes de resistência a antimicrobianos

GS1: do inglês *ion source gas 1*

GS2: gás 2

HAc: ácido acético

HRMS: do inglês *high resolution mass spectrometry*

IDAEA: *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua*

INMET: Instituto Nacional de Meteorologia

IPH: Instituto de Pesquisa Hidráulica

IS: do inglês *Ion Spray Voltage*

LANAGRO-RS: Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo tandem

LC-QTOF-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo

LNC: lincomicina

LOD: limite de detecção

LOQ: limite de quantificação

MeOH: metanol

MRM: do inglês *multiple reaction monitoring*

NALID: ácido nalidíxico

NOR: norfloxacino

OTC: oxatetraciclina

OXA: oxacilina

PCR: reação em cadeia da polimerase
PMQR: resistência à quinolona mediada por plasmídeo
PNG: penicilina G
PNV: penicilina V
RPM: Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos
RSD: desvio padrão relativo
RT: tempo de retenção
SARA: sarafloxacino
SCP: sulfaclorpiridazina
SDL: limite de detecção de triagem
SDMX: sulfadimetoxina
SDX: sulfadoxina
SDZ: sulfadiazine
SFX: sulfisoxazol
SMA: sulfametoxazol
SMR: sulfamerazina
SMZ: sulfametazina
SPE: extração em fase sólida
SQX: sulfaquinoxalina
SR: do inglês ratio slope
STZ: sulfatiazol
T: temperatura
TIL: tilosina
TLM: tilmicosina
TMP: trimethoprim
TOF: do inglês *Time of Flight*
TP: produto de transformação
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPLC: do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*
XIC: Cromatogramas de íons extraídos

ANEXO I

| | |
|---|-----|
| Tabela I. Dados de volume de precipitação e temperaturas mensais nos meses de coleta de amostra. | 147 |
| Tabela II. Lista dos fragmentos de m/z monitorados dos fármacos incluídos no método de triagem juntamente com os íons encontrados nas amostras da validação em água superficial e efluente. | 148 |
| Tabela III. Lista dos fragmentos de m/z monitorados dos pesticidas incluídos no método de triagem juntamente com os íons encontrados nas amostras da validação em água superficial e efluente. | 155 |
| Tabela IV. Dados de áreas dos compostos detectados no monitoramento ambiental do Arroio Dilúvio. | 163 |
| Tabela V. Análises físico-químicas complementares das amostras analisadas. | 166 |
| Tabela VI. Nível de antimicrobianos detectados em cada ponto de amostragem e campanha. | 168 |

ANEXO II

Figura I. Produtos de amplificação por PCR analisados por electroforese em gel de agarose a 2%. (A) de junho de 2018 e (B) de setembro de 2018 produtos de amplificação 16S rRNA (C) de junho de 2018 e (D) setembro de 2018 produtos de amplificação blaTEM. (E) junho de 2018 e (F) de setembro de 2018 produtos de amplificação ermB. (G) junho de 2018 e (H) setembro de 2018 produtos de amplificação qnrS. (I) Junho de 2018 e (J) Setembro de 2018 produtos de amplificação de sul1 M: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), C⁺: plasmídeo pIDTSmart contendo fragmentos blaTEM, ermB, qnrS e sul1 e .1, .2, .3 representam as triplicatas dos pontos de amostragem de 1 a 6.

RESUMO

A identificação de compostos emergentes (CEs), como fármacos e pesticidas, em efluentes urbanos e em águas superficiais, é uma das principais linhas de pesquisa em relação à qualidade da água. Métodos de triagem para análise de compostos *targets* e *untargets* são uma alternativa em potencial e podem ser usados para uma avaliação abrangente da presença destes compostos no ambiente. Um método utilizando extração em fase sólida seguida de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de tempo de voo (LC-QTOF-MS/MS) foi desenvolvido para avaliação de 301 compostos emergentes (fármacos e pesticidas) em amostras de água. O método validado foi capaz de detectar e identificar 170 compostos em efluentes de estações de tratamento de águas residuais e 198 compostos em águas superficiais. O método foi utilizado para realizar o monitoramento ambiental no período de dois anos em seis pontos do Arroio Dilúvio, em Porto Alegre, e em um ponto no rio dos Sinos e um no rio Gravataí, na região metropolitana. Nos seis pontos monitorados no arroio, foram encontrados 32 compostos (20 fármacos e 12 pesticidas). Dentre os pesticidas, o DEET foi o de maior incidência, e dentre os fármacos, foram os β -bloqueadores e os antimicrobianos. Padrões temporais e espaciais da ocorrência de CEs foram investigados usando a técnica quimiométrica de Tucker3.

Dentre os CEs, os antimicrobianos merecem atenção especial. Para isso, foi desenvolvido e validado método quantitativo para avaliar a ocorrência de 40 antimicrobianos no Arroio Dilúvio, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Devido à alta incidência destes compostos, avaliou-se também a ocorrência de genes de resistência usando a técnica de PCR.

Para avaliar o impacto de contaminantes emergentes no meio ambiente e na saúde humana, é necessário elucidar os produtos de transformação e sua cinética de degradação para avaliar os possíveis riscos. No presente trabalho, avaliou-se a cinética de degradação e produtos de transformação dos antibióticos β -lactâmicos amoxicilina e ampicilina. Amostras de água superficial contendo esses antibióticos foram submetidas à fotólise e analisadas por cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massa com detecção de Orbitrap, a fim de estabelecer o perfil de degradação e a formação de produtos de transformação.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; fármacos; pesticidas; antimicrobianos, análise ambiental; água da superfície; LC-QTOF-MS; *untarget*; bactérias resistentes a antibióticos; genes de resistência a antibióticos; LC-MS/MS; produtos de transformação; Orbitrap-MS.

ABSTRACT

Identification of emerging compounds, such as pharmaceuticals and pesticides, in urban effluents and in surface waters is one of the main lines of research related to water quality. Screening methods for potential target and untarget compounds are a potential alternative and could be used for a comprehensive evaluation of samples composition. Liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) was developed to provide full-spectrum data and high mass resolution for monitoring of 301 pharmaceuticals and pesticides in environmental water samples. Samples were extracted by solid-phase extraction and analyzed by LC-QTOF-MS. The final method was able to detect 170 chemicals in wastewater treatment plant effluent and 198 chemicals in surface water. The method was used to carry out the environmental monitoring during two years, in six points of the Dilúvio stream, in Porto Alegre, and one point on the Sinos River and one on the Gravataí River, in the metropolitan region. At the six points monitored in the stream, 32 compounds (20 drugs and 12 pesticides) were found. Within pesticides, DEET was the one with the highest incidence, and among the drugs, were β -blockers and antimicrobials. Temporal and spatial patterns of EC occurrence were investigated using the Tucker3 chemometric technique.

Among the CEs, antimicrobials deserve special attention. For this, a quantitative method was developed and validated to evaluate the occurrence of 40 antimicrobials in the Dilúvio stream, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Due to the high incidence of these compounds, the occurrence of resistance genes using the PCR technique was also evaluated.

To assess the impact of these substances in the environment and in the human health, it is necessary to elucidate the transformation products and their kinetic of degradation to evaluate the possible risks. In the present report, the characterization and the degradation kinetic of two widely used β -lactams antibiotics – amoxicillin and ampicillin – was evaluated. Surface water samples containing these antibiotics were submitted to photolysis and analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry with Orbitrap detection in order to establish the profile of degradation and the formation of transformation products.

Keywords: emerging contaminants; pharmaceuticals; pesticides; antibiotics, environmental analysis; surface water; LC-QTOF-MS; untarget; antibiotic resistant bacteria; antibiotic resistance genes; LC-MS/MS; transformation products; Orbitrap-MS.

INTRODUÇÃO

A identificação de compostos orgânicos, como fármacos, hormônios, pesticidas, produtos de higiene pessoais, entre outros, em efluentes urbanos e em águas superficiais, é uma das principais linhas de pesquisa em relação à qualidade da água [1], pois existe um impacto direto destes compostos sob os humanos, animais e meio ambiente. Estes compostos em geral, são denominados “contaminantes emergentes” [2,3].

Contaminantes emergentes (CEs) são substâncias utilizadas no nosso cotidiano e, na maioria das vezes, não apresentam dados ecotoxicológicos. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-US, do inglês *Environmental Protection Agency - United States*), os CEs são novas substâncias químicas, sem regulamentação legal, cujo impacto ambiental e à saúde humana pouco se conhece [2]. A cada ano, uma grande quantidade de novos compostos químicos é sintetizada e utilizada em diferentes áreas, que por fim, acabam sendo liberados no meio ambiente, ocasionando consequências imprevisíveis aos seres humanos e organismos aquáticos [4]. Essas substâncias são caracterizadas pela constante contribuição para o meio ambiente. Como consequência e apesar de - em alguns casos - baixa estabilidade, são considerados pseudo-persistentes [2].

Dentre os CEs, a classe que merece atenção especial são os desreguladores endócrinos (DEs). DEs são substâncias capazes de promover alterações no sistema endócrino tanto de animais como de humanos [5]. A desregulação endócrina é desencadeada pelos contaminantes capazes de mimetizar hormônios endógenos, ou seja, ligam-se aos receptores estrogênicos endógenos e desenvolvem determinadas ações que não foram comandadas pelo próprio organismo, interferindo diretamente na homeostasia, que é fundamental para a manutenção do equilíbrio nos organismos vivos [6,7]. Nos últimos 30 anos, essas substâncias se disseminaram no ambiente aquático, gerando um ambiente com potencial de interferir no sistema endócrino dos organismos expostos [8,9].

Entre estes DEs, os fármacos e os pesticidas são de especial interesse, porque, apesar da baixa concentração, são introduzidos continuamente no ambiente, podendo assim promover efeitos adversos e acumulativos imprevisíveis [10]. Alguns deles são

resistentes aos tratamentos utilizados nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) convencionais [11]. Subsequentemente, afeta as águas receptoras onde os compostos são liberados como contaminantes orgânicos ambientais [12,13]. Uma vez na água, é esperado que os CEs também se acumulem no sedimento de um curso d'água [14,15].

Os fármacos são considerados as principais moléculas bioativas que podem estar presentes na água [16], portanto, eles são importantes em termos de seus efeitos e seu destino como contaminantes ambientais [10]. Em alguns casos, não só o composto original é biologicamente ativo, mas também seus produtos de transformação (TPs), gerados pelo metabolismo e outros processos de degradação [17].

Fármacos podem ser suscetíveis, em maior ou menor grau, à degradação, através de ação dos microrganismos e da ação da luz solar [18,19]. Isto é especialmente verdadeiro para classes farmacológicas como os antimicrobianos (ATBs) [2], uma vez que eles são biologicamente ativos, tendo biodegradabilidade limitada e, conseqüentemente, não são eficientemente removidos nas ETEs [20], no caso de amostras ambientais. Isso justifica o fato destes estarem entre os fármacos mais comumente detectados no ambiente aquático [21].

O estudo de processos mais eficientes para a degradação/transformação de CEs, envolvendo processos e determinação da cinética de degradação, identificação dos compostos de maior persistência e dos produtos de transformação, bem como a toxicidade destes compostos gerados, é fundamental para uma melhor compreensão da atuação dos CEs no ambiente.

Os antimicrobianos são uma das classes mais utilizadas de fármacos, tanto na medicina humana como na veterinária. A crescente utilização de antimicrobianos na medicina humana, pecuária, avicultura e piscicultura, aliado ao descarte inadequado destes compostos, têm causado seleção genética de bactérias resistentes e, portanto, mais nocivas, devido à presença destes resíduos no meio ambiente [1,11,22]. O amplo uso de antimicrobianos e sua presença no meio ambiente podem levar ao desenvolvimento de genes de resistência a antimicrobianos [23]. A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos no meio aquático traz preocupação em torno de alimentos provenientes deste meio e, conseqüentemente, a saúde pública através da cadeia alimentar [2], sendo necessário considerar também o consumo de água.

Em relação aos pesticidas, esses são usados principalmente para melhorar a produtividade na atividade agrícola [24]. Vários deles são misturas de aditivos e ingredientes ativos [25], e o escoamento das áreas agrícolas é uma importante fonte de poluentes [24]. Mais do que isso, a reutilização agrícola de lodo de esgoto ou adubo como fertilizante, pode representar outra fonte de contaminação ambiental [26].

A concentração de fármacos e pesticidas em águas superficiais que recebem efluentes urbanos tende a variar durante o período de um ano, devido ao maior consumo de algumas substâncias em épocas definidas, como por exemplo, maior incidência de antibióticos no inverno, devido às doenças respiratórias comuns nesse período. Por isso, um monitoramento eficiente por um período longo se faz importante a fim de avaliar a variação da ocorrência e concentração dos fármacos durante esse período, relacionando os dados obtidos para águas e sedimentos.

Métodos multirresíduos para fármacos e pesticidas são ferramentas muito úteis para determinar o perfil da ocorrência de CEs no ciclo da água em apenas uma análise. Considerando o nível de concentração extremamente baixo que estes compostos se encontram neste tipo de amostra, geralmente em concentrações em nível de traços ou ultratraços ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) [26], fazem-se necessários métodos com alta especificidade e sensibilidade.

Com o advento de técnicas analíticas suficientemente sensíveis, níveis cada vez mais baixos destes contaminantes podem ser detectados. A espectrometria de massa é uma ferramenta que tem se mostrado valiosa nesse campo de pesquisa, uma vez que propicia a análise simultânea de compostos com diferentes características químicas [27].

Diferentes técnicas de espectrometria de massa, acopladas principalmente à cromatografia líquida, são utilizadas para determinação de contaminantes orgânicos em amostras aquosas ambientais e podem trazer informações importantes, sejam relacionadas à quantificação, com alta seletividade e sensibilidade, através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (LC-MS/MS), ou uma avaliação ampla dos contaminantes da amostra, dados fornecidos através de uma análise utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (LC-QTOF-MS) [11,28]. O espectrômetro de massa do tipo tempo de voo é uma técnica muito poderosa na investigação de contaminantes não

esperados inicialmente na amostra, os chamados compostos *untarget* ou *suspect analysis* [28].

Diante do exposto, a determinação de resíduos de CEs no meio aquático desempenha um papel fundamental para a estimativa da exposição humana e do meio ambiente a estes compostos, permitindo avaliar a extensão dos danos ambientais causados pelo constante despejo desses resíduos e garantir a qualidade e a segurança da água e, por consequência, de toda a cadeia alimentar, em relação aos níveis destes contaminantes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para análise de contaminantes emergentes em águas e a realização de um monitoramento ambiental a fim de avaliar a presença de contaminantes emergentes, metabólitos, produtos de transformação, ecotoxicidade e bactérias resistentes a antibióticos em amostras de águas superficiais da região metropolitana de Porto Alegre.

Objetivos Específicos

- Adaptar metodologia para extração em fase sólida (SPE) dos analitos de interesse em amostras aquosas ambientais;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação da ocorrência de contaminantes emergentes (pesticidas, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticóides, β -bloqueadores, sedativos, coccidiostáticos, antimicrobianos, entre outros), totalizando cerca de 300 substâncias em amostras aquosas ambientais em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, por LC-QTOF-MS;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação e quantificação de 40 antibióticos, pertencentes às classes sulfonamidas, tetraciclinas,

(fluor)quinolonas, macrolídeos, lincosamidas e β -lactâmicos, em amostras de águas superficiais e de efluente em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando LC-MS/MS;

- Avaliar a expressão dos genes *blaTEM*, *ermB*, *qnrS* e *sull*, que conferem resistência a antibióticos das classes β -lactâmicos, macrolídeos, (fluor)quinolonas e sulfonamidas, respectivamente, através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras aquosas ambientais.
- Realizar monitoramento ambiental, no período de dois anos, nas águas do Arroio Dilúvio, e Rios da Região Metropolitana de Porto Alegre (Rio dos Sinos e Rio Gravataí), e fazer uma relação sazonal da ocorrência destes compostos;
- Relacionar a concentração de antimicrobianos com a expressão de genes de resistência de antimicrobianos das bactérias presentes no meio aquático;
- Realizar estudo para cinética de degradação e identificar os principais metabólitos e produtos de transformação de alguns fármacos de amplo consumo utilizando ensaios de fotólise artificial, seguidos de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução;
- Realizar análises de ecotoxicidade nas amostras ambientais utilizando ensaios de toxicidade aguda em *Danio rerio*.

CAPÍTULO I: Monitoramento ambiental da água do Arroio Dilúvio, Rio Gravataí e Rio dos Sinos, utilizando metodologia analítica desenvolvida e validada para a análise de contaminantes emergentes (fármacos e pesticidas) por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (LC-QTOF-MS)

1. Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia para extração em fase sólida (SPE) dos analitos de interesse em amostras aquosas ambientais;
- Desenvolver e validar metodologia analítica qualitativa para determinação da ocorrência de contaminantes emergentes (pesticidas, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticóides, β -bloqueadores, sedativos, coccidiostáticos, antimicrobianos, entre outros), totalizando cerca de 300 substâncias em amostras aquosas ambientais em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, por LC-QTOF-MS;
- Realizar monitoramento ambiental, no período de um ano, nas águas do Arroio Dilúvio, e Rios da Região Metropolitana de Porto Alegre (Rio dos Sinos e Rio Gravataí), e fazer uma relação sazonal da ocorrência destes compostos;
- Realizar análises de ecotoxicidade nas amostras ambientais utilizando ensaios de toxicidade aguda em *Danio rerio*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Monitoramento de contaminantes emergentes em amostras ambientais*

A presença de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos é uma grande preocupação mundial, gerando discussões que visam a busca de soluções [5], especialmente porque as fontes de água potável estão se tornando cada vez mais escassas. O rápido desenvolvimento industrial, o crescimento populacional e as secas prolongadas aumentam este problema. A contaminação da água também contribui na redução de água potável no mundo, que é exacerbada pela descarga crescente de efluentes de diversos tipos que muitas vezes não passaram por processo de tratamento adequado. Desta forma, a descarga crescente de poluentes convencionais e emergentes é uma preocupação muito grande, pois pode afetar direta ou indiretamente a saúde da população. Alguns CEs podem ser recalcitrantes no meio aquático, as taxas de remoção nas estações de tratamento de efluentes urbanos não são suficientes para superar as altas taxas de introdução destes compostos no ambiente, sendo que a fração que alcança o ambiente acaba sendo responsável pela

persistência e efeitos maléficos destes compostos [29]. Assim, o entendimento do destino e do comportamento de CEs no ambiente é fundamental para encontrar uma forma de melhorar a qualidade dos efluentes urbanos e, por consequência, melhorar os processos de tratamento de água potável [29].

Estimativas demonstram que menos de 50% do esgoto doméstico é recolhido no Brasil, sendo que deste apenas 37,5% é tratado [30–32], do que se entende que boa parte dessas substâncias é despejada no meio aquático sem qualquer tipo de tratamento. Estima-se que a utilização em medicina humana e veterinária contribui com cerca de 80% da emissão de fármacos no meio aquático [33,34].

Os fármacos, uma vez administrados, podem ser excretados (via urinária e pelas fezes) na sua forma inalterada, conjugados ou como seus metabólitos, chegando ao ambiente aquático através do esgoto doméstico, podendo assim se propagar e atingir águas superficiais devido a suas características hidrofílicas e de baixa remoção em ETEs. [10]. Outras fontes de entrada destes compostos no ambiente são a disposição inadequada de medicamentos expirados em locais inadequados, efluentes hospitalares e industriais, além da grande utilização na medicina veterinária, produção animal e aquicultura [1,11,22]. A principal preocupação com esses compostos é seu impacto nas fontes de água, que mesmo em quantidades muito baixas, podem apresentar efeitos indesejáveis. Por esse motivo, recentemente foram denominados como pseudopersistentes, pois apesar de suas moléculas muitas vezes não apresentarem estabilidade, são continuamente introduzidas no ambiente [35].

Em relação aos pesticidas, atualmente o Brasil é o primeiro país em uso de pesticidas [36]. Além da área continental do país, o clima tropical e a ocorrência de mais de uma colheita por ano são alguns fatores que contribuem para esse alto consumo [36]. No entanto, o monitoramento de pesticidas e outros CEs ainda é incipiente. Considerando extensão do país, há relativamente poucos estudos para sua ocorrência, com aproximadamente 60 estudos publicados entre 1997 e 2016 [37]. O uso de pesticidas tem mudado de compostos persistentes e menos polares (tais como moléculas organocloradas), para substâncias mais polares e menos estáveis, que possuem características físico-químicas que levam a uma alta possibilidade de contaminação das águas subterrâneas [25].

Dentre os pesticidas empregados na lavoura, os herbicidas são os mais utilizados, em especial o glifosato. Outros agrotóxicos como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides são de extrema importância no monitoramento ambiental. A Portaria Nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde apresenta limites para 36 agrotóxicos e metabólitos na água para consumo humano. Porém, é de fundamental importância o monitoramento do maior número possível destes compostos, devido a grande quantidade de produtos ativos disponíveis no mercado, que podem causar danos irreversíveis no ambiente e na saúde humana [38].

A incidência de CEs em águas doces, biota aquática e outras amostras ambientais foi recentemente revisada [39–41]. Estudos relacionados à presença de CEs no Brasil ainda são escassos se compararmos com outros países do mundo, onde este tipo de avaliação é intensiva. Alguns dados já publicados no Brasil envolvem trabalhos realizados em efluente, água de rio e água tratada. No estado do Ceará, Pessoa *et al.* avaliaram a remoção de estrona, 17- β -estradiol e etinilestradiol em ETEs. As amostras foram coletadas em 2010 e 2012, e as concentrações variaram de <LD (1,0 ng L⁻¹) a 3180 ng L⁻¹ para etinilestradiol [42]. Locatelli *et al.* avaliaram a presença de oito antibióticos em água de rio em São Paulo e todos foram encontrados pelo menos em uma amostragem [43]. No Estado de São Paulo, na região de Campinas, Jardim *et al.*, e Montagner e Jardim, avaliaram a presença de alguns fármacos e hormônios em água de rio no período de março de 2006 a janeiro de 2007. Nesse trabalho foram encontrados paracetamol, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, cafeína, 17 β -estradiol, progesterona e levonorgestrel [44,45]. Lopes *et al.* 2006, avaliaram a presença de estrona e 17 β -estradiol em água do rio na região de Jaboticabal-SP. O estudo foi realizado em 2006 durante cinco meses. O 17 β -estradiol foi encontrado em 25% das amostras analisadas e a estrona foi encontrada apenas em uma amostra [46].

Na região urbana de Porto Alegre, nosso grupo realiza estudos desde 2008 no sentido de caracterizar efluentes urbanos e águas superficiais (em especial o Arroio Dilúvio), no que diz respeito à presença destes compostos, a citar:

- Avaliação da presença e quantificação de fármacos que envolvem tanto o Arroio Dilúvio como rios da região metropolitana de Porto Alegre (rio dos Sinos e Gravataí), bem como efluentes urbanos, mostraram a presença de antibióticos [47], anti-inflamatórios não esteroidais [48] e hormônios [49];

- Nos estudos realizados nos efluentes urbanos, inúmeros contaminantes emergentes foram detectados e quantificados, além da avaliação da eficiência da remoção destes compostos em diferentes processos de tratamento de efluentes (trabalho de pós-doutorado);
- Definição de metodologia para isolamento e identificação de produtos de transformação oriundos de processos de tratamento [50];
- Estudos cinéticos dos processos de degradação utilizando fotocatalise [51].

2.2. *Área de estudo*

O Arroio Dilúvio nasce na Lomba do Pinheiro, Zona Leste da Cidade, na Represa da Lomba do Sabão. Recebe vários afluentes como os Arroios dos Marianos, Moinho, São Vicente e Cascatinha e deságua no lago Guaíba no limite entre os parques Marinha do Brasil e Maurício Sirotsky Sobrinho (Harmonia). A microbacia do Dilúvio tem cerca de 80 km², dos quais 19% estão localizados no Município de Viamão. A extensão canalizada do Arroio Dilúvio é de aproximadamente 12 km. O Arroio Dilúvio atravessa uma área urbana que compreende mais de 400 mil habitantes. De acordo com estudos, o curso d'água recebe, além dos despejos líquidos, em torno de 50000 m³ de solo e resíduos sólidos anualmente. Do efluente urbano gerado pela cidade, estima-se que cerca de 70% deste é recolhido adequadamente, através de redes coletoras para posterior tratamento [32,52]. Apesar do expressivo percentual de redes coletoras implantadas nesta bacia, a elevada contribuição de efluentes sanitários compromete visivelmente a qualidade das águas do Arroio Dilúvio, principalmente em pontos de urbanização recente, onde a coleta dos efluentes não acompanhou a expansão populacional. Além disso, existem ligações ilegais do efluente à rede pluvial, sejam por questões técnicas e/ou culturais, que acabam diretamente pelo Arroio Dilúvio. Existe, ainda, neste entorno, cerca de oito hospitais, um deles veterinário, que podem contribuir para a ocorrência de fármacos no Arroio. O Arroio Dilúvio desemboca no lago Guaíba, de onde é coletada a maior parte da água consumida pela população de Porto Alegre.

O lago Guaíba é um ecossistema que sustenta uma rica biodiversidade, onde interagem diversas espécies vegetais e animais, que dependem de sua boa qualidade e

preservação. Tem uma área de 496 km². É formado pelos rios Jacuí (84,6%), dos Sinos (7,5%), Caí (5,2%) e Gravataí (2,7%), e recebe também as águas dos Arroios situados às suas margens, abrangendo uma área de drenagem de 1/3 do território do Rio Grande do Sul. Nela, estão situados os núcleos industriais mais importantes do estado, concentrando dois terços da produção industrial do Rio Grande do Sul, e os centros urbanos mais populosos, onde vive 70% da população do estado. O manancial recebe carga poluidora de várias naturezas, incluindo esgotos domésticos *in natura*, ou parcialmente tratados, além de efluentes industriais e agrícolas. As águas do Guaíba apresentam variações de qualidade, com maior prejuízo nas áreas de margem, onde ocorre menor dispersão das cargas poluentes afluentes [32].

A Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos situa-se a nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas de 29°20' a 30°10' de latitude Sul e 50°15' a 51°20' de longitude Oeste. Abrange as províncias geomorfológicas do Planalto Meridional e Depressão Central. Possui área de 3.746,68 km², abrangendo municípios como Campo Bom, Canoas, Gramado, Igrejinha, Novo Hamburgo, São Leopoldo, Sapucaia do Sul, Taquara e Três Coroas, com população total estimada em 1.249.100 habitantes. Tem sua nascente na cidade de Caraa e desembocadura no delta do Jacuí. [53].

O Rio Gravataí localiza-se a leste do Estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 29°45' a 30°12' de latitude Sul e 50°27' a 51°12' de longitude Oeste. Abrange as províncias geomorfológicas Depressão Central, Planalto Meridional, Escudo Sul-Rio-Grandense e Planície Costeira. Possui área de 1.977,39 km² e população estimada em 1.298.046 habitantes, abrangendo municípios como Alvorada, Cachoeirinha, Canoas, Gravataí, Porto Alegre, Santo Antônio da Patrulha e Viamão. [53].

2.3. *Metodologias analíticas para identificação de contaminantes emergentes utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (LC-QTOF-MS)*

Vários métodos de análise são utilizados para o monitoramento de poluentes emergentes em amostras ambientais, como água, solos e sedimentos. Em geral,

considerando o nível de concentração extremamente baixo que estes compostos são encontrados neste tipo de amostra, fazem-se necessários métodos com alta sensibilidade e especificidade como aqueles empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, para que sejam possíveis a detecção e a quantificação dos contaminantes emergentes em águas em nível de traços e ultratraços.

A cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (LC-QTOF-MS) apresenta um enorme potencial na análise qualitativa de contaminantes orgânicos em níveis de traços e ultratraços (mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}). A excelente precisão de massa juntamente com a aquisição de um conjunto de dados completo em relação aos componentes da amostra com alta sensibilidade facilita a realização de um *suspect screening* de amplo escopo, seja na abordagem de compostos *targets*, como *untargets* [28,54,55]. É possível analisar os dados previamente adquiridos em qualquer momento, para procurar compostos adicionais (*untargets*) em uma análise de aquisição pós-dados, sem a necessidade de realizar uma nova análise [56], desde que o método extrativo aplicado seja capaz de selecionar o composto em questão. A abordagem de análise *untarget* permite a identificação de compostos anteriormente não incluídos no escopo do método. [57–60].

Quando da utilização da cromatografia a líquido acoplada a espectrômetro de massa, a ionização pode se dar de várias formas. Para substâncias mais lábeis em termos de fragmentação, como é o caso da maioria dos fármacos e pesticidas, o sistema de ionização mais utilizado é a ionização por *Eletrospray* (ESI, do inglês *Eletrospray Ionization*). Além disso, a ionização pode ser conduzida no modo positivo, onde o analito é carregado positivamente, e no modo negativo, onde é carregado negativamente. De um modo geral, os compostos utilizados nesse estudo apresentam melhor resposta quando ionizados no modo positivo, neste caso, o íon molecular terá a estrutura $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Na ionização por ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido passa através de um capilar, a vácuo, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o

ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida, ocorrendo uma “explosão coulômbica”. Os íons gerados são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização [61].

Após a etapa de ionização, os analitos seguem para o analisador. O sistema QTOF-MS consiste em um quadrupolo e célula de colisão acoplados a um analisador de tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) com aceleração ortogonal para MS/MS. Conseqüentemente, o analisador QTOF-MS tem a capacidade de análise do MS, assim como modos de operação em MS/MS. Fundamentalmente, o princípio de funcionamento do analisador QTOF-MS está baseado na medida de tempo que levam os íons gerados e acelerados com a mesma energia na fonte de íons, para alcançar um eletrodo coletor localizado a uma distância pré-determinada. À medida que os íons possuem a mesma energia, mas diferentes massas, estes chegarão ao coletor em momentos diferentes, dependendo da sua massa, carga e energia cinética [61].

É possível que se obtenha numa mesma análise, dados de massa exata e de fragmentação dos compostos, através do modo bbCID (do inglês *Broadband Collision Induced Dissociation – Bruker Daltonics*). A análise de compostos no modo bbCID gera continuamente fragmentos de íons usando dissociação por colisão induzida. Durante o processo completo de triagem, o QTOF alterna rapidamente ciclos entre baixa energia de colisão (TOF-MS) e elevada energia de colisão (bbCID) MS/MS, resultando na coleção de íon precursor e seus fragmentos de massa precisos em uma única análise, sem comprometimento da sensibilidade ou resolução (Figura 1) [62].

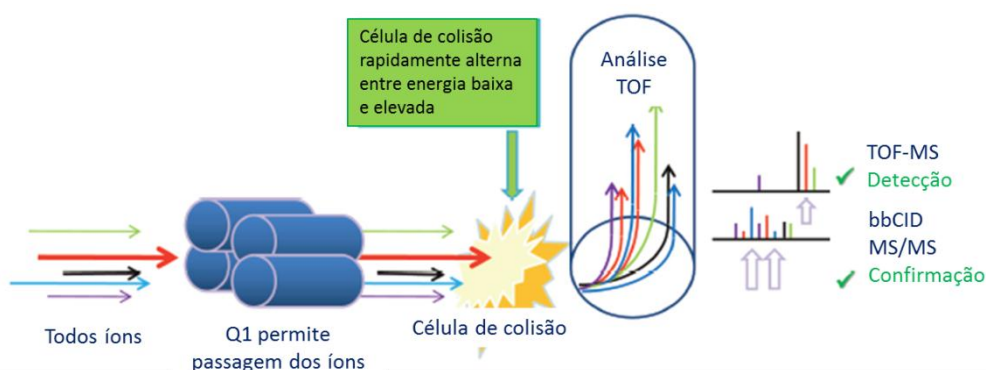


Figura 1. Esquema de aquisição de dados Bruker broadbandCID (bbCID): O espectrômetro de massa QTOF alterna rapidamente entre dois canais de massa precisos com varredura completa, um com baixa energia de colisão e o outro em energia de colisão elevada. Fonte: adaptado de *Bruker Daltonics*.

Desta forma, a exatidão na medida de massa proporcionada por um analisador TOF é muito mais alta que para qualquer outro instrumento, devido a excelente separação e detecção de íons no tubo de voo, permitindo erros inferiores a 5 ppm na exatidão da medida de massa dos íons (esse valor é aceito para verificação da composição elementar). Assim, o LC-QTOF-MS possibilita o desenvolvimento de métodos de multirresíduos com alta especificidade na identificação das substâncias por meio da caracterização da massa exata dos analitos de interesse com quatro algarismos decimais, evitando falsos positivos. Para alcançar tal exatidão de massa, esses instrumentos requerem uma frequente calibração. A calibração *on-line* é vital para evitar flutuações que podem acontecer durante a realização da análise [61].

Nos últimos anos, foram publicados vários trabalhos usando LC-QTOF-MS para analisar CEs em amostras de meio ambiente. Um método para determinações de 150 CEs nas águas usando LC-QTOF-MS foi validado para analisar 15 amostras reais com resultados satisfatórios [63]. Martínez Bueno *et al.* utilizaram um sistema LC-QTOF-MS para realizar a determinação qualitativa e quantitativa de diversos fármacos (analgésicos, opióides e psicoestimulantes) em águas superficiais [64]. A análise de 160 metabólitos de fármacos em águas residuais utilizando LC-QTOF-MS foi relatada por Hernandez *et al.* em amostras previamente analisadas, utilizando análise de dados pós-aquisição [56]. Um método por LC-QTOF-MS para compostos *target* e *untarget* foi aplicado para a identificação de fármacos e seus metabólitos em águas residuais [65]. Fármacos e drogas ilícitas foram analisados em águas superficiais e águas residuais urbanas utilizando um método baseado em LC-QTOF-MS [66]. Bade *et al.* realizaram um *screening* de 107 fármacos e drogas ilícitas em 18 amostras de águas residuais, comparando os dados de LC-QTOF-MS com dados UPLC-Orbitrap-MS [67]. Um método de triagem e quantificação de 43 pesticidas utilizando LC-QTOF-MS foi desenvolvido e aplicado a amostras de águas superficiais e efluentes urbanos [68]. Atualmente, LC-QTOF-MS foi a principal técnica utilizada para a determinação de resíduos farmacêuticos em amostras ambientais [9,59,69–71].

Para o preparo de amostra, a extração e o *clean-up* são etapas extremamente importantes quando se trabalha com análise de nível de traço. Otimizar o processo de preparo de amostras com o objetivo de reduzir as interferências da matriz e melhorar a precisão, sensibilidade, recuperação e um baixo nível de limite de detecção são

essenciais para a análise instrumental [72]. Um dos protocolos mais frequentemente utilizado para amostras aquosas é a extração em fase sólida (SPE) [1,59,68,73–75], especialmente devido ao baixo consumo de solventes orgânicos, ao alto fator de concentração alcançado, a vários tipos de adsorventes disponíveis e à grande diversidade de aplicações.

2.4. *Parâmetros de desempenho de método analítico*

Métodos analíticos baseados em espectrometria de massa de alta resolução (HRMS, do inglês *high resolution mass spectrometry*) são muito úteis para a química ambiental devido à sua capacidade de confirmar se uma substância está presente ou não em uma amostra em um determinado nível de concentração [63].

No entanto, a validação da análise qualitativa é uma questão menos explorada do que a análise quantitativa nas diretrizes de validação propostas para análises de fármacos e de pesticidas. Recentemente, algumas considerações sobre a validação de métodos de seleção para análise de resíduos de pesticidas foram publicadas pela SANCO (European Commission DG-SANCO 2012) [76].

Devido à falta de um protocolo de validação harmonizado para métodos de seleção de CEs baseados em HRMS, alguns autores estabelecem critérios específicos que devem ser alcançados no desenvolvimento e validação de métodos de triagem de CEs [69,77,78]. Esses critérios são baseados em métodos de análise toxicológica e antidopagem, que possuem um número relativamente grande de protocolos de validação de análise qualitativa [79,80].

A identificação somente do íon precursor com exatidão de massa e do tempo de retenção pode levar a um alto número de resultados falso-positivos, particularmente quando se trabalha com matrizes complexas. No entanto, incluindo um íon qualificador dado pela aquisição de dados por *bbCID* como requisito obrigatório nos critérios de confirmação, resultados falso-positivos são praticamente eliminados, garantindo a máxima confiança em resultados de triagem (figura 2).

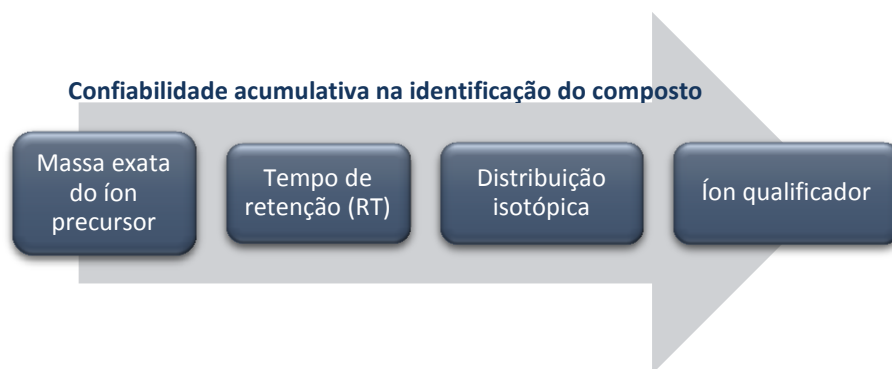


Figura 2. Critérios avaliados na identificação e confirmação dos compostos.

Fonte: a autora.

2.5. Avaliação de ecotoxicidade

Os ensaios de ecotoxicidade servem como um complemento das análises físicas e químicas, visto que somente essas análises não são suficientes para caracterizar a qualidade de determinado ambiente. Apenas os organismos biológicos são capazes de detectar o efeito tóxico que algumas substâncias causam, pois, muitos organismos respondem a concentrações de substâncias bem abaixo dos limites de detecção dos métodos analíticos.

Métodos recentes de teste de toxicidade utilizam peixe nos estágios iniciais de desenvolvimento, como o método proposto pela *OCDE 236 Guideline* que usa embriões recém-fertilizados em testes de toxicidade aguda (OCDE 2013a), ISO 15088 (2007) e DIN 38415-T-6 (2001) [81,82].

Os ensaios ecotoxicológicos de toxicidade aguda avaliam a capacidade da amostra em causar efeitos deletérios (morte ou imobilidade) aos organismos expostos após um curto período de exposição. *Danio rerio* é uma das espécies mais comumente usadas em ensaios de toxicidade em todo o mundo. A avaliação da toxicidade aguda seguindo o método FET (do inglês *Fish Embryo Toxicity Test*) apresenta como proposta a utilização de embriões de peixes como organismos-teste em substituição aos peixes adultos. Desenvolvido e padronizado originalmente na Alemanha com o objetivo de ser uma alternativa para a avaliação da toxicidade de efluentes com peixes em ensaios de 48 h, foi sugerido internacionalmente pela OECD em 2013 (OECD 210 (2013b)) para avaliação da toxicidade de substâncias químicas em ensaios de 96 h [82,83].

3. Materiais e métodos

3.1. *Materiais, solventes, reagentes e padrões analíticos.*

Os solventes utilizados nos procedimentos de limpeza dos materiais foram acetona p.a. e comercial e hexano p.a. e comercial. Para o procedimento de análise, foram utilizados os solventes acetonitrila (ACN), acetona (ACO) e metanol (MeOH), todos de grau HPLC, adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemanha) e J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). O ácido acético (HAc) e o ácido fórmico (FA) foram ambos de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água ultrapura (<18,2 MΩ cm de resistividade) foi obtida a partir do Sistema de Água Reagente Milli-Q SP de Millipore (Bedford, MA, EUA). Cartuchos de SPE de fase reversa polimérica Strata-X™ (33 μm, 200 mg, 6 mL) foram adquiridos de Phenomenex (Torrance, Califórnia, EUA). Filtros de membranas de ésteres de celulose de 0,47 mm e diferentes tamanhos de poros (9; 5; 3; 1,2 e 0,45 μm) foram adquiridos de Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA) e filtros de seringa de PVDF 0,22 μm foram de Filtrilo (Colombo, PR, Brasil). Os padrões analíticos foram adquiridos de Riedel-de-Haën (Buchs, Suíça), Across Organics (Geel, Bélgica), Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) ou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) de maior pureza disponível. Para as análises físico-químicas, foram utilizados ácido clorídrico, bórax, indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol.

3.2. *Equipamentos*

Os sistemas de espectrometria de massa utilizados foram um cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series acoplado a espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo Sciex 5600 (LC-QTOF-MS) (Sciex, Foster City, CA), e um cromatógrafo líquido Nexera x2 Shimadzu acoplado a espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo Impact II Bruker (LC-QTOF-MS) (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA). A coluna cromatográfica utilizada foi a Acquity UPLC BEH Phenyl (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) (Waters Corporation, Massachusetts, EUA).

Para fins de preparo de amostra foi utilizado sistema de vácuo Supelco Visiprep™DL SPE vaccum manifold (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para a etapa de SPE

e concentrador de amostras Tecvap TE-0194 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil).

Para as análises físico-químicas complementares, foram utilizados o pHmetro Digimed DM22, o condutivímetro Digimed DM 31, o turbidímetro Turb plus Alfakit e o OD Lutron WA-2015.

3.3. *Métodos*

3.3.1. Limpeza dos materiais de laboratório

Todas as vidrarias e materiais comuns de laboratório foram lavados com água em abundância e enxaguados com água deionizada e/ou destilada. Após secagem, foi passado primeiramente hexano e em seguida acetona em toda a vidraria. A vidraria não volumétrica foi levada ao forno, a 300°C por duas horas e resfriada. Todo material foi embalado nas extremidades com papel alumínio, para evitar possíveis contaminações.

3.3.2. Preparo das soluções padrão estoque e de trabalho

Para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos, as soluções padrão estoque de cada composto foram preparadas separadamente dissolvendo 0,010 g num volume de 10,0 mL do solvente adequado (metanol, acetonitrila ou água ultrapura, de acordo com o composto) para obter uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹. A partir da solução estoque de cada analito, as soluções de trabalho foram adequadamente diluídas (chamada solução mix), em solvente adequado de acordo com a solução, para produzir soluções de mistura em concentrações de trabalho de 1,0 µg mL⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas em congelador, a uma temperatura em torno de -18°C, por até seis meses.

3.3.3. Otimização dos parâmetros de espectrometria de massa e de cromatografia líquida para análise de fármacos e pesticidas por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa por Tempo de Voo (LC-QTOF-MS)

Inicialmente, o método foi desenvolvido e validado no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos (RPM) do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS).

O sistema LC-QTOF-MS utilizado foi um cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series acoplado a um espectrômetro de massa Triple TOF 5600 (Sciex). A ionização foi por *electrospray* no modo positivo (ESI+). O intervalo de m/z para a aquisição de dados foi de 100 a 1000 Da. A calibração do espectrômetro de massa foi realizada entre cada análise utilizando a Solução de Calibração Positiva APCI para o SCIEX Triple TOF. A voltagem do *spray* foi ajustada a 4500 V, a temperatura da fonte a 400°C, CUR (do inglês *curtain gas*) a 15 psi, GS1 (do inglês *ion source gas 1*) a 50 psi, GS2 (gás 2) a 50 psi, DP (do inglês *declustering potential*) a 60 eV e CE (do inglês *collision energy*) a 10 eV. A análise dos dados foi feita pelo software Multiquant 2.1.1 (Sciex).

Após a aquisição de um sistema LC-QTOF-MS pelo Instituto de Química da UFRGS, foi possível adaptar o método já desenvolvido e dar sequência ao estudo dentro da universidade.

O sistema LC-QTOF-MS utilizado foi um cromatógrafo líquido Nexera x2 (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massa Impact II (Bruker Daltonics). Os softwares utilizados para a operação do sistema e aquisição de dados foram Compass Hystar 3.2 e OTOF control 4.0. Dados de TOF-MS e bbCID (MS-MS/MS) foram adquiridos na faixa de m/z de 50 a 1000 Da. A tensão capilar da fonte de íons foi de 4000 V. A pressão do gás nebulizador foi de 5,0 bar e a taxa de fluxo de gás de secagem de 9,0 L min⁻¹. O nitrogênio foi utilizado tanto para o nebulizador quanto para o gás de secagem. A temperatura do gás de secagem foi de 210°C. O tempo de transferência da fonte foi de 50 μ s e o tempo de armazenamento pré-pulso de 5 μ s. A energia de colisão em *full scan* foi ajustada em 10 eV e a energia de colisão em bbCID foi ajustada em 20-40 eV. No bbCID, os íons precursores foram fragmentados na célula de colisão sem pré-seleção. Ao alternar a aquisição entre as condições de MS e bbCID, os conjuntos de dados de energia de colisão alta e baixa foram coletados

simultaneamente. A calibração externa do instrumento foi realizada com uma solução de formiato de sódio 10 mM.

Os softwares utilizados para aquisição de dados foram q-TOFcontrol 4.0 and Compass Hystar 3.2, e os softwares Data Analysis 4.2 e Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonics) foram usados para processamento dos dados pós-análise e para a criação de um sistema automatizado para geração de relatórios de resultados positivos. Outra ferramenta utilizada para análise de dados, quando necessário, para a identificação dos compostos foi o software Smart Formula 3D (Bruker Daltonics).

Um banco de dados *in house* foi criado utilizando o software Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonics), onde foram incluídos 301 compostos entre fármacos e pesticidas. O banco de dados foi criado através da injeção das soluções mix dos padrões analíticos dos compostos na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, onde foram coletadas as informações de tempo de retenção e dados de massa a partir dos conjuntos de dados de MS e bbCID (MS/MS). Uma lista dos fragmentos de m/z monitorados para cada analito incluído no método de triagem é mostrada nas Tabelas II e III em ANEXO I.

A identificação dos compostos foi baseada na pesquisa no banco de dados com critérios de aceitação definidos para a geração de relatórios automatizados, seguidos de inspeção manual no software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics).

Os critérios de relatórios automatizados incluíam precisão da massa de íons precursores (± 5 mDa), tempo de retenção ($\pm 0,7$ min) e abundância dos íons de qualificação (> 1000 cnts), juntamente com critérios adicionais de padrão isotópico precursor (SigmaFit™ Bruker Daltonics, mSigma <100). A contagem mínima de área do pico do precursor foi fixada em 10000.

A separação cromatográfica dos compostos foi realizada utilizando uma coluna analítica Acquity UPLC BEH Phenyl ($2,1 \times 50$ mm, $1,7 \mu\text{m}$). Utilizou-se uma fase móvel binária com um fluxo de $500 \mu\text{L min}^{-1}$. O componente de fase móvel A era uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e o componente B era acetonitrila com ácido fórmico a 0,1%. O gradiente otimizado para a separação começa com 95% de A que decresce linearmente para 5% de A durante 6 minutos e mantém-se durante 2 minutos. Finalmente, A% aumenta linearmente em 1 minuto para atingir 95% e mantendo-se até 12 minutos. Um tempo de equilíbrio de 4 min na condição da fase móvel inicial (5% B) foi aplicado entre cada análise.

3.3.4. Preparo de amostra

Primeiramente as amostras foram filtradas a fim de remover a matéria em partículas, utilizando filtros de membrana de celulose com tamanhos de poro diferentes (9, 5, 3, 1,2 e 0,45 μm).

Para o desenvolvimento do método de extração, *clean-up* e concentração da amostra, foram utilizados cartuchos Strata™-X (33 μm , 200 mg, 6 mL) de fase reversa polimérica disponíveis comercialmente (Phenomenex). O protocolo de análise foi baseado e adaptado do método desenvolvido por Jank *et al.*, anteriormente descrito na literatura [47]. A SPE foi realizada utilizando sistema Manifold para 12 cartuchos (Supelco). Na etapa de acondicionamento do cartucho, foram adicionados 3 mL de MeOH com HAc 3%, 3 mL de acetona com HAc 0,3% e 3 mL de água com 5% de MeOH a um de fluxo de aproximadamente 5 mL min^{-1} . A extração foi realizada sob vácuo e o volume da amostra de 250 mL foi carregado a um fluxo de aproximadamente 10 mL min^{-1} . Após o passo de percolação da amostra, os cartuchos foram secos durante 5 minutos em vácuo (aproximadamente 16 mmHg). A eluição foi realizada com 3 mL de MeOH com HAc 0,3% seguido por 3 mL de acetona com HAc 0,3%. O extrato final foi levado à secura utilizando um banho de água a 42°C sob fluxo de nitrogênio. O extrato foi reconstituído com água:acetonitrila (95:5) até um volume final de 1 mL. As amostras foram injetadas no sistema LC-QTOF-MS, e, posteriormente, no sistema LC-MS/MS (CAPÍTULO 2).

3.3.5. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método

Para a validação dos métodos, utilizou-se água de efluente urbano tratado coletado em uma estação de tratamento de efluente piloto (29°59'27"S 51°11'37"W, Porto Alegre, Brasil) pertencente ao Instituto de Pesquisa Hidráulica (IPH) da UFRGS, e água superficial foi coletada no Arroio do Salso (30°10'28.4"S 51°12'53.7"W, Porto Alegre, Brasil).

Foi utilizado o protocolo de validação proposto por Diaz *et al* [63]. A figura de mérito geral foi o limite de detecção de triagem (SDL), que é o nível de concentração mais baixo testado para o qual um composto foi detectado em todas as amostras para

uma determinada matriz e em um determinado nível (3 em 3), usando o íon mais abundante. Outros parâmetros, como especificidade e seletividade, também foram avaliados. A confirmação de cada composto foi obtida através do monitoramento de dois fragmentos para cada analito.

Para a validação do método qualitativo para análise de fármacos e pesticidas em águas foi realizada em matrizes aquosas diferentes: efluentes de águas residuais (EF) e águas superficiais (AS). Para cada matriz, antes da extração, as amostras foram fortificadas com as soluções de trabalho. Foram analisadas três replicatas de cada uma das três concentrações: 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, além de três amostras brancas (não fortificadas). As amostras passaram pelo processo de SPE e foram analisadas no LC-QTOF-MS.

Os critérios de identificação dos compostos foram baseados na massa exata de cada composto com um erro de massa máximo de 5 mDa, no tempo de retenção esperado, onde foi considerado como o tempo de retenção observado para o padrão com meia janela de 15 s. A identidade de cada composto foi confirmada pelo monitoramento dos dois fragmentos mais intensos gerados pelo íon molecular.

A especificidade foi avaliada usando amostras brancas. O uso de amostras brancas geralmente é problemático na validação de métodos para análise de CEs em água ou outras amostras ambientais, devido à presença quase onipresente de alguns compostos nessas amostras, no nível de traço ou ultratraço. Assim, para obter amostras brancas muito semelhantes às amostras reais, mas com uma garantia da ausência de CEs, foi realizada uma abordagem baseada em uma pré-análise anterior por SPE, conforme descrito anteriormente na literatura [47]. Para simular as condições reais das matrizes, uma "matriz branca" foi considerada como o eluato da SPE obtido logo após a percolação de uma amostra real (sem eluição com solvente). Espera-se que qualquer analito permaneça adsorvido no cartucho de SPE e o eluato possua a composição mais aproximada de uma amostra em branco. Este eluato foi analisado - incluindo todo o procedimento SPE - para confirmar a ausência de analitos. A especificidade foi avaliada por análise de seis amostras de águas (AS e EF).

3.3.6. Análises físico-químicas complementares

Buscando caracterizar as amostras, foram feitas análises de pH, condutividade, turbidez e alcalinidade.

Para a medição de pH, condutividade e turbidez das amostras, foram utilizados o pHmetro Digimed DM22, o condutivímetro Digimed DM 31 e o turbidímetro Turb plus Alfakit.

A determinação da alcalinidade das amostras foi realizada por método titulométrico utilizando solução de ácido clorídrico previamente padronizado. A alcalinidade da água pode ser devido à presença dos íons hidróxido, carbonatos ou bicarbonatos. A quantidade de ácido consumida mede a alcalinidade da amostra. Em função do pH, podem estar presentes os seguintes íons: pH 11,0 – 9,4: hidróxidos e carbonatos; pH 9,4 – 8,3: carbonatos e bicarbonatos; pH 8,3 – 4,6: somente bicarbonatos.

Considerando que todas as amostras em estudo tiveram pH entre 4,6 e 8,3, as amostras foram tituladas para a determinação da alcalinidade devida somente a bicarbonatos, utilizando somente o indicador com viragem na zona ácida (verde de bromocresol). A titulação foi realizada com ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ previamente padronizado com bórax $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e vermelho de metila como indicador. Vinte e cinco mililitros de amostra foram pipetados em Erlenmeyer e aquecidos em manta a fim de remover o CO_2 dissolvido. Em seguida, adicionou-se 3 gotas de verde de bromocresol e se prosseguiu a titulação com HCl até mudança de cor do azul para o amarelo. Este procedimento foi realizado em triplicata. A alcalinidade foi calculada de acordo com a equação a seguir (Eq.1):

$$\text{Alcalinidade (mg L}^{-1}\text{)} = 200 V \times \text{concentração}_{\text{HCl}} \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

V: volume gasto do titulante;

Fator 200 = cada 1 mL da solução padrão corresponde a 5 mg de CaCO_3 e 25 mL de amostra transformados para 1 L.

3.3.7. Monitoramento ambiental: amostragem

As amostragens foram realizadas trimestralmente, nos meses de setembro, dezembro, março e junho, durante dois anos, tendo início em setembro de 2016 e finalizando em setembro de 2018, totalizando nove campanhas.

Seis pontos de amostragem foram selecionados na extensão do Arroio Dilúvio (Figura 3). O primeiro ponto de amostragem está localizado na Zona Leste de Porto Alegre, dentro do Campus do Vale da UFRGS (30°04'27.9"S 51°07'27.1"W). Os pontos de amostragem de 2 a 5 estão localizados na região de maior urbanização da cidade, no decorrer da Avenida Ipiranga (P2, 30°03'39.9"S 51°09'05.2"W; P3, 30°03'31.3"S 51°10'55.8"W; P4, 30°02'43.3"S 51°11'55.6"W; P5, 30°02'51.1"S 51°12'51.3"W). O último ponto de amostragem está onde o Arroio desemboca no lago Guaíba, onde a maior parte da água consumida pela população de Porto Alegre é coletada (P6, 30°02'49.5"S 51°13'59.5"W). O comprimento da área monitorada foi de aproximadamente 12 km.

Um ponto de amostragem foi utilizado no rio Sinos (29°45'32.4"S 51°08'53.6"W) e um no rio Gravataí (29°57'41.8"S 51°06'28.5"W).



Figura 3. Pontos de amostragem realizadas na extensão do Arroio Dilúvio.
Fonte: Google Maps.

Todas as amostras foram coletadas em triplicata em cada ponto no mesmo dia (n=18). As amostras foram coletadas aproximadamente a 0,5 m de profundidade, a 1-2 m da borda do arroio. Em todos os locais de amostragem, as águas foram coletadas em garrafas de vidro âmbar e transportadas para o laboratório. As coletas foram realizadas sempre no período da manhã, entre 9 e 13 horas, iniciando pelo rio Gravataí e rio dos Sinos, e em seguida no Arroio Dilúvio, iniciando sempre pelo ponto 6 (lago Guaíba) e finalizando no ponto 1 (Campus do Vale-UFRGS), seguindo o fluxo contrário da água. Os dias de coletas foram estabelecidos levando em consideração os períodos de chuvas, dando sempre um intervalo de pelo menos sete dias sem chuvas fortes, a fim de evitar possíveis variações no monitoramento. A Tabela I em ANEXO apresenta os volumes de precipitação e temperaturas nos meses de coletas, de acordo com os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) [84].

Após a recepção no laboratório, as amostras foram filtradas para remover o material particulado, utilizando filtros de membrana de celulose com tamanhos de poro diferentes (9, 5, 3, 1,2 e 0,45 μm). Uma fração de cada amostra foi reservada para as análises físico-químicas, e no restante foi adicionado formaldeído (0,1%) a cada frasco a fim de evitar a proliferação de microrganismos. As amostras foram mantidas sob refrigeração a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ até ao momento do preparo de amostra por SPE, que não foi superior a um dia.

3.3.8. Tratamento quimiométrico dos dados

Após aquisição e tratamento dos dados das amostras do Arroio Dilúvio, foi aplicada ferramenta quimiométrica para análise de dados multidimensionais. Utilizou-se o modelo de Tucker3, onde as matrizes \mathbf{A} ($I \times D$), \mathbf{B} ($J \times E$) e \mathbf{C} ($K \times F$) contêm os pesos (“loadings”) do modelo relativos às três dimensões dos dados, respectivamente; o tensor \mathbf{G} ($D \times E \times F$) é o elemento conector (“core matrix”); o tensor \mathbf{E} ($I \times J \times K$) contêm os erros do modelo. Os termos D, E e F indicam o número de fatores nas três dimensões dos dados, respectivamente. Os elementos do tensor \mathbf{G} definem como os pesos individuais interagem nas diferentes dimensões, ou seja, os seus valores absolutos

indicam a importância de cada tríade [85]. A representação gráfica da decomposição dos dados efetuada pelo método é apresentada na Figura 4.

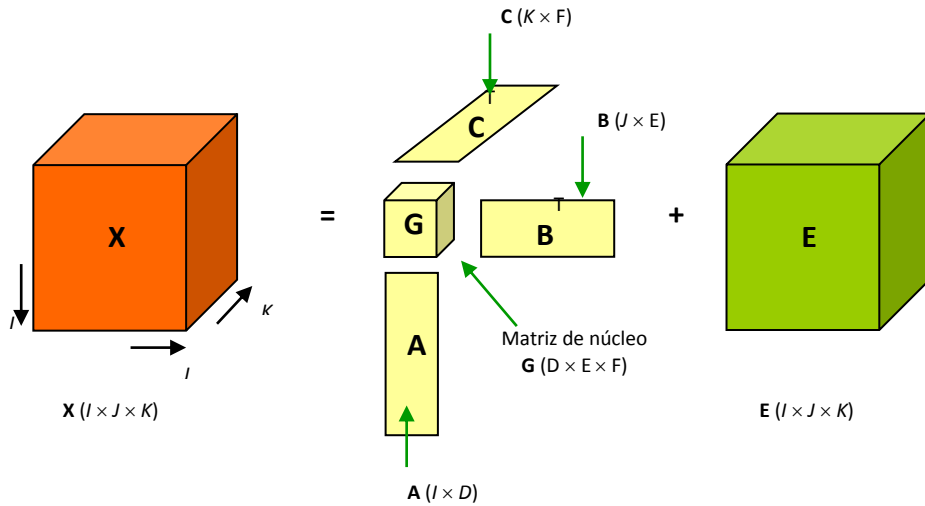


Figura 4. Representação gráfica do modelo Tucker3. Adaptado de Sena *et al.*, 2005 [85].

O modelo foi elaborado utilizando pacote Nway-toolbox para Matlab (Mathworks). Os dados obtidos considerando os pontos de coleta de amostra ($n=6$), o número de meses em que foram realizadas as amostragens ($n=9$) e o número de compostos detectados ($n=32$), foram arrajados em um tensor X ($32 \times 9 \times 6$). O número de fatores (complexidade do modelo) foi definido pelos autovalores das matrizes Xa (32×54), Xb (9×192) e Xc (6×288), obtidos do plano frontal X ($32 \times 9 \times 6$) (Figura 5).

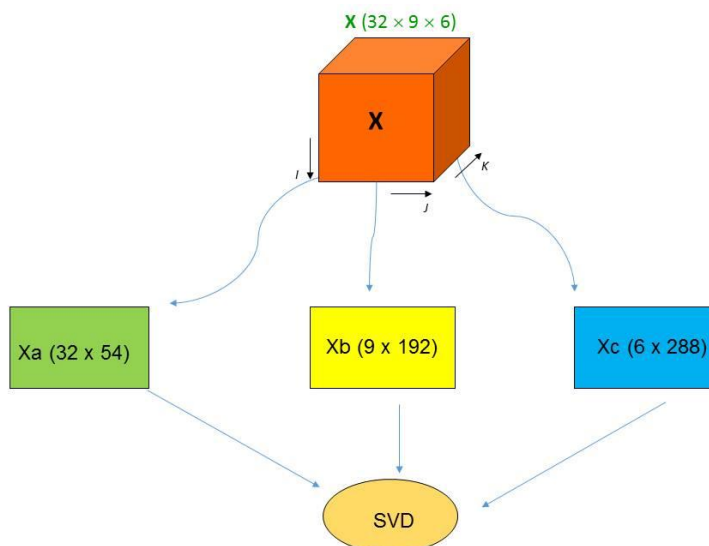


Figura 5. Representação da disposição dos dados para inspeção do número de fatores via decomposição de valores singulares (SVD).
Fonte: a autora.

Considerando que se trata de um método qualitativo, as áreas dos compostos foram previamente normalizadas para que pudessem ser comparadas entre diferentes compostos, já que não se conhece a concentração de cada composto e também pelo fato de que a ionização não se dá da mesma forma para todos os compostos.

A normalização da área foi realizada considerando as áreas do calibrante formiato de sódio. As áreas dos cromatogramas de íon extraído da m/z 294,9389 de todas as amostras foram tabeladas, e a menor área entre elas foi dada como fator de correção (FC) igual a 1 e foi denominada A_{ref} , e todas as demais áreas foram corrigidas, dividindo a área do A_{ref} pela área do calibrante na amostra (Eq. 2).

Calibrante (294, 9389):
$$FC = \frac{A_{ref}}{A_{amostra}} \quad \text{Eq. 2}$$

Determinado o fator de correção para cada amostra, a área de cada composto presente nas amostras foi multiplicada pelo seu FC, tendo assim a sua área normalizada (Eq. 3).

Compostos:
$$A_{normalizada} = A_{composto} \cdot FC \quad \text{Eq 3}$$

3.3.9. Avaliação da toxicidade aguda com o peixe *Danio rerio*

A avaliação da potencial toxicidade aguda das amostras de água foi determinada a partir da exposição de embriões de *Danio rerio* as amostras coletadas. Os ensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ECOTOX/UFRGS). Os embriões utilizados foram gerados a partir de matrizes selvagens da espécie mantidas no próprio laboratório.

Após a fecundação, os ovos foram transferidos para placas de Petri contendo água deionizada reconstituída para uma dureza de 40 - 47 mg L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7,4 - 7,5, e avaliados em estereomicroscópio com aumento de 70 vezes quanto ao desenvolvimento embrionário e viabilidade dos mesmos. Os ensaios de toxicidade foram iniciados até 90 minutos após a fertilização dos ovos e seguiram as determinações da metodologia FET (do inglês *Fish Embryo Toxicity*), OECD 236 [82].

Aproximadamente 30 ovos foram selecionados e transferidos para placas de Petri contendo cada uma das oito amostras a serem avaliadas, o controle negativo (água deionizada reconstituída - dureza de 40 - 47 mg L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7,4 - 7,5) e o controle positivo (4,0 mg L⁻¹ de 3,4-Dichloroaniline). Com auxílio do estereomicroscópio os ovos fecundados foram transferidos individualmente para os poços das respectivas microplacas contendo as mesmas amostras.

Os 24 poços de 2 mL com as respectivas amostras foram mantidos em incubadora a 28°C ± 1°C e com fotoperíodo de 15L:9E.

Os embriões foram observados a cada 24 horas durante 96 horas. Para cada ponto amostral foi utilizada uma microplaca de 24 poços de 2 mL mantida a 28°C ± 1°C. Como indicativo dos efeitos tóxicos, foram utilizados os quatro “*end points*” previstos no método FET: (1) coagulação de ovos fertilizados; (2) não formação de somito; (3) ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino; (4) ausência de batimentos cardíacos, considerados como letais aos peixes.

Visando observar a ocorrência de efeitos tardios aos organismos-teste, após o período de exposição de 96 horas previsto na metodologia, as larvas de *D. rerio* sobreviventes foram transferidas para béqueres de 250 mL como uma nova alíquota

da respectiva amostra e assim mantidos por mais 96 horas. As amostras foram trocadas a cada período de 48 horas, com registros a cada 24 horas em relação a sobrevivência e mobilidade.

A análise estatística dos dados de toxicidade observados foi avaliada segundo prova exata de Fisher executado no programa TOXSTAT 3.5. As avaliações de toxicidade aqui descritas foram realizadas com as amostras provenientes das coletas de setembro/2017, dezembro/2017 e março/2018.

A fim de avaliar o efeito dos CEs, desconsiderando a contribuição dos demais componentes da amostra, foi preparada uma solução mix dos compostos comumente encontrados nas amostras reais, em água deionizada reconstituída (dureza de 40 - 47 mg L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7,4 - 7,5).

4. Resultados e discussão

4.1. Validação do método

O uso de HRMS permite um alto grau de confiança na identidade dos compostos. Não obstante, alguns critérios devem ser observados para obter condições de repetitividade. Assim, os critérios de identificação máxima devem ser estabelecidos antes dos ensaios de validação. No presente trabalho, esses critérios foram baseados em um mínimo de dois íons *m/z* para cada analito, tempo de retenção esperado (RT), altura do pico e erro de massa. O tempo de retenção foi considerado com uma janela de RT de 15 s. Para a altura do pico, foi considerado um mínimo de 70% da altura observada para o nível mais baixo no padrão. Todos os cromatogramas de íons extraídos tiveram sua massa exata com um erro de massa máximo de 5 mDa. A identidade de cada composto foi confirmada pelo monitoramento dos dois fragmentos mais intensos gerados pelo íon molecular. Os fragmentos monitorados para cada analito incluído no método de triagem é mostrada nas Tabelas II e III em ANEXO.

A seletividade foi avaliada em amostras contendo todos os compostos. O HRMS é uma técnica de alta seletividade [80]. O uso de LC-QTOF-MS associado aos critérios adotados para a identificação do pico permitiu a seletividade do método muito

satisfatório. A análise por LC-QTOF-MS mostra alta especificidade, permitindo a identificação de substâncias através da caracterização da massa exata dos analitos de interesse com quatro dígitos decimais considerando um erro de no máximo 5 ppm. Os principais parâmetros obtidos com QTOF foram precisão de massa, tempo de retenção, fórmula empírica, distribuição isotópica e massas dos fragmentos e sua composição elementar. A combinação desses fatores explica a potencial aceitação dos sistemas QTOF como ferramentas de triagem. Na Figura 6, são apresentados exemplos de dois isômeros de massa (sulfadoxina e sulfadimetoxina). Ambos os analitos têm a mesma massa exata (311,081403 Da). Além disso, como todas as sulfonamidas, o seu perfil de fragmentação mostra características íons m/z (156,011375 e 108,04439 Da). Assim, o tempo de retenção e fragmentos menores foram utilizados para a resolução desses dois analitos. A presença dos fragmentos 245,1 e 139,9 são específicas para a sulfadoxina e podem ser observadas no MS2 desta sulfonamida na Figura 2. Além disso, considerando o logP de ambas as sulfonamidas, era esperado que a sulfadoxina (logP 0,58) eluisse primeiro a sulfadimetoxina (logP 1,26) numa coluna fenil (Figura 6).

A validação qualitativa para análise de fármacos e pesticidas em águas foi realizada em efluentes de águas residuais (EF) e águas superficiais (AS), em três níveis de concentração. Os resultados estão mostrados na Tabela 1.

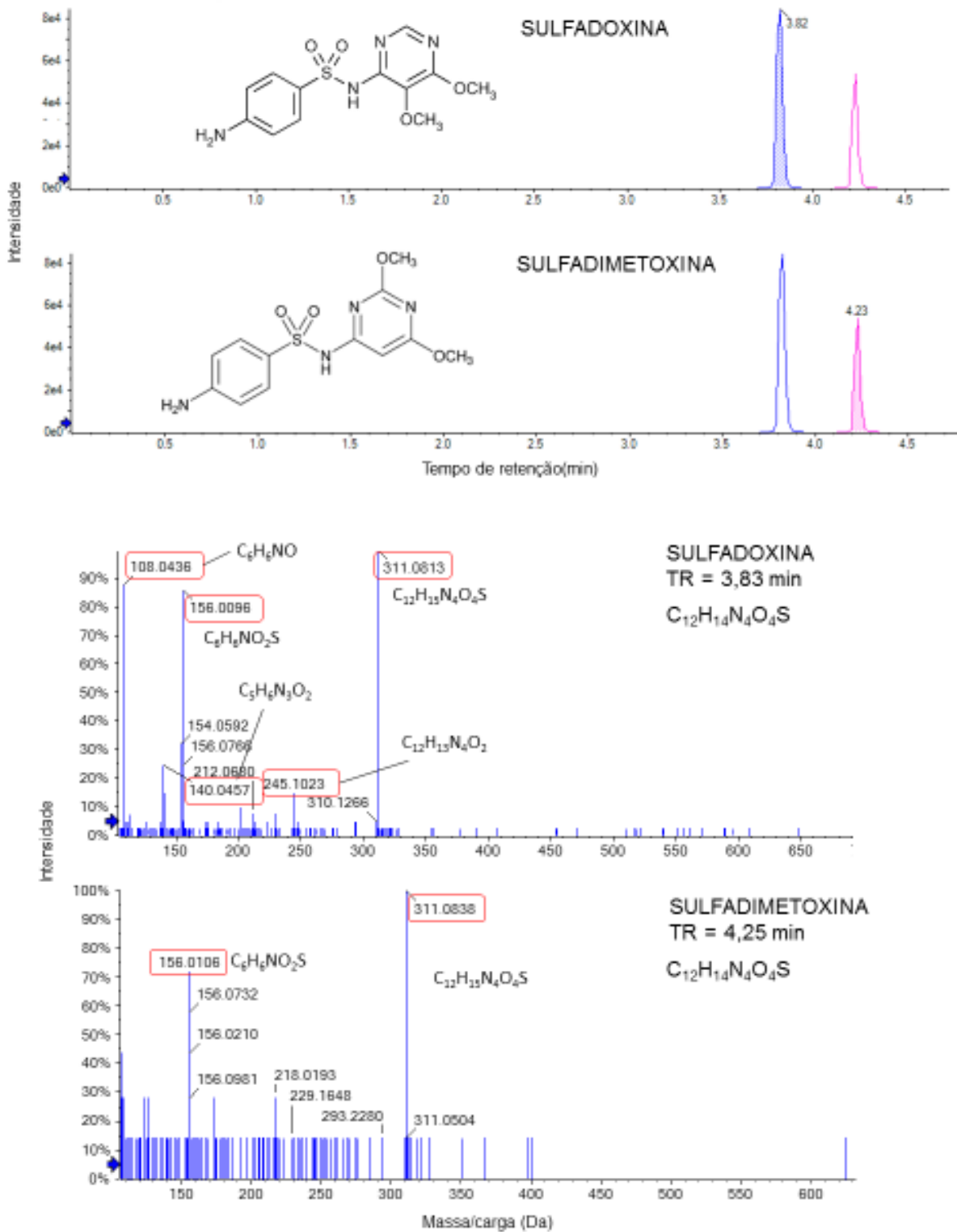


Figura 6. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) (acima) e MS2 com fórmula molecular (abaixo) para os isômeros de massa sulfadoxina e sulfadimethoxina.

Fonte: a autora.

Tabela 1. Resultados do método de triagem em águas superficiais e águas residuais de efluentes. Os círculos em branco representam amostras não detectadas. Os círculos escuros representam uma amostra detectada. Para cada combinação composto / matriz, o limite de detecção de triagem (SDL) é o nível mais baixo, com todas as amostras detectadas corretamente.

| Análito\Concentração (ng mL ⁻¹) | RT | Água superficial | | | Efluente | | | SDL (ng mL ⁻¹) | |
|--|-----|------------------|------|------|----------|------|------|----------------------------|------|
| | | 0,01 | 0,1 | 1,0 | 0,01 | 0,1 | 1,0 | AS | EF |
| FÁRMACOS | | | | | | | | | |
| Acebutolol | 1,7 | ●●●○ | ●●●● | ●●●● | ○○○ | ●●●● | ●●●● | 0,1 | 0,1 |
| Acepromazina | 2,5 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●○○ | 1,0 | |
| Amlodipino | 2,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Amoxicilina | 0,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Ampicilina | 1,3 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Amprolium | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Atenolol | 0,8 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Azaperol | 1,6 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Azitromicina | 2,1 | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Betametasona | 2,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ○○○ | 1,0 | 0,1 |
| Betaxolol | 2,3 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Bisoprolol | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Bromexina | 2,6 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Cafeína | 1,3 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Captopril | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Carazolol | 2,1 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Carprofen | 3,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Carvedilol | 2,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Cefalônio | 1,5 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Cefapirina | 1,5 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Cefoperazona | 1,2 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Cefquinoma | 1,5 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Ceftiofur | 2,1 | ●●● | ●●● | ●●● | ●○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Cefalexina | 2,3 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,1 |
| Clorpromazina | 2,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 0,1 | |
| Clortetraciclina | 2,0 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Ciprofloxacino | 1,6 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | 1,0 | 0,01 |
| Clindamicina | 2,0 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Clopidol | 1,1 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Cloxacilina | 3,2 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Danofloxacino | 1,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Decoquinato | 4,3 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●○○ | 0,1 | |
| Dexametasona | 2,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ○○○ | 1,0 | 0,1 |
| Diaveridina | 1,3 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Diclazuril | 4,0 | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Diclofenaco | 3,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Dicloxacilina | 3,4 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Difloxacino | 1,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Dipirona | 2,1 | ○○○ | ○○○ | ●○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Doxitetraciclina | 1,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Enrofloxacino | 1,8 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Eritromicina | 2,4 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,01 |
| Florfenicol amina | 2,1 | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Flumequina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Flunixinina | 2,8 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Hidroclorotiazida | 1,3 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Indometacina | 3,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Cetoprofeno | 3,1 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Labetalol | 2,1 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 0,01 | |
| Lasalocid sódio | 5,1 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Lidocaína | 1,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Lincomicina | 1,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Maduramicina amônio | 5,1 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ácido mefenâmico | 3,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Meloxicam | 3,1 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Metoprolol | 1,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Miconazol | 3,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●○○ | 0,01 | |
| Monensina sódio | 4,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Nadolol | 1,4 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Nafcilina | 3,4 | ○○○ | ○○○ | ●●○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ácido nalidíxico | 2,6 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Naproxeno | 3,2 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Narasina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Nebivolol | 2,8 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Nimesulida | 3,6 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Norfloxacinó | 1,5 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Oxacilina | 3,0 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Ácido oxolínico | 2,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Oxitetraciclina | 1,6 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Paracetamol | 0,8 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,01 | 1,0 |
| Penbutolol | 2,8 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Penicilina G | 2,6 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Penicilina V | 2,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●○○ | 1,0 | |
| Fenilbutazona | 3,5 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Pindolol | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Piroxicam | 2,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Prednisolona | 2,4 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | 1,0 | 0,01 |
| Prednisona | 2,4 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | 0,1 | 0,01 |
| Propranolol | 2,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Propifenazona | 2,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Robenidina | 3,1 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Salinomicina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Sarafloxacinó | 1,9 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Semduramicina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Sotalol | 0,8 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Espiramicina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Sulfaclopiridazina | 2,0 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Sulfadiazina | 1,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Sulfadimetoxina | 2,3 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Sulfadoxina | 2,0 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Sulfamerazina | 1,4 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Sulfametazina | 1,6 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Sulfametoxazol | 2,0 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Sulfaquinoxalina | 2,4 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Sulfatiazol | 1,4 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Tetraciclina | 1,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Tilmicosina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Tolclazuril | 4,0 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Ácido tolfenâmico | 4,0 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Triamcinolona acetónida | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Trimetoprim | 1,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Tilosina | 1,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |

| Xilazina | 1,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| PESTICIDAS | | | | | | | | | |
| 4,4'-DDE | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Acefato | 0,8 | ○○○ | ○○○ | ●○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Acetamiprida | 2,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Alaclor | 3,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Aldicarb sulfona | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Aldrin | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Aletrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Alfa-cipermetrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Alfa-cipermetrina NH4+ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Amitraz | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Azinfós etil | 4,0 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Azinfós metil | 3,5 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Azoxistrobina | 3,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Barban | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Benfuracarbe | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Benomil | 1,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Bentazona | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Bifentrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Bioaletrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Bitertanol | 3,8 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Boscalid | 3,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Bromopropilato | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Bromuconazol | 3,6 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Bupirimato | 3,2 | ●○○ | ●●● | ●●● | ●○○ | ●●○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Captafol | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Captan | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Carbaril | 2,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Carbendazim | 1,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Carbofuran | 2,7 | ●●○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Carbofention | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Carbosulfan | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Clorbromuron | 3,5 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,1 |
| Clorfenvinfós | 4,0 | ●○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Clorimuron | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Clorotalonil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Clorpirifós | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Clorpirifós metil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ciazofamid | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ciflutrin | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ciflutrin NH4+ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Cimoxanil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Cipermetrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Ciproconazol | 3,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Deltametrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Desmedifam | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Diazinon | 4,0 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Diclofluamid NH4+ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Dicloran | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Diclorvós | 2,5 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Dicofol | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Dicrotofós | 1,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Difenoconazol | 4,1 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●○○ | 1,0 | |
| Diflubenzuron | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Dimetoato | 2,1 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |

| | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Dimetomorfe | 3,5 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,1 |
| Dimoxistrobina | 3,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Disulfoton | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Disulfoton sulfona | 3,4 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ●○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Disulfoton sulfóxido | 3,0 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Diuron | 3,0 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Dodemorfe | 3,0 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Epoxiconazol | 3,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Esfenvalerato | 3,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Esfenvalerato NH ₄ ⁺ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Etiocarb sulfona | 2,3 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Etiofencarb sulfóxido | 1,9 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Etion | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Etiprole | 3,5 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Etimol | 1,9 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Etoprofós | 3,5 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Etrinofs | 4,0 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Famoxadona | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fenamifós | 3,5 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Fenamifós sulfona | 2,8 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Fenarimol | 3,5 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Fenitrotiona | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fenobucarb | 3,3 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,01 | 1,0 |
| Fenpropatrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fention | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fenvalerato | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fipronil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fluazifop butil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Flufenacet | 3,9 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Flufenoxuron | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Fluroxipir | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Flusilazol | 3,8 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Flutriafol | 3,0 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Folpet | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Folpet NH ₄ ⁺ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Foramsulfuron | 2,7 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Fostiazato | 2,9 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Furatiocarb | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Hexaconazol | 3,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Hexitiazox | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Imazalil | 2,8 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Imazapic | 2,0 | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Imazapir | 1,7 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,01 |
| Imibenconazol | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Imidacloprido | 2,1 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,01 |
| Iprobenfós | 3,7 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,1 |
| Iprodiona | 3,9 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Iprovalicarb | 3,5 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 0,1 | 1,0 |
| Isocarbofós | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Isoproturon | 2,9 | ●●● | ●●● | ●●● | ●○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Kresoxim metil | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Lambda cialotrina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Lambda cialotrina NH ₄ ⁺ | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Linurom | 3,4 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Malaoxon | 2,7 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Malation | 3,8 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |

| | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Piraclostrobina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Pirazofós | 4,2 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ○○○ | 1,0 | |
| Piridaben | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Pirifenox | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Piriproxifen | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Simazina | 2,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Tebuconazol | 3,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Tebufenpirad | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Terbufóos | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Tetradifon | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Tiabendazol | 1,4 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Tiacloprido | 2,5 | ●●● | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,1 |
| Tiametoxam | 1,8 | ●●○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Tifensulfuron metil | 2,8 | ●●○ | ●●● | ●●● | ●○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Tiobencarb | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Tiodicarb | 2,9 | ●○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●○○ | ●●○ | 0,1 | |
| Tiofanato metil | 2,8 | ○○○ | ○○○ | ●●● | ○○○ | ○○○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Triadimefon | 3,6 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Triadimenol | 3,4 | ○○○ | ●○○ | ●●● | ○○○ | ●●○ | ●●● | 1,0 | 1,0 |
| Triasulfuron | 3,0 | ●●○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Triazofós | 3,8 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Triclorfon | 1,8 | ○○○ | ●●● | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 0,1 | 0,1 |
| Triciclazol | 2,2 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Tridemorfe | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Trifloxistrobina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Trifloxisulfuron | 3,1 | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | ●●● | 0,01 | 0,01 |
| Triflumuron | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Trifluralina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Triforina | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |
| Trinexapac etil | 3,2 | ○○○ | ●●○ | ●●● | ○○○ | ●●● | ●●● | 1,0 | 0,1 |
| Trifenilfosfato | | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | ○○○ | | |

SDL: limite de detecção de triagem; RT: tempo de retenção; AS: água superficial; EF: efluente.

Fonte: a autora

Vários analitos não foram detectados em qualquer matriz em qualquer nível. Alguns compostos foram detectados em apenas um nível de concentração e a maioria dos analitos foi corretamente detectada em ambos os níveis de concentração.

A possível razão para a detecção malsucedida de alguns compostos tem várias causas. Alguns analitos não podem ser retidos na etapa SPE, eluindo junto com a amostra. Outros analitos podem ser corretamente concentrados no processo SPE, mas as condições cromatográficas não foram adequadas para suas características intrínsecas. Um analito pode ser mantido e concentrado no cartucho SPE e resolvido adequadamente na separação cromatográfica, mas o método não pode ser suficientemente sensível para permitir sua detecção nas condições aplicadas. Assim, o método final é um compromisso entre sensibilidade e amplo alcance. No entanto,

modificações como aditivos de fase móvel ou ajustes de pH no processo SPE podem levar a mudanças drásticas na resposta de outros analitos, que anteriormente foram bem resolvidos e detectados corretamente.

O SDL foi determinado para a maioria dos compostos avaliados. Para fins de confirmação, a identidade de pico foi confirmada usando dois fragmentos de m/z .

Dos 103 fármacos e 198 pesticidas utilizados avaliados, 198 analitos foram considerados como validados (65,9%) para águas superficiais e a detecção foi bem-sucedida para 170 compostos (56,5%) em águas residuais de efluentes.

Nas águas superficiais, dos 301 contaminantes emergentes analisados, 34,2% dos compostos não foram detectados corretamente em nenhum nível. O SDL foi distribuído da seguinte forma: 68 analitos foram detectados corretamente em $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ (22,6%), 65 analitos em $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ (21,6%) e 65 compostos em $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ (21,6%). Para as águas residuais de efluentes, um tipo de amostra mais complexa, a detecção não foi alcançada para 43,5% dos CEs. Os SDL foram estabelecidos como segue: 60 analitos a $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ (19,9%), 56 analitos em $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ (18,6%) e 54 compostos em $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ (17,9%). Esta falta de capacidade provavelmente está relacionada a interferentes da matriz, que são relativamente intensos em amostras de efluentes de águas residuais e requer estudos específicos de classe ou mesmo para compensar ou minimizar o impacto dos interferentes.

4.2. *Monitoramento ambiental*

4.2.1. Arroio Dilúvio

Dos 198 compostos validados em água superficial, 33 foram identificados nas amostras do Arroio Dilúvio do decorrer dos dois anos de monitoramento, sendo 20 fármacos e 13 pesticidas.

Os resultados mostram a continuada incidência de resíduos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos e antitérmicos, a citar: ácido mefenâmico, diclofenaco, naproxeno e paracetamol; fármacos β -bloqueadores: atenolol, propranolol, metoprolol e sotalol; os corticoides: prednisona e prednisolona; e os

antimicrobianos: ampicilina, cefalexina, ciprofloxacino, norfloxacino, clindamicina, sulfadiazina, sulfametoxazol e trimetoprim. Além desses, foram encontrados também a cafeína e o anestésico lidocaína.

Os anti-inflamatórios, analgésicos e antitérmicos, anestésicos e antipiréticos são medicamentos utilizados para o controle de inflamação, estados febris e dor. Estão entre as classes mais consumidas pela população, principalmente, pela grande maioria destes, serem de venda livre, ou seja, sem controle através de receituário médico. Os medicamentos destas classes que apresentam maior incidência e concentração são o ácido mefenâmico, naproxeno e paracetamol.

Os beta-bloqueadores são medicamentos utilizados no tratamento da hipertensão e de arritmias cardíacas. Dentre estes, encontram-se o atenolol, o metoprolol e o propranolol, os quais foram encontrados em todos os pontos de coleta.

A cafeína merece atenção especial, não apenas pela sua persistência já bem caracterizada, mas também por ser utilizada como marcador antropogênico, ou seja, sua presença indica atividade humana. As quantidades elevadas e constantes da cafeína em todos os pontos de coleta podem ser um indicativo do amplo uso pela população, estando presentes em diversas bebidas, alimentos e formulações farmacêuticas.

Muitos fármacos, por serem compostos relativamente polares, não são eliminados pelos processos convencionais de tratamento de esgotos. Desta forma, os fármacos, seus metabólitos e produtos de transformação podem entrar no ambiente aquático e, eventualmente, chegar à água potável. A presença destes compostos, também sofre influência dos íons presentes na água, que podem atuar na alteração do pH, como sensibilizadores (nos processos de degradação pela luz do sol, como é o caso no nitrato), formação de adutos, disponibilidade aos microrganismos, entre outros.

Dos pesticidas avaliados, foram detectados: azoxitrombina, carbendazim, ciproconazol, DEET, diuron, esfenvalerato, imazapir, imidacloprido, propiconazol, tebuconazol e triciclazole. A presença dos pesticidas pode ser devido às plantações de alimentos como arroz e em frutas nas proximidades.

Os dados de áreas de todas as análises estão na Tabela IV em ANEXO I.

As análises físico-químicas complementares foram realizadas a fim de observar a ocorrência ou não de variações no perfil das amostras. A Tabela V em ANEXO I apresenta os resultados das análises. De maneira geral, pH, alcalinidade e condutividade aumenta do ponto 1 ao ponto 6. A turbidez teve bastante variação entre os pontos e os meses de coleta, possivelmente devido a condições intrínsecas como volume d'água, material particulado, fluxo d'água e etc no momento da coleta.

A Figura 7 mostra os cromatogramas de íons extraídos e o seu correspondente espectro MS2 para alguns analitos detectados em amostras reais.

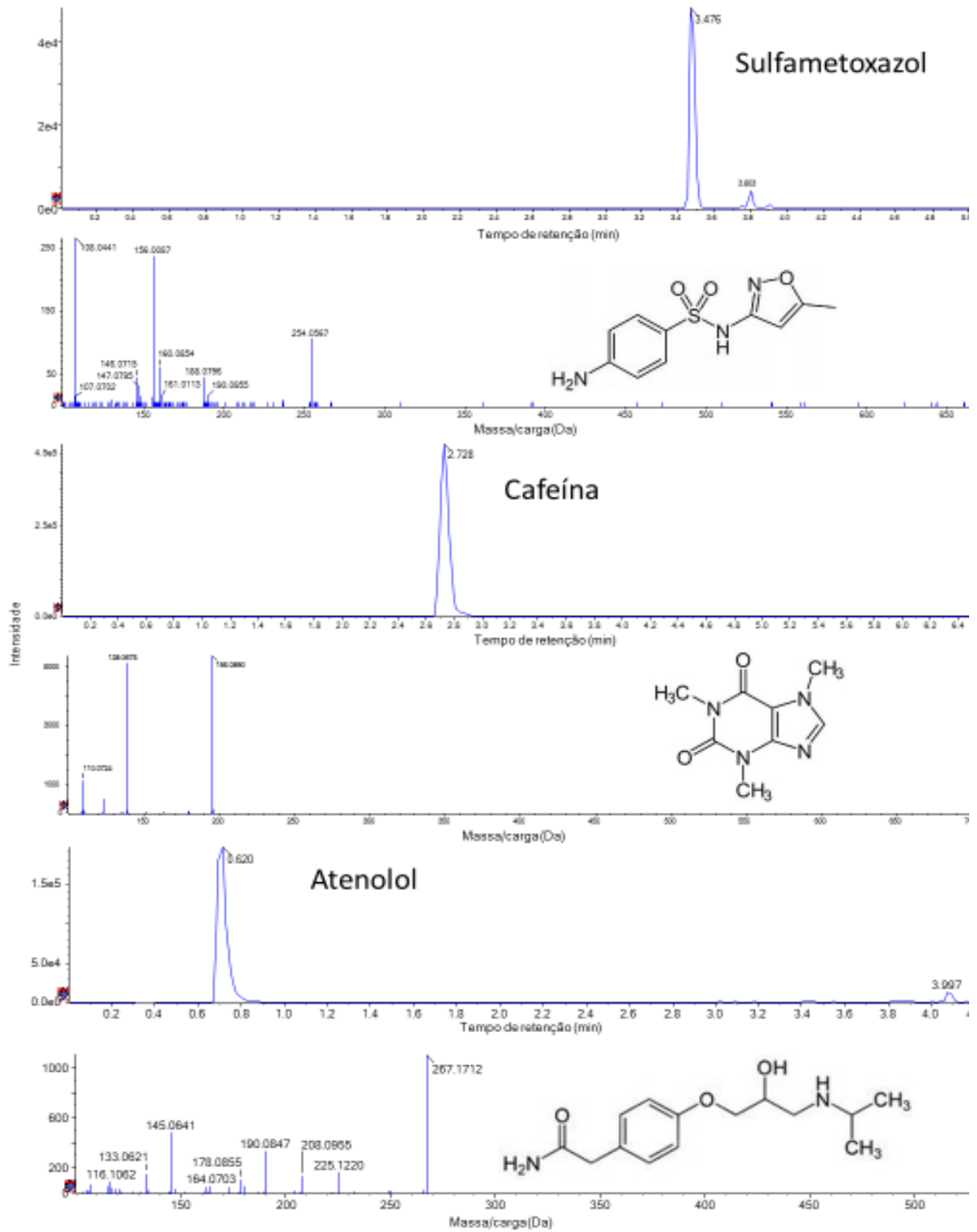


Figura 7. Cromatogramas de íons extraídos (XIC) e espectro MS2 de sulfametoxazol, cafeína e atenolol. Fonte: a autora.

Devido a grande quantidade de dados gerados e a fim de avaliar as variáveis espaciais e temporais permitindo assim visualização e interpretação das informações contidas no conjunto de dados, utilizamos o modelo de Tucker3 para análise multidimensional.

Com base na estratégia descrita no item 3.3.8 de Materiais e Métodos, o número de fatores selecionados foi de $5 \times 4 \times 3$ para os modos compostos, meses e pontos de coleta, respectivamente, explicando 98% da variância do conjunto de dados.

Para a construção do modelo, optou-se por retirar a cafeína da lista dos compostos identificados, uma vez que a sua fonte majoritária é a alimentação e não formulações farmacêuticas. Além disso, como está presente em todas as amostras do estudo, ao aplicar o modelo, ela mascara a contribuição dos fármacos e pesticidas.

De acordo com o gráfico da Figura 8 (peso no modo compostos), o modelo sugere que os compostos que exibem maior contribuição do perfil de contaminantes presentes do Arroio Dilúvio foram: fator 1 (atenolol, paracetamol, DEET), fator 2 (atenolol, paracetamol, imazapir), fator 3 (lidocaína, metoprolol, paracetamol), fator 4 (lidocaína, metoprolol, paracetamol, imazapir) e fator 5 (lidocaína, metoprolol, paracetamol). O imazapir e o DEET são pesticidas e os demais são fármacos. Com exceção do imazapir, todos os outros são identificados na grande maioria das amostras analisadas.

| nº | composto | nº | composto |
|----|----------------|----|----------------|
| 1 | ác. mefenâmico | 17 | sulfadiazina |
| 2 | ampicilina | 18 | sulfametoxazol |
| 3 | atenolol | 19 | trimetoprim |
| 4 | cefalexina | 20 | azoxitrombina |
| 5 | ciprofloxacino | 21 | benomil |
| 6 | clindamicina | 22 | carbendazim |
| 7 | diclofenaco | 23 | ciproconazol |
| 8 | lidocaína | 24 | DEET |
| 9 | metoprolol | 25 | diuron |
| 10 | naproxeno | 26 | imazapic |
| 11 | norfloxacino | 27 | esfenvalerato |
| 12 | paracetamol | 28 | imazapir |
| 13 | propranolol | 29 | imidacloprido |
| 14 | prednisolona | 30 | propiconazol |
| 15 | prednisona | 31 | tebuconazol |
| 16 | sotalol | 32 | triciclazole |

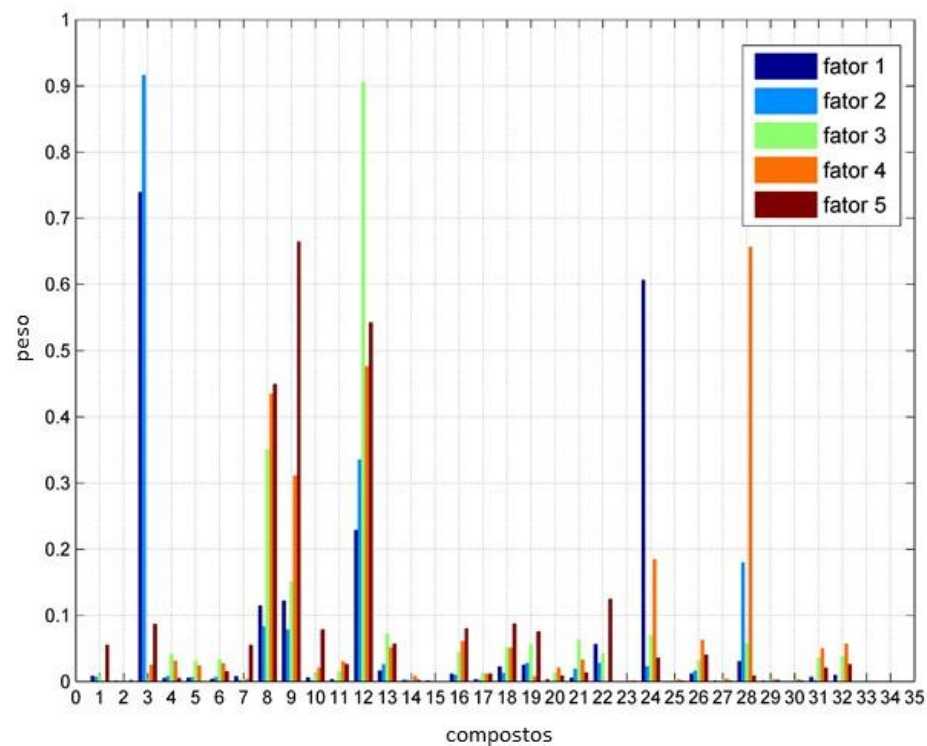


Figura 8. Pesos do modelo Tucker no modo “compostos identificados”. Os compostos no eixo X são representados por números, conforme a Tabela a esquerda.

No modo correspondente aos meses de coletas foram extraídos, via modelo Tucker, 4 fatores que retratam a sazonalidade, este resultado está na Figura 9.

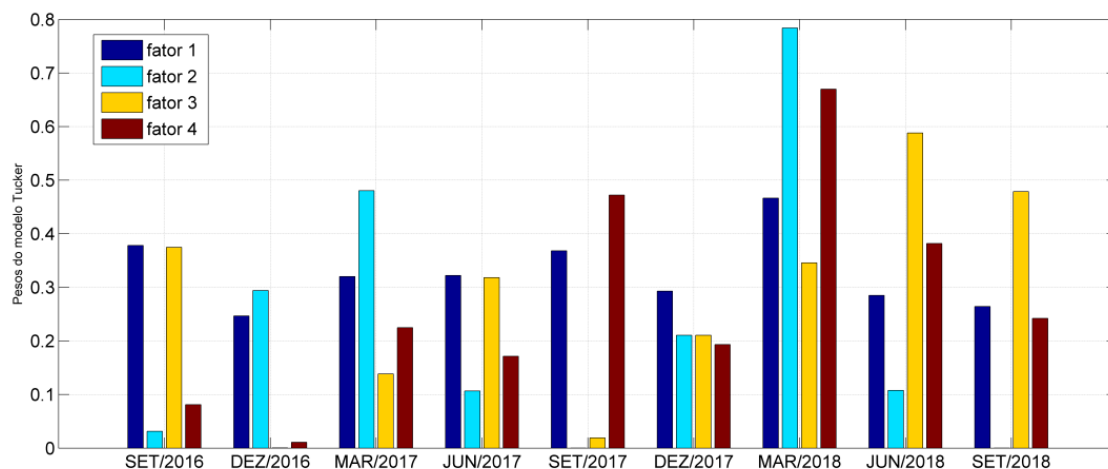


Figura 9. Pesos do modelo Tucker no modo “meses de coleta”.

Já para o modo “pontos de coleta”, três fatores foram indicados com suficientes pela estratégia adotada para seleção do número de fatores (Figura 10).

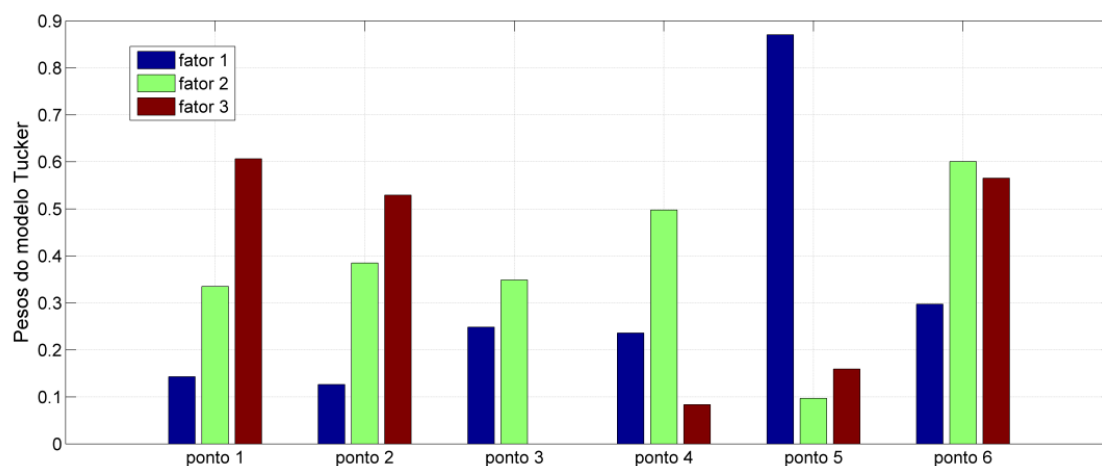


Figura 10. Pesos do modelo Tucker no modo “pontos de coleta”.

A inspeção dos valores do tensor G , mostrou que a tríade mais significativa para o modelo corresponde à combinação 1 x 1 x 2. Isto permitiu obter um mapa de distribuição espacial dos compostos estudados em função das estações do ano e pontos de coleta, Figura 11.

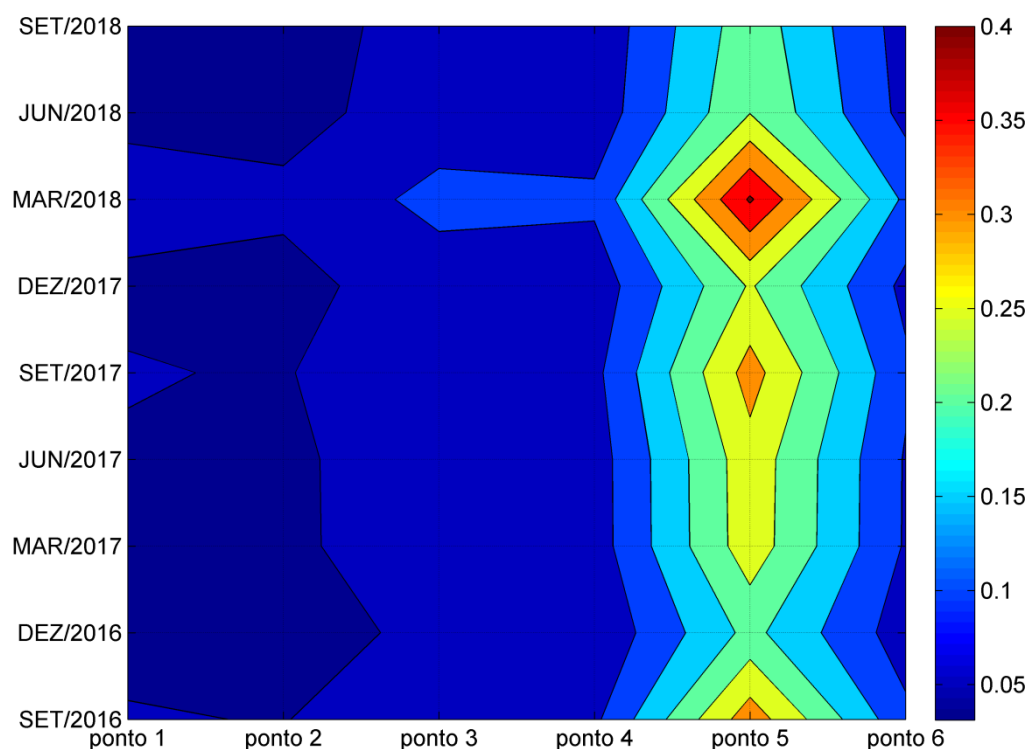


Figura 11. Mapa de distribuição dos compostos obtidos pelo modelo Tucker, espacial e temporal.

Observou-se um aumento gradual na concentração de compostos do ponto 1 para o ponto 6, tendo seu pico sempre no ponto 5. O ponto 5 está localizado numa região de maior concentração populacional e no entorno estão localizados vários hospitais de grande porte. Na amostragem do mês de março de 2018 observou-se maior concentração em todos os pontos de coleta, quando comparados aos demais meses. A presença constante de fármacos no Arroio Dilúvio ao longo dos 2 anos de monitoramento demonstra que a questão relativa ao saneamento urbano é deficitária, uma vez que uma das origens destes compostos são os efluentes domésticos. Além de poderem ser oriundos de efluentes domésticos *in natura*, também podem ser devido ao descarte inadequado de medicamentos, lixiviação de natureza desconhecida e efluente hospitalar.

Dentre os compostos, aqueles que tiveram maior contribuição no modelo foram o atenolol e o paracetamol. O atenolol pode estar relacionado ao fato dele ser distribuído gratuitamente pelo programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde (<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/16/Lista->

medicamentos-geral.pdf), ter baixo custo, não precisar de receita médica, o que também leva a crer que a hipertensão é um mal estabelecido na população da região de Porto Alegre. Observa-se pouca variação com relação à incidência deste fármaco, provavelmente por ser de uso contínuo. O paracetamol é um dos medicamentos mais consumidos mundialmente, está presente na maioria das amostras, contribuindo com todos os fatores estatísticos avaliados.

4.2.2. Rio dos Sinos e Rio Gravataí

Foram selecionados um ponto de coleta no rio dos Sinos e um ponto no rio Gravataí para serem monitorados quanto à presença de CEs no período de dois anos, de dezembro de 2016 a setembro de 2018. Muitos dos fármacos e pesticidas encontrados no Arroio Dilúvio, também foram detectados nos dois rios.

Os principais usos da água da bacia do rio dos Sinos estão destinados ao abastecimento público, uso industrial e irrigação. As áreas mais conservadas encontram-se a montante da bacia. O grande problema encontrado é o despejo de efluentes industriais e principalmente domésticos sem tratamento nos cursos de água no seu trecho médio-baixo. Em relação ao rio Gravataí, os principais usos da água são abastecimento público, diluição de esgotos domésticos e efluentes industriais e irrigação de lavouras de arroz, o que justifica a detecção de vários fármacos e pesticidas em ambos os rios [45].

A detecção de diversos pesticidas merece atenção especial. Ambos os rios se encontram em regiões de alta produção agrícola. As Tabelas 2 e 3 apresentam os CEs identificados nos rios dos Sinos e Gravataí, respectivamente, nos 8 meses de campanha.

Tabela 2. CEs identificados no rio dos Sinos nos meses de amostragem.

| Composto | Rio do Sinos | | | | | | | |
|----------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | dez/16 | mar/17 | jun/17 | set/17 | dez/17 | mar/18 | jun/18 | set/18 |
| Atenolol | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Cafeína | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Cefalexina | | | | | | ● | ● | |
| Diclofenaco | ● | | | | | ● | ● | |
| Lidocaína | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | |
| Metoprolol | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Naproxeno | ● | | | | | | | |
| Norfloxacino | | ● | | | | | | |
| Paracetamol | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Propranolol | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● |
| Sulfadiazina | | | | | | ● | ● | |
| Sulfametoxazol | | ● | ● | | | ● | ● | ● |
| Trimetoprim | ● | | ● | | | ● | | |
| Azoxitrombina | | ● | | | | ● | | |
| Carbendazim | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Ciproconazol | | | | | | | | |
| DEET | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Diuron | ● | | ● | ● | ● | ● | ● | |
| Esfenvalerato | | | | | | | | |
| Imazapir | | | ● | | | | | |
| Imidacloprido | | | | | | ● | | |
| Propiconazol | | | | | | ● | | |
| Tebuconazol | ● | ● | | | | ● | ● | |
| Tiametoxan | | | | | ● | ● | | |
| Triciclazole | ● | ● | | | | ● | ● | ● |

Tabela 3. CEs identificados no rio Gravataí nos meses de amostragem.

| Composto | Rio Gravataí | | | | | | | |
|----------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | dez/16 | mar/17 | jun/17 | set/17 | dez/17 | mar/18 | jun/18 | set/18 |
| Atenolol | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Cafeína | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Cefalexina | ● | | | | | ● | ● | |
| Ciprofloxacino | | | ● | | | | | |
| Diclofenaco | ● | ● | | | | ● | ● | |
| Lidocaína | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Metoprolol | ● | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Naproxeno | ● | | | | | | | |
| Norfloxacino | | | ● | | | | | |
| Paracetamol | | ● | ● | | ● | ● | ● | ● |
| Propranolol | ● | ● | ● | | | ● | ● | ● |
| Sulfadiazina | | | | | | ● | | ● |
| Sulfametoxazol | | ● | ● | | | ● | ● | ● |
| Trimetoprim | ● | | | | | | | ● |
| Azoxitrombina | | ● | | | | ● | ● | ● |
| Carbendazim | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Ciproconazol | | ● | | | | | | |
| DEET | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Diuron | ● | | ● | | | ● | ● | ● |
| Esfenvalerato | | | | | | ● | ● | |
| Imazapir | | | | | ● | | | |
| Imidacloprido | | ● | | | | ● | | |
| Propiconazol | | | | | ● | ● | | ● |
| Tebuconazol | ● | ● | | | ● | ● | ● | ● |

| | | | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tiametoxan | | | | | | ● | | |
| Triciclazole | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |

Fonte: a autora.

O Rio Grande do Sul ocupa posição estratégica para a oferta nacional de diversos produtos agrícolas, principalmente de arroz, trigo, aveia, e está entre os principais exportadores de fumo, soja e arroz. A agricultura está presente em praticamente todas as regiões do território gaúcho. Porém, é possível identificar algumas concentrações regionais. Na região metropolitana do estado destaca-se a plantação de arroz [86].

As lavouras temporárias de arroz são preparadas antes do plantio, com aplicação de pesticidas para dessecação da área e, quando necessário, para combater o invasor, podendo ser feitas misturas de dois ou mais pesticidas. O plantio de arroz inicia em setembro e vai até novembro, com peculiaridades regionais e climáticas, podendo se alongar até primeira quinzena de dezembro. No início da floração é feita aplicação de fungicidas, podendo ocorrer uma segunda aplicação, se necessário. Essa atividade demanda um elevado consumo de água, equivalente a 80% da água consumida no estado [87]. Dentre os pesticidas detectados no monitoramento, muitos são utilizados no plantio de arroz.

Embora os defensivos usados nas lavouras tenham um período de degradação, desde que usados em doses e períodos recomendados, pesticidas usados nos mananciais acabam atingindo as águas superficiais nas proximidades. A Tabela 4 apresenta os grupos químicos, classes, classificação toxicológica e principais usos agrícolas de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) dos pesticidas detectados nos rios [88].

Tabela 4. Classificação e utilização dos pesticidas encontrados nos rios dos Sinos e Gravataí.

| Composto | Grupo químico | Classe | Classificação toxicológica* | Principais usos agrícolas |
|---------------|----------------|----------------------|-----------------------------|---|
| Azoxitrombina | Estrobilurina | Fungicida | Classe III | arroz, frutas, legumes, café, cana, soja, milho, etc. |
| Carbendazim | Benzimidazol | Fungicida | Classe III | algodão, citros, feijão, milho, soja, trigo, etc. |
| Ciproconazol | Triazol | Fungicida | Classe III | arroz, algodão, aveia, café, frutas, soja, cana, cevada, etc. |
| Diuron | Ureia | Herbicida | Classe III | algodão, milho, trigo, frutas, café, etc. |
| Esfenvalerato | Piretróide | Inseticida biológico | Classe II | arroz, milho, trigo, soja, algodão, etc. |
| Imazapic | Imidazolinona | Herbicida | Classe II | arroz, cana, soja, milho, etc. |
| Imazapir | Imidazolinona | Herbicida | Classe I | arroz, cana, soja, milho, etc. |
| Imidacloprido | Neonicotinóide | Inseticida | Classe III | arroz, frutas, hortaliças, legumes, café, etc. |
| Propiconazol | Triazol | Fungicida | Classe II | arroz, aveia, algodão, café, cevada, soja, trigo, etc. |
| Tebuconazol | Triazol | Fungicida | Classe IV | arroz, trigo, cana, frutas, soja, hortaliças, etc. |
| Tiametoxan | Neonicotinóide | Inseticida | Classe III | arroz, frutas, hortaliças, legumes, café, etc. |
| Triciclazole | Benzotiazol | Fungicida | Classe II | arroz |

Fonte: ANVISA.

*De acordo com a ANVISA, a classificação toxicológica de um produto formulado é feita com base nos resultados dos estudos toxicológicos agudos realizados com a formulação pretendida, podendo estes ser classificados como:

CLASSE I – Produto Extremamente Tóxico

CLASSE II – Produto Altamente Tóxico

CLASSE III – Produto Moderadamente Tóxico

CLASSE IV – Produto Pouco Tóxico

Atualmente, as lavouras temporárias (inverno e verão) ocupam mais de nove milhões de hectares no RS. Cerca de 90% dessa área é voltada à produção de grãos (cereais e oleaginosas), que configura a principal atividade agrícola do Estado. A soja, o arroz, o milho e o trigo constituem as principais culturas agrícolas praticadas no RS em termos de área plantada e quantidade produzida [86].

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicados em setembro de 2018 sobre as estimativas para a safra de 2018, produção total de cereais, leguminosas e oleaginosas oriunda das lavouras temporárias de verão (amendoim, arroz, feijão 1ª e 2ª safras, girassol, milho grão, soja e sorgo grão), finalizada em julho de 2018, ficou em 30.603.948 toneladas em uma área estimada de 7.600.177 hectares [89].

Considerando que a produção agrícola está diretamente associada ao uso de pesticidas, e a contaminação ambiental por pesticidas ocorre tanto pontualmente como nas áreas adjacentes, podendo atingir até mesmo locais mais distantes do ponto de aplicação, sendo que os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir um suprimento de água, o que conduz o desenvolvimento dessa atividade próximo a rios e lagos [87], estudos de monitoramento se tornam de extrema importância a fim de avaliar o impacto ambiental causado por estes compostos.

4.3. *Identificação de compostos untarget*

O uso de HRMS permite a investigação de compostos não direcionados, que podem ser posteriormente confirmados e/ou quantificados usando um padrão analítico adequado. Por exemplo, usando os resultados das amostras reais de efluentes obtidas de uma ETE local, a busca de algumas drogas ilícitas e seus metabólitos mostra a presença de um composto com a massa exata intimamente relacionada ao metabólito da cocaína, a benzoilecgonina. Para fornecer evidências mais fortes para assumir a identidade do composto, foi realizada uma fragmentação, mostrando um espectro compatível com o padrão de fragmentação relatado para esta substância [63,74,90]. Além disso, a distribuição de isótopos experimental atende ao padrão de isótopos previsto (obtido usando a ferramenta (<http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm/>)). A busca do espectro de massa da

benzoilecgonina em um banco de dados (<http://www.massbank.jp/>) mostrou um padrão de fragmentação em LC-QTOF-MS em colisão de energia 20 eV muito semelhante aos nossos achados. Os fragmentos mais abundantes além do próprio íon molecular (m/z 168,1011, 150,0903 e 272,1279) encontrados no banco de dados atendem aos fragmentos m/z produzidos pela amostra: 168,1016, 150,0907 e 272,1286.

A Figura 12 mostra o cromatograma de íon extraído (XIC), espectro MS2 e padrão de distribuição isotópica da benzoilecgonina. Embora não existam evidências para declarar a sua presença nas amostras, os dados permitem presumir uma forte possibilidade de ocorrência desta molécula, o que pode ser confirmado com o uso de um padrão analítico adequado.

Outro composto *untarget* encontrado nas amostras foi o inseticida DEET, princípio ativo utilizado em repelentes aplicados diretamente sobre a pele. Ele foi identificado nas amostras dos 6 pontos do Arroio Dilúvio, e também nos rios do Sinos e Gravataí, em todas as campanhas. O grande uso do DEET pode ser atribuído à grande preocupação da população no que diz respeito ao combate do *Aedes aegypti*. A Figura 13 apresenta o cromatograma de íon extraído (XIC) do DEET (m/z 192, 1383), e o espectro MS2 no modo de aquisição *bbCID*. O padrão de fragmentação de MS/MS do DEET é bem conhecido: DEET (m/z 192,1383) facilmente forma o íon com m/z 119,0492. Embora ausência de padrão analítico para confirmação da identidade, considerando que o m/z 192,1383 aparece com bastante frequência nas amostras, com tempo de retenção sempre de 2,9 min e espectro de M2 conforme o teórico, DEET foi incluído com os demais CEs no monitoramento ambiental.

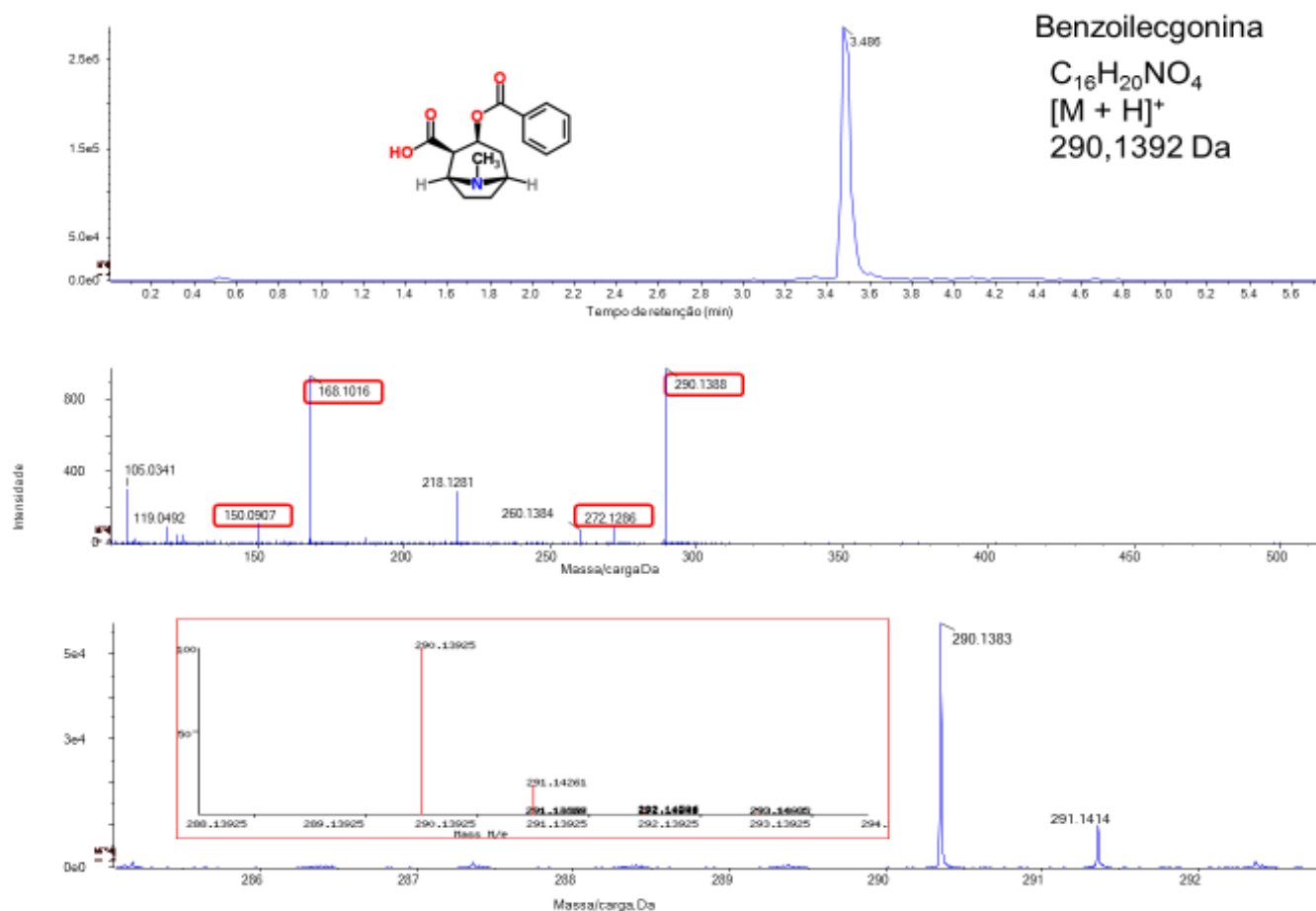


Figura 12. Cromatograma de íon extraído (XIC), espectro MS2 e padrão de distribuição isotópica (experimental vs. predito) de benzoilecgonina. O quadrado vermelho (baixo) é a distribuição de isótopos prevista. Fonte: a autora.

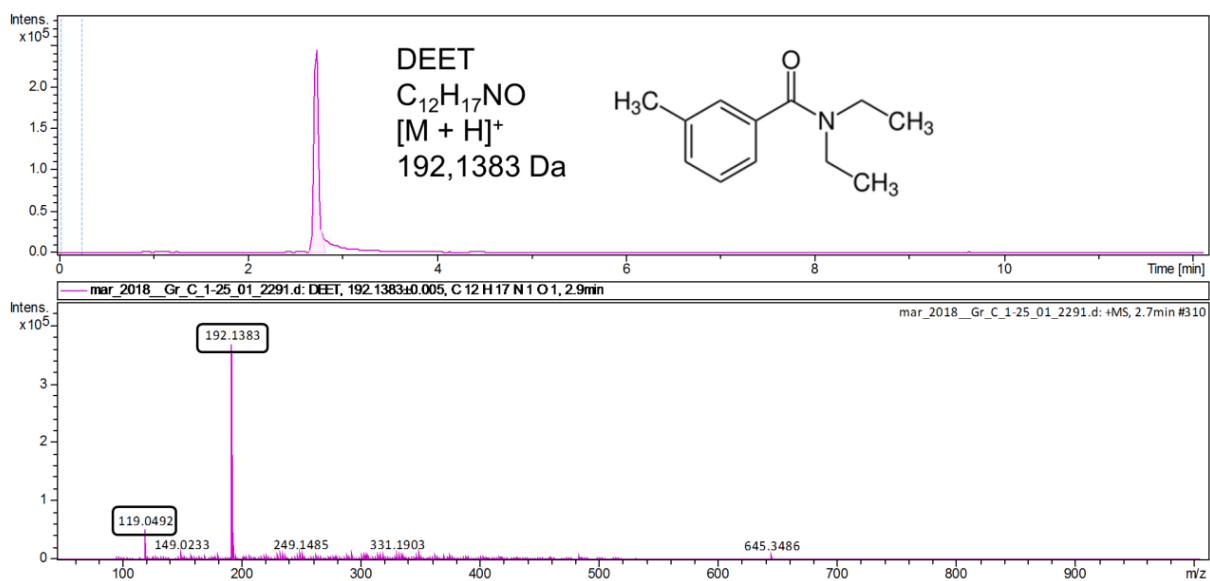


Figura 13. Cromatograma de íon extraído (XIC), espectro MS2 do DEET. Fonte: a autora.

4.4. *Avaliação da toxicidade aguda com o peixe Danio rerio*

Os dados apresentados na Tabela 5 resumem os resultados dos ensaios de toxicidade realizados com as amostras dos oito pontos de monitoramento aqui considerados. Baseado na prova exata de Fisher, não foi possível observar, após os ensaios com embriões por 96 horas de exposição, diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0.05$) entre as mortalidades observadas nas amostras avaliadas e aquelas observadas nos grupos controles. Após a extensão do ensaio por mais 96 h, agora na forma de larvas, também não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre a mortalidade observada no grupo controle e as amostras avaliadas segundo prova exata de Fisher.

Os dados apresentados na Tabela 6 resumem os resultados das três repetições dos ensaios de toxicidade realizados com a amostra da solução mix. Baseado na prova exata de Fisher não foi possível observar, após os ensaios com embriões por 96 horas de exposição, diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0.05$) entre os grupos controle e as repetições de cada ensaio. Apesar de não serem valores estatisticamente significativos, de 15% a 25% dos organismos apresentaram efeitos após a exposição à solução mix. A primeira exposição à solução mix resultou em uma mortalidade de 20% dos organismos. Já as repetições 2 e 3 apresentaram alterações morfológicas em 25% e 15% dos organismos, respectivamente. Os efeitos observados, apresentados na Figura 14 referem-se à formação de edemas pericardiais e má formação da coluna, efeitos que impediam ou dificultavam a livre natação das larvas. Após a extensão dos ensaios por mais 96 h, agora na forma de larvas, não houve alteração no número de organismos afetados. Não foram observadas alterações em nenhum dos organismos expostos aos grupos controles.

Tabela 5. Resumos dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda com embriões e larvas de *D. rerio* expostos por 96 horas e 192 horas pós-fertilização as diferentes amostras avaliadas nos meses de setembro/2017, dezembro de 2017 e março de 2018.

| Identificação da Amostra | N° de Expostos | N° de Organismos mortos | | | | | |
|--------------------------|----------------|-------------------------|---|----------|---|----------|---|
| | | Set/2017 | | Dez/2017 | | Mar/2018 | |
| | | E | L | E | L | E | L |
| Controle - | 20 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Ponto 1 | 20 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Ponto 2 | 20 | 6 | 6 | 0 | 1 | 4 | 4 |
| Ponto 3 | 20 | 7 | 7 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| Ponto 4 | 20 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Ponto 5 | 20 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Ponto 6 | 20 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Rio dos Sinos | 20 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Rio Gravataí | 20 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 |

E= resultados dos ensaios de toxicidade iniciados com embriões e expostos até 96 h pós-fertilização; L = resultados dos ensaios após a extensão da exposição até 192 h pós fertilização, na forma larvas. Os valores referem-se ao número de organismos mortos seguindo os critérios estabelecidos na OECD 236.

Fonte: a autora.

Tabela 6. Resumos dos resultados dos ensaios de toxicidade com embriões e larvas de *D. rerio* expostos por 96 horas e 192 horas pós-fertilização às soluções mix.

| Identificação da Amostra | N° de Expostos | N° de Organismos mortos | | | | | |
|--------------------------|----------------|-------------------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | Repetição 1 | | Repetição 2 | | Repetição 3 | |
| | | E | L | E | L | E | L |
| Controle | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Solução mix ¹ | 20 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Solução mix ² | 20 | 0 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |

E= resultados dos ensaios de toxicidade iniciados com embriões e expostos até 96 h pós-fertilização; L = resultados dos ensaios após a extensão da exposição até 192 h pós-fertilização, na forma larvas. 1 = os valores referem-se ao número de organismos mortos seguindo os critérios estabelecidos na OECD 236. 2 = os valores referem-se ao número de organismos com alterações morfológicas observadas.

Fonte: a autora.

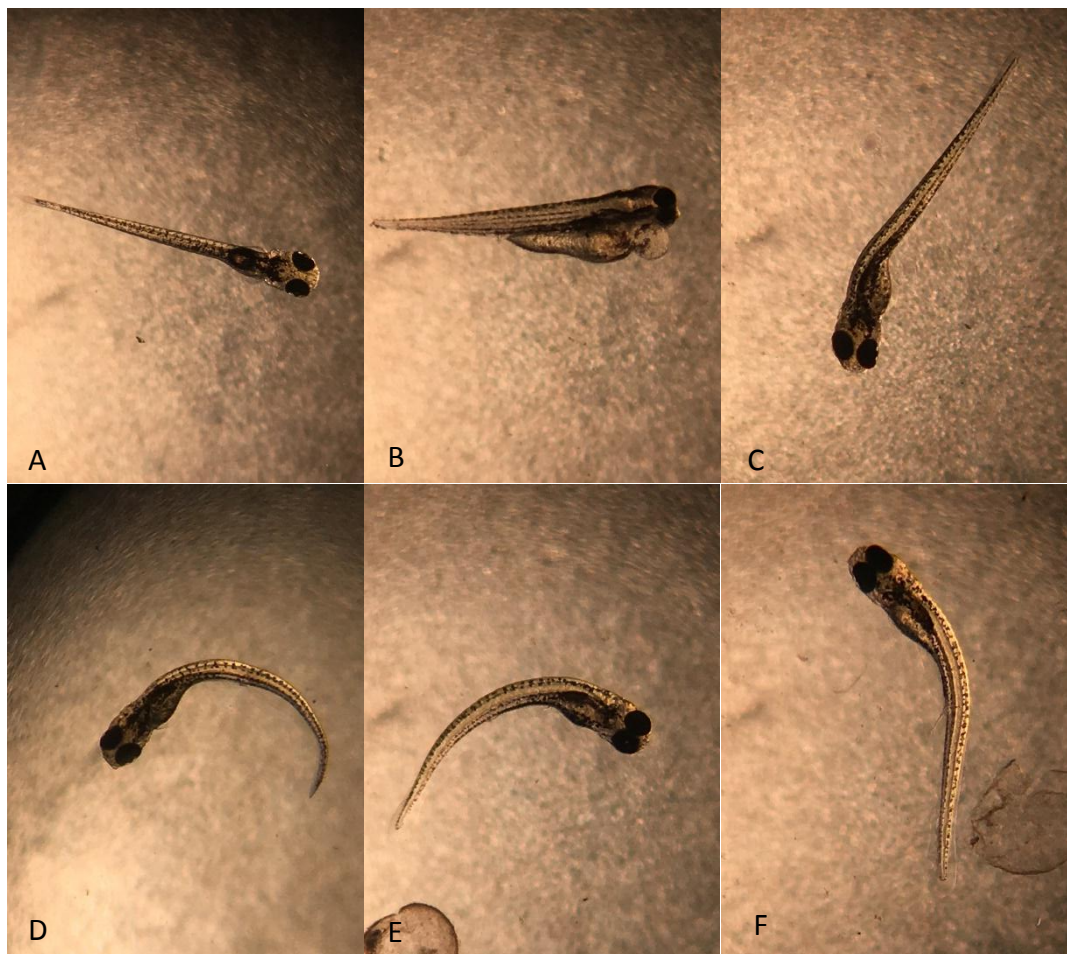


Figura 14. Exemplos de *D. rerio* eclodidos após exposição por 96 h ao grupo controle e a Solução mix (A) Organismo normal (Grupo controle); (B) Organismo com edema pericardial; (C a F) Organismos com má formação de coluna.

5. Conclusão

Um método qualitativo rápido e simples de triagem de amplo alcance para detecção de ECs em amostras aquosas por SPE-LC-QTOF-MS foi desenvolvido e validado. Amostras de água superficial e efluente urbano foram incluídas no estudo de validação. Mesmo no pior caso (EF), 170 compostos orgânicos, incluindo fármacos e pesticidas, foram detectados e validados. O uso de instrumentos LC-QTOF-MS permite a detecção e identificação de compostos com alta seletividade e especificidade, aliados com a massa exata para o íon molecular, pelo menos dois fragmentos foram considerados para estabelecer a identificação de um composto. Esses dados, associados a informações adicionais, como o tempo de retenção, permitem a identificação correta mesmo de isômeros de massa. A exploração de instrumentos

HMRS possibilitou também a detecção e identificação de compostos *untargets*, que não foram incluídos inicialmente no escopo.

A partir da metodologia qualitativa, foi realizado monitoramento na água do Arroio Dilúvio, no rio dos Sinos e no rio Gravataí, pelo período de dois anos com amostragem trimestral. A partir deste monitoramento, podemos identificar alguns parâmetros importantes. Observou-se uma variação temporal e espacial em relação aos compostos identificados. A grande influência do atenolol e do paracetamol permite inferir que a população de Porto Alegre apresenta problemas de hipertensão além do alto consumo de analgésico/antitérmico. A presença constante de antibióticos em todos os pontos levou ao estudo subsequente de avaliação de genes de resistência. A toxicidade avaliada não mostrou indícios da água do Dilúvio ser tóxica para *Danio Rerio* nas condições experimentais estabelecidas. A partir da utilização da metodologia *untarget*, foi possível identificar a presença de compostos como a benzoylcognina e DEET. A presença do DEET foi confirmada por *untarget* em todas as amostras analisadas.

CAPÍTULO II: Análise de antimicrobianos por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em tandem associado à análise de genes de resistência a antimicrobianos por Reação em Cadeia da Polimerase

A presença de antimicrobianos na água do Arroio Dilúvio já havia sido objeto de estudo anterior, portanto, neste trabalho, além destes compostos estarem no escopo da metodologia qualitativa, também foi desenvolvido e validado metodologia quantitativa. A partir dos dados obtidos no primeiro ano de monitoramento com relação à presença constante de antimicrobianos em todos os pontos de coleta, iniciou-se o trabalho de avaliação de genes de resistência nas amostras subsequentes.

1. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação e quantificação de 40 antibióticos, pertencentes às classes sulfonamidas, tetraciclina, (fluor)quinolonas, macrolídeos, lincosamidas e β -lactâmicos, em amostras de águas superficiais e de efluente em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando LC-MS/MS;
- Avaliar a expressão dos genes *blaTEM*, *ermB*, *qnrS* e *sull*, que conferem resistência a antibióticos das classes β -lactâmicos, macrolídeos, (fluor)quinolonas e sulfonamidas, respectivamente, através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras aquosas ambientais.
- Relacionar a concentração de antimicrobianos com a expressão de genes de resistência de antimicrobianos das bactérias presentes nesse meio aquático.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Antimicrobianos e desenvolvimento de genes de resistência a antimicrobianos*

O uso de antimicrobianos (ATBs) na medicina humana e veterinária é uma abordagem terapêutica bastante difundida. No entanto, poucos anos após a introdução das primeiras classes de antibióticos na década de 1950, começaram a surgir resistências bacterianas [91]. Atualmente, a ocorrência de novas bactérias multirresistentes tornou-se um fenômeno regular. Várias causas estão implicadas no desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRAs). O uso excessivo, uso indevido e tratamentos terapêuticos incompletos são os principais fatores geralmente relacionados com o surgimento de BRAs [92]. Outro fator é a eliminação

de ATBs via excreção urinária. Estes compostos podem ser eliminados na forma não alterada (medicamento original), na forma conjugada ou como metabólitos. Ambos podem ser convertidos em outros produtos de transformação através da ação de hidrólise, fotólise ou outros processos de degradação [93]. Não obstante, metabólitos e produtos de transformação também podem mostrar atividade antimicrobiana. Em outros casos, os seus metabólitos, uma vez liberados no meio ambiente, podem retornar à sua forma original, por meio de desacetilação, diidroxilação e outras reações similares [94,95]. A presença destes compostos em níveis de traços no ambiente é uma fonte de subdosagens terapêuticas de ATBs, que podem resultar no desenvolvimento de linhagens de BRAs [96].

A presença de BRAs e seus genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) tem sido relatada nos últimos anos em várias matrizes ambientais, tais como águas residuais, águas subterrâneas e arroios [97–100]. Sua presença em águas superficiais urbanas representa uma fonte potencial de exposição humana a linhagens de BRAs e seus GRAs associados. Uma vez presente no meio ambiente, a resistência a ATBs pode ser potencialmente transmitida a outros organismos por meio da transferência horizontal de genes, mediada por elementos genéticos, como plasmídeos, transposons (segmentos de DNA saltadores ou saltitantes que se deslocam de um sítio a outro dentro do genoma), bacteriófagos e integrons (estruturas que contribuem para a aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos). Considerando os riscos potenciais envolvidos e sua contribuição contínua, os GRAs foram reconhecidos como os contaminantes emergentes ambientais [100].

Antimicrobianos são amplamente consumidos, e sua presença no ambiente é relatada há pelo menos 30 anos [101]. Em 2002, já se estimava que o consumo global de antimicrobianos estivesse entre 100 mil e 200 mil toneladas por ano [102,103]. O Brasil é um dos principais mercados farmacêuticos do mundo, tanto para medicamentos humanos como veterinários [104]. Os ATBs representam a maior fração do consumo total. Além disso, em termos de cobertura, apenas cerca de 40% do esgoto gerado no Brasil é tratado [105].

A ocorrência de GRAs é frequentemente relatada em fezes de animais ou isolados clínicos [106]. Não obstante, os trabalhos realizados em amostras ambientais são menos frequentes. De fato, muito poucos estudos sobre a ocorrência simultânea

de ATBs e GRAs em águas superficiais no Brasil foram publicados. Por exemplo, *Basso et al.* investigaram a resistência a antibióticos de *Staphylococcus sp.* isolados do Arroio Dilúvio. Oitenta e oito estafilococos foram identificados e a resistência à eritromicina foi verificada em 37,5% das cepas, seguida pela penicilina, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol e norfloxacino. Um total de 10,2% de todas as cepas isoladas apresentou multirresistência [107].

Em trabalho anterior, nosso grupo de pesquisa determinou a presença de oito ATBs de classes distintas no Arroio Dilúvio [47]. A presença desses ATBs ao longo do Arroio, com exceção da nascente, demonstrou a necessidade de um maior monitoramento, abrangendo o maior número possível desses compostos.

Com o objetivo de aumentar o número de compostos monitorados e a co-ocorrência de resíduos de ATBs e GRAs, foi realizado um monitoramento ambiental para detecção e quantificação de quarenta antimicrobianos no Arroio Dilúvio utilizando LC-MS/MS. Além disso, também foi investigada a ocorrência de quatro GRAs que conferem resistência a sulfonamidas (*sul1*), β -lactâmicos (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolonas (*qnrS*). Este é o primeiro relato sobre a co-ocorrência de resíduos de ATBs e GRAs em um rio urbano no Brasil.

2.2. Avaliação de genes de resistência a antimicrobianos

Estudos metagenômicos relatam a presença de microrganismos contendo genes de resistência aos antibióticos no ambiente aquático, o que levou à sugestão de que existe um risco elevado de que esses genes sejam transferidos para bactérias patogênicas levando a um grande risco à saúde humana [96,108]. A maioria dos estudos de resistência em bactérias ambientais baseia-se em cultura seguida de testes de susceptibilidade. No entanto, esta metodologia não é padronizada, o que dificulta a comparação de resultados entre os estudos [96]. Por isso, é importante a aplicação de métodos de estudo de resistência a antimicrobianos que sejam independentes de cultura, como as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Portanto, visa-se nesse trabalho avaliar a presença de bactérias que contenham genes de resistências a alguns antimicrobianos.

2.3. Metodologias analíticas para quantificação de antimicrobianos

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (LC-MS/MS) é a técnica analítica mais utilizada para a determinação de fármacos em amostras aquosas ambientais. Devido a isso, a grande maioria dos trabalhos desenvolvidos para a análise quantitativa de resíduos de fármacos em amostras ambientais tem utilizado a técnica de LC-MS/MS nos últimos anos [14,29,73,74,109,110].

O sistema de LC-MS/MS é bastante adequado quando se necessita de elevada sensibilidade e critérios de identificação mais rigorosos. Quando se utiliza o sistema de espectrometria de massas em *tandem*, a quantificação é realizada por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*), em que duas transições específicas são utilizadas, sendo a mais intensa para quantificar e a outra para confirmar a identidade química [61].

A ionização por ESI ocorre da mesma forma que no LC-QTOF-MS, descrita no capítulo anterior. Após a etapa de ionização, os analitos seguem para o analisador. O analisador híbrido de triplo quadrupolo consiste em dois quadrupolos com um segundo quadrupolo entre eles que atua como célula de colisão, permitindo a análise de massa em *tandem*. Os íons se dirigem desde a fonte de ionização para o primeiro quadrupolo, onde é selecionado o íon precursor. Após a célula de colisão está disposto um quadrupolo final e o detector fotomultiplicador [61].

No modo de operação MRM, um íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo é fragmentado na célula de colisão e íons produtos são monitorados no quadrupolo final.

O desenvolvimento de metodologia por LC-MS/MS utilizando o modo MRM é realizado através da otimização da fragmentação do analito (infusão), otimização das condições da fonte de ionização (FIA, do inglês *flow injection analysis*) e otimização das condições da cromatografia líquida.

A infusão permite que seja vista uma resposta imediata do sinal quando é feita alguma mudança nos parâmetros de massa e, portanto, é realizada a fim de otimizar a ionização e fragmentação do analito. Na infusão ocorre a otimização de parâmetros do equipamento relacionados aos compostos de interesse, como CAD (do inglês

collisionly activated dissociation, que controla a pressão do gás na célula de colisão), DP (do inglês *Declustering Potential*, controla a voltagem no orifício de entrada do triploquadrupolo), EP (do inglês *Entrance Potential*, controla o potencial de entrada dos analitos), CXP (do inglês *Collision Cell Exit Potential*, controla o potencial da saída da célula de colisão) e CE (do inglês *Collision Energy*, controla o potencial aplicado na célula de colisão).

Em seguida é realizada análise por FIA. A análise por FIA consiste em melhorar as condições de ionização do analito, de forma que a maior parcela possível de moléculas do analito seja convertida para a forma ionizada. A solução mix padrão dos analitos é injetada pelo amostrador automático na corrente do cromatógrafo a líquido, sem a coluna. Durante o processo de otimização, múltiplas injeções da solução são feitas, com alteração dos parâmetros entre as injeções. Essa etapa ocorre na fonte de ionização do equipamento. Os principais parâmetros otimizados nessa etapa são: gás da fonte (GS1, controla o gás de nebulização), gás auxiliar (GS2, controla o gás auxiliar), temperatura (T, temperatura do *heater*), CUR (do inglês *Curtain Gas*, o gás com fluxo entre o *curtain plate* e o orifício de entrada para o triplo quadrupolo) e IS (do inglês *Ion Spray Voltage*, controla a voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte).

Por fim, são selecionadas as duas transições mais abundantes de cada composto (a primeira tomada como quantificadora, e a segunda como qualificadora) e estabelecido o método de análise no modo MRM.

Após a otimização das condições da espectrometria de massa, foi realizada a otimização das condições de cromatografia a líquido. Os fatores que devem ser considerados é o modo de ionização selecionado, a coluna analítica a ser utilizada (fase estacionária, diâmetro, comprimento e tamanho de partícula), a fase móvel utilizada, pois a composição tem de garantir uma boa ionização e uma boa separação cromatográfica (pH, solventes, aditivos), gradiente da fase móvel e fluxo.

2.4. *Parâmetros de desempenho de método analítico*

Para validação de método quantitativo para análise de compostos orgânicos em nível de traços e ultratraços, são avaliados parâmetros de desempenho de método analítico como: faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de

quantificação (LOQ), exatidão, precisão intra-dia e inter-dia, recuperação, especificidade e seletividade [111].

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, com curvas de calibração que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta.

Limite de detecção é o menor valor de concentração do analito detectável no equipamento, enquanto limite de quantificação é a menor concentração de analito capaz de ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Em cromatografia, normalmente se utiliza o ruído da linha de base para obter o LOD e LOQ, considerando-se que a razão sinal/ruído deve ser 3:1 para LOD, e uma razão sinal/ruído de 10:1 para LOQ [111].

Exatidão é a concordância entre o resultado encontrado e o valor de referência aceito como verdadeiro. Precisão intra-dia é a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições (procedimento, analista, equipamento, local, em um curto espaço de tempo). Precisão inter-dia ou intermediária refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras, se necessário [111].

Recuperação é o teor de composto que se mantém na amostra após o processamento desta para obtenção do extrato para injeção no sistema analítico. A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de preparo de amostra e as perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica realizadas até a leitura da resposta instrumental.

Especificidade refere-se ao método que produz resposta para uma única substância, enquanto o termo seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito particular em mistura ou matriz sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas [111].

3. Materiais e métodos

3.1. *Materiais, solventes, reagentes e padrões analíticos*

Padrões analíticos (pureza $\geq 90\%$) de ciprofloxacino (CIPRO), enrofloxacino (ENRO), difloxacino (DIFLO), sarafloxacino (SARA), norfloxacino (NOR), danofloxacino (DANO), ácido nalidíxico (NALID), flumequina (FLU), sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMZ), sulfadoxina (SDX), sulfadimetoxina (SDMX), sulfaclopiridazina (SCP), sulfametoxazol (SMA), sulfisoxazol (SFX), sulfaquinoxalina (SQX), trimetoprim (TMP), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC), doxiciclina (DOXI), penicilina G (PNG), penicilina V (PNV), cefalexina (CFX), ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), oxacilina (OXA), cefapirina (CFAP), cefoperazona (CFOP), cloxacilina (CLX), dicloxacilina (DCX), cefalônio (CFN), ceftiofur (CFT), lincomicina (LNC), eritromicina (ERT), azitromicina (AZT), tilosina (TIL), clindamicina (CLN) e tilmicosina (TLM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Logistik (Schnelldorf, Alemanha) e de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

As soluções padrões de estoque foram preparadas individualmente na concentração de 1 mg mL^{-1} em solvente adequado (metanol, acetonitrila ou água ultrapura, de acordo com cada composto) e mantidas em freezer, a uma temperatura inferior a -18°C . Soluções de trabalho foram preparadas por diluição direta de cada solução estoque usando água ultrapura desionizada para produzir soluções mix em concentrações de trabalho de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os solventes acetonitrila (ACN), acetona (ACO) e metanol (MeOH), ambos de grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). O ácido acético fórmico (FA) de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). A água ultrapura ($<18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ de resistividade) foi obtida a partir do Sistema de Água Reagente Milli-Q SP de Millipore (Bedford, MA, EUA).

As sequências completas dos genes *sul1*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrS* foram obtidas no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> e a síntese dessas sequências foi realizada pela Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, EUA). O plasmídeo pIDT Smart usado como controle positivo no ensaio de PCR também foi adquirido pela Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, EUA). A PCR foi realizada utilizando 2x PCR Mix (Quatro

G, BR) com 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM de KCl, 1,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mistura de dNTP. Os primers foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil).

3.2. Equipamentos

O sistema de espectrometria de massa utilizado foi um cromatógrafo líquido Agilent 1200 Series acoplado a espectrômetro de massas em modo tandem Sciex API 5000 (LC-MS/MS) (Sciex, Foster City, CA).

3.3. Métodos

3.3.1. Amostragem

A amostragem foi realizada no Arroio Dilúvio, conforme descrita no Capítulo anterior, nos mesmos pontos de coleta, de dezembro de 2016 a setembro de 2018, trimestralmente, por dois anos.

Para análise por LC-MS/MS, foram utilizadas as mesmas amostras coletadas para a análise de *screening* (item 3.3.7 do CAPÍTULO 1).

Para determinação de GRAs, as amostras foram coletadas em garrafas de vidro com capacidade de 2 litros, previamente higienizadas e esterilizadas por 30 min a 120°C. Após o procedimento de amostragem, as garrafas foram mantidas refrigeradas até a recepção em laboratório, onde foram filtradas para remover material particulado, utilizando filtros de membrana de celulose com diferentes tamanhos de poro (1,2 e 0,45 µm). As células bacterianas foram concentradas usando um filtro de membrana de celulose estéril com 0,22 µm de tamanho de poro em triplicata em cada ponto de amostragem. Os filtros de membrana foram mantidos em placas de vidro estéreis a -80°C para extração total de DNA.

3.3.2. Preparo de amostra para quantificação de ATBs

Para a quantificação de ATBs, foram utilizados as mesmas amostras e o mesmo procedimento de preparo de amostra para a análise qualitativa de CEs por LC-QTOF-MS, descrito no item 3.3.4 do CAPÍTULO 1.

Após análise por LC-QTOF-MS, os vials contendo o extrato final da amostra, eram congelados ($\pm -20^{\circ}\text{C}$) até análise no LC-MS/MS.

3.3.3. Otimização dos parâmetros de espectrometria de massas e de cromatografia líquida para análise de antimicrobianos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em modo tandem (LC-MS/MS)

O sistema LC-MS/MS foi composto por um cromatógrafo a líquido Agilent 1100 series e um espectrômetro de massa API 5000 (Sciex, Foster City, CA).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica Agela Durashell RP (3 μm , 2,1 x 100 mm), precedida por um sistema de pré-coluna C18 (5 μm , 4,0 x 3,0 mm) (Phenomenex). Utilizou-se uma fase móvel binária com fluxo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ num tempo total de 15 minutos. A fase móvel A foi solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% e a fase móvel B foi acetonitrila com ácido fórmico a 0,1%. O gradiente foi otimizado para a separação, começando com 98% de A, mantendo essa condição durante 2 minutos, e diminuindo linearmente para 5% em 3 minutos e mantendo essa concentração durante 3 minutos. Finalmente, A aumenta linearmente ao longo de 3 minutos para 98% e mantém-se durante 4 minutos. O volume de injeção da amostra foi de 5 μL .

Foi utilizada ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo para detecção e quantificação. A aquisição de dados foi realizada no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). Os parâmetros de espectrometria de massa foram otimizados por infusão de compostos na concentração de 200 mg L^{-1} utilizando bomba de seringa a um fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ em água ultra-pura deionizada com 0,1% de ácido fórmico. Os fragmentos mais abundantes foram determinados e os parâmetros de ionização para cada transição foram otimizados através deste procedimento. Análise por injeção em fluxo (FIA) foi realizada para otimizar as condições da fonte de íons no espectrômetro de massa. A tensão de pulverização foi ajustada para 5500 V e a fonte de temperatura a 400 $^{\circ}\text{C}$, CUR a 20 psi, GS1 a 50 psi, GS2 a 50 psi, CAD a 6 psi, EP a 10

eV e *dwell time* a 25 s. Todos os dados foram processados usando o software Analyst versão 1.4.2 (Applied Biosystems). As condições de MRM, transições, DP, CE e CXP são apresentadas na Tabela 7 para todos os compostos.

Tabela 7. Parâmetros de fragmentação dos analitos e padrões internos, obtidos por ionização com *electrospray* no modo positivo.

| Composto | [M+H] ⁺ | m/z | DP (V) | CE (V) | CXP (V) |
|----------|--------------------|-------|--------|--------|---------|
| OTC | 461,1 | 426,3 | 76 | 29 | 16 |
| | | 444,3 | 76 | 23 | 16 |
| CTC | 479,2 | 444,2 | 101 | 31 | 50 |
| | | 462,2 | 101 | 29 | 18 |
| STZ | 256 | 156,1 | 71 | 21 | 12 |
| | | 108,2 | 71 | 37 | 8 |
| SMZ | 279,1 | 108 | 31 | 41 | 24 |
| | | 92,1 | 31 | 41 | 14 |
| SQX | 301,2 | 156 | 106 | 25 | 20 |
| | | 108 | 106 | 37 | 16 |
| SMA | 254 | 156 | 71 | 23 | 22 |
| | | 92 | 71 | 35 | 14 |
| SDZ | 251,1 | 156 | 31 | 21 | 16 |
| | | 108 | 31 | 33 | 16 |
| CIPRO | 332,1 | 288,2 | 211 | 25 | 32 |
| | | 245,2 | 211 | 33 | 34 |
| ENRO | 360,2 | 316,3 | 51 | 27 | 36 |
| | | 245,2 | 51 | 37 | 26 |
| NOR | 320,2 | 276,3 | 51 | 25 | 30 |
| | | 233,2 | 51 | 33 | 26 |
| SCP | 285 | 108 | 31 | 35 | 14 |
| | | 156 | 31 | 35 | 14 |
| TMP | 290,8 | 230,2 | 45 | 31 | 34 |
| | | 275 | 45 | 35 | 30 |
| DOXI | 445 | 428 | 131 | 15 | 54 |
| | | 154 | 126 | 27 | 18 |
| | | 321 | 121 | 77 | 32 |
| NALID | 233,2 | 215,2 | 100 | 21 | 30 |
| | | 187 | 100 | 35 | 26 |
| SARA | 400,1 | 356 | 21 | 31 | 24 |
| | | 299,3 | 21 | 39 | 30 |
| DIFLO | 386,2 | 342,1 | 41 | 29 | 24 |
| | | 299 | 36 | 37 | 30 |
| FLU | 262,3 | 244,2 | 126 | 21 | 36 |

| | | | | | |
|------|-------|-------|-----|----|----|
| | | 202,3 | 126 | 43 | 28 |
| | | 96,2 | 100 | 30 | 15 |
| DANO | 358,4 | 340,3 | 100 | 30 | 15 |
| | | 156 | 100 | 25 | 14 |
| SMR | 265 | 108 | 100 | 25 | 14 |
| | | 245,1 | 31 | 27 | 14 |
| SDX | 311,2 | 139,9 | 31 | 35 | 8 |
| | | 156,1 | 31 | 27 | 8 |
| SDMX | 311,2 | 108,2 | 31 | 35 | 10 |
| | | 112,8 | 31 | 20 | 10 |
| SFX | 268,1 | 156 | 31 | 20 | 10 |
| | | 159,9 | 96 | 17 | 18 |
| PNG | 335,1 | 175,9 | 96 | 17 | 20 |
| | | 174,1 | 90 | 21 | 18 |
| CFX | 348,2 | 158 | 90 | 15 | 22 |
| | | 106 | 106 | 19 | 24 |
| AMP | 350,1 | 160 | 106 | 17 | 18 |
| | | 160 | 86 | 19 | 22 |
| PNV | 350,9 | 114 | 86 | 45 | 16 |
| | | 114 | 46 | 27 | 8 |
| AMX | 366,2 | 207,9 | 46 | 17 | 12 |
| | | 160 | 96 | 19 | 16 |
| OXA | 402 | 243 | 96 | 19 | 26 |
| | | 152 | 86 | 31 | 20 |
| CFAP | 424 | 181 | 86 | 29 | 26 |
| | | 159,9 | 101 | 19 | 16 |
| CLX | 435,9 | 277,1 | 101 | 19 | 30 |
| | | 337,1 | 85 | 13 | 42 |
| CFN | 459 | 158 | 85 | 25 | 20 |
| | | 160 | 106 | 19 | 16 |
| DCX | 469,9 | 113,9 | 106 | 47 | 24 |
| | | 241,1 | 126 | 25 | 16 |
| CFT | 524,2 | 210,1 | 126 | 31 | 14 |
| | | 143,2 | 141 | 43 | 22 |
| CFOP | 646 | 290,2 | 141 | 31 | 37 |
| | | 126 | 11 | 37 | 16 |
| LNC | 407 | 359 | 11 | 23 | 14 |
| | | 158,1 | 126 | 37 | 16 |
| ERT | 734 | 576 | 126 | 23 | 22 |
| | | 158,2 | 271 | 51 | 24 |
| AZT | 749,5 | 116 | 271 | 61 | 14 |
| | | 174 | 56 | 47 | 18 |
| TIL | 916 | 101 | 56 | 59 | 22 |

| | | | | | |
|-----|-------|-------|-----|----|----|
| | | 126,1 | 136 | 35 | 12 |
| CLN | 425,3 | 377,3 | 151 | 23 | 40 |
| | | 174 | 80 | 30 | 15 |
| TLM | 435,5 | 143,3 | 80 | 26 | 15 |
| | | 125,8 | 80 | 44 | 15 |

DP: *declustering potential*, CE: *collision energy*, CXP: *collision cell exit potential*.

Fonte: a autora.

3.3.4. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método por LC-MS/MS

Para a validação, utilizou-se água superficial coletada no Arroio do Salso (30°10'28.4"S 51°12'53.7"W, Porto Alegre, Brasil). A validação foi conduzida de acordo com as diretrizes internacionais e foram determinadas as figuras de mérito, a fim de fornecer um alto nível de confiança nos resultados. Todos os estudos foram realizados com amostras fortificadas com a solução mix em concentrações relevantes ambientalmente. Os parâmetros avaliados, com base nas recomendações descritas nas diretrizes do INMETRO [112] foram: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Para o procedimento de validação, foram utilizadas curvas analíticas do tipo *matrix matched*. Amostras brancas foram fortificadas com solução padrão e submetidas ao processo extrativo completo. A concentração dos analitos nas amostras foi calculada utilizando a equação da reta. Cada curva analítica possui sete pontos, com concentrações variando de 2,5 a 100 µg L⁻¹. Considerando que as amostras são concentradas 250 vezes, as concentrações reais nas amostras vão de 10 a 400 ng L⁻¹ (considerando recuperação de 100%). Além da curva analítica, cada lote de validação inclui cinco amostras em branco com 50 µg L⁻¹ e três "*extracted matrix standards*" (EMS; extratos de amostras brancas as quais foi adicionada uma quantidade de solução padrão para obter uma concentração a 50 µg L⁻¹). Este procedimento foi repetido três vezes, em três dias diferentes.

A seletividade foi avaliada pela injeção de amostra branca (livre da presença dos analitos) e amostra com os analitos de interesse. A linearidade foi avaliada pela injeção das soluções preparadas em matriz para construção das curvas analíticas em sete pontos, com concentrações variando de 2,5 a 100 µg L⁻¹. Os experimentos foram

realizados em duplicata, e após o tratamento estatístico, as expressões matemáticas foram formuladas e os coeficientes de determinação definidos (r^2).

A repetibilidade, em termos de precisão intra-dia e inter-dia, foi avaliada pela análise de 5 replicatas fortificadas no nível intermediário ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). Para precisão intra-dia, as amostras foram preparadas simultaneamente por um analista e analisadas no mesmo dia, no mesmo equipamento e sob as mesmas condições. Para a precisão inter-dia, um lote nas mesmas condições foi preparado em dias distintos, por outro analista e quantificado nas mesmas condições descritas anteriormente. A precisão intra e inter-dia foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (RSD) das replicadas. A exatidão foi avaliada em triplicata nos níveis intermediários calculados de acordo com a curva de calibração.

O limite instrumental de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados usando a relação sinal-ruído ($S/N = 3$ para LOD e $S/N = 10$ para LOQ). O limite de quantificação do método foi tomado como a menor concentração na curva analítica da matriz considerando um fator de concentração de 250 vezes.

Os valores das recuperações foram determinados usando dados de 3 replicatas fortificadas no nível intermediário ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) antes da extração e 3 replicatas das amostras branca, que foram fortificadas após a extração (EMS). Todas as amostras adicionadas foram processadas usando o método SPE descrito e analisadas por LC-MS/MS. A recuperação foi expressa como a porcentagem de analito no extrato final após o passo de pré-concentração. A equação 4 demonstra o cálculo da porcentagem de recuperação.

$$R(\%) = 100 \times \left(\frac{\text{área}_{\text{extrato}}}{\text{área}_{\text{EMS}}} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

Os efeitos da matriz foram avaliados utilizando a *ratio slope* (SR) de duas curvas analíticas distintas, uma preparada em solvente e outra preparada usando uma matriz em branco. Quando o SR é de $1,0 \pm 0,1$, o efeito da matriz é considerável insignificante. O SR foi determinado usando a Equação 5:

$$SR = \frac{slope_{solvente}}{slope_{matriz}} \quad \text{Eq. 5}$$

3.3.5. Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos em águas superficiais

3.3.5.1. Extração de DNA

Membranas com as células bacterianas coletadas foram levadas à temperatura ambiente, cortadas em pequenos pedaços e as extrações de DNA foram obtidas seguindo as instruções do fabricante do kit PowerSoil DNA Isolation (Mobio, EUA).

A concentração e a qualidade das amostras de DNA foram determinadas por um espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3.5.2. Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos

Os genes foram qualitativamente detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os ensaios de PCR foram realizados para rastreamento em larga escala da presença/ausência de quatro GRAs conferindo resistência a sulfonamida (*sul1*), β -lactama (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolona (*qnrS*). A presença de um gene que codifica a subunidade pequena de 16S rRNA foi analisada como um marcador bacteriano. Os primers usados na PCR qualitativa estão listados na Tabela 8. A PCR foi conduzida em uma solução de 25 μ L contendo aproximadamente 10 - 30 ng de amostra de DNA (2 μ L), 0,5 μ L de cada primer (0,2 μ M), 12,5 μ L de 2x mix PCR (Quatro G, Brasil) com 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM de KCl, 1,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mistura de dNTP e 1,5 U de Taq Polimerase de DNA recombinante.

As condições do ciclo térmico para a PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento na temperatura correspondente para diferentes GRAs por 30 s e extensão em 72°C durante 1 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Água estéril foi usada

como controle negativo para todos os ensaios. Plasmídeos pIDTSmart contendo fragmentos *sul1*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrS* foram utilizados como controle positivo.

Tabela 8. Sequências de *primers* utilizados nos ensaios de PCR.

| Gene | Primer | Sequência | Temperatura de anelamento (°C) | Tamanho (bp) |
|---------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------|
| 16S rRNA | F1048 | GTGSTGCAYGGYGTCTGCA | 61 | 147 |
| | R1194 | ACGTCRTCCMCACCTTCCTC | | |
| <i>blaTEM</i> | <i>bla-TEM F</i> | GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG | 61 | 247 |
| | <i>bla-TEM R</i> | CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA | | |
| <i>qnrS</i> | <i>qnrSrtF11</i> | GACGTGCTAACTTGCCTGAT | 61 | 119 |
| | <i>qnrSrtR11</i> | TGGCATTGTTGGAAACTTG | | |
| <i>sul1</i> | <i>Sul(I) FW</i> | CGCACCGGAAACATCGCTGCAC | 65 | 163 |
| | <i>Sul(I) RV</i> | TGAAGTTCGCCGCAAGGCTCG | | |
| <i>ermB</i> | <i>erm(B)-91f</i> | GATACCGTTTACGAAATTGG | 55 | 364 |
| | <i>erm(B)-45r</i> | GAATCGAGACTTGAGTGTGC | | |

Fonte: a autora.

4. Resultados e discussão

4.1. Validação do método LC-MS/MS

Os resultados da validação demonstraram que o método proposto se mostra adequado para análise de água do rio. As principais figuras de mérito são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da validação do método de quantificação de ATBs por LC-MS/MS.

| Analito | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Precisão intra-dia (RSD _r , %) | Precisão inter-dia (RSDR, %) | Veracidade (%) | Recuperação (%) | SR | r ² |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|---|------------------------------------|-------------------|--------------------|-----|----------------|
| SMA | 2,5 | 5 | 5,3 | 14,1 | 110 | 54 | 1,9 | 0,9920 |
| SDZ | 2,5 | 5 | 14,4 | 18,7 | 105 | 43 | 3,3 | 0,9930 |
| SMZ | 5 | 10 | 6,4 | 14,6 | 97 | 69 | 2,6 | 0,9810 |
| STZ | 5 | 10 | 3,5 | 11,7 | 110 | 62 | 2,2 | 0,9870 |
| SQX | 5 | 10 | 4,4 | 13,0 | 80 | 52 | 1,8 | 0,9900 |
| SMR | 5 | 10 | 13,2 | 18,1 | 110 | 52 | 1,6 | 0,9920 |
| SDX | 5 | 10 | 3,6 | 16,7 | 105 | 61 | 1,8 | 0,9960 |
| SDMX | 5 | 10 | 8,9 | 16,0 | 88 | 62 | 2,9 | 0,9860 |
| SFX | 5 | 10 | 9,0 | 16,5 | 99 | 50 | 3,6 | 0,9950 |
| SCP | 5 | 10 | 14,1 | 18,9 | 94 | 66 | 2,9 | 0,9920 |
| CIPRO | 5 | 10 | 6,7 | 11,7 | 110 | 46 | 2,0 | 0,9940 |
| ENRO | 5 | 10 | 7,3 | 10,5 | 103 | 59 | 1,6 | 0,9940 |
| NOR | 5 | 10 | 6,6 | 8,3 | 109 | 44 | 2,2 | 0,9960 |
| DANO | 5 | 10 | 6,5 | 14,3 | 109 | 46 | 1,3 | 0,9980 |
| DOXI | 5 | 10 | 4,9 | 16,8 | 83 | 58 | 6,1 | 0,9600 |
| NALID | 5 | 10 | 7,6 | 12,8 | 80 | 111 | 1,4 | 0,9980 |
| SARA | 2,5 | 5 | 5,2 | 14,5 | 91 | 51 | 1,8 | 0,9950 |
| DIFLO | 5 | 10 | 13,5 | 16,2 | 102 | 43 | 3,6 | 0,9950 |
| PNG | 5 | 10 | 7,6 | 22,1 | 68 | 71 | 1,4 | 0,9810 |
| CFX | 5 | 10 | 0,7 | 17,7 | 132 | 63 | 7,7 | 0,9860 |
| AMP | 5 | 10 | 18,0 | 22,0 | 93 | 54 | 1,0 | 0,9940 |
| PNV | 5 | 10 | 11,2 | 14,3 | 68 | 64 | 2,0 | 0,9990 |
| AMX | 5 | 10 | 22,0 | 23,1 | 88 | 23 | 5,3 | 0,9910 |
| OXA | 2,5 | 5 | 11,9 | 21,1 | 67 | 56 | 1,3 | 0,9870 |
| CFAP | 5 | 10 | 1,9 | 13,1 | 108 | 99 | 1,1 | 0,9950 |
| CLX | 2,5 | 5 | 9,6 | 23,0 | 81 | 68 | 1,4 | 0,9930 |
| CFN | 5 | 10 | 5,9 | 9,9 | 108 | 72 | 1,3 | 0,9910 |
| DCX | 2,5 | 5 | 7,1 | 20,9 | 67 | 62 | 1,7 | 0,9760 |
| CFT | 5 | 10 | 9,6 | 17,9 | 110 | 70 | 1,7 | 0,9920 |
| CFOP | 5 | 10 | 13,8 | 17,6 | 99 | 96 | 1,2 | 0,9970 |
| LNC | 2,5 | 5 | 2,3 | 7,2 | 108 | 94 | 1,1 | 0,9970 |
| ERT | 5 | 10 | 9,7 | 23,3 | 84 | 54 | 2,4 | 0,9980 |
| AZT | 5 | 10 | 4,2 | 11,8 | 80 | 48 | 5,8 | 0,9920 |
| TIL | 2,5 | 5 | 11,8 | 13,8 | 77 | 53 | 2,9 | 0,9920 |
| CLN | 2,5 | 5 | 5,9 | 11,1 | 110 | 47 | 1,4 | 0,9920 |
| TLM | 5 | 10 | 4,5 | 12,5 | 82 | 27 | 3,4 | 0,9930 |
| OTC | 5 | 10 | 4,4 | 11,3 | 101 | 57 | 1,0 | 0,9700 |
| CTC | 10 | 25 | 9,6 | 15,4 | 98 | 31 | 3,0 | 0,9850 |
| FLU | 5 | 10 | 3,5 | 12,2 | 98 | 92 | 1,1 | 0,9940 |
| TMP | 2,5 | 5 | 14,5 | 16,0 | 108 | 63 | 1,6 | 0,9970 |

SR = inclinação da reta (*slope ratio*)

Fonte: a autora.

Em relação ao *slope ratio*, quando o SR é de $1,0 \pm 0,1$, considera-se que as curvas estão sobrepostas, ou seja, a matriz não interfere no sinal analítico. Esse foi o caso dos analitos OTC, FLU, CFAP e LNC. No entanto, considerando que a maioria dos

compostos apresentou algum grau de efeitos de matriz, o procedimento mais adequado é realizar curva de calibração em matriz, a fim de compensar o efeito de co-extrativos interferentes. Além disso, o uso de curvas analíticas em amostras brancas fortificadas antes do procedimento de extração também compensa as perdas de analitos, evitando a necessidade de corrigir posteriormente os resultados com os valores de recuperação.

A precisão e veracidade foram consideradas satisfatórias, considerando que os analitos estarão presentes em nível de traço. Para veracidade, com exceção do grupo dos beta-lactâmicos (67-132%), todos os outros analitos apresentaram valores variando de 80 a 110%. A especificidade foi avaliada usando amostras brancas, conforme descrito no capítulo anterior.

4.2. *Concentração de antimicrobianos*

Em um estudo anterior de nossa equipe de pesquisadores (janeiro a agosto de 2011, sendo o período do verão ao inverno, no Brasil) treze ATBs de diferentes classes foram monitorados em quatro pontos sobre o rio Dilúvio. Destes, cinco (azitromicina, ciprofloxacino, norfloxacino, sulfametoxazol e trimetoprim) foram quantificados, em concentrações variando de 15,5 ng L⁻¹ (ciprofloxacino) a 572 ng L⁻¹ (sulfametoxazol) [47].

Como o problema relacionado à presença de antimicrobianos está crescendo em todo o mundo, este estudo foi realizado para ampliar o conhecimento sobre a presença destes compostos no Arroio Dilúvio, pois os resultados anteriores foram preocupantes. Neste estudo, a amostra foi coletada trimestralmente de dezembro de 2016 a setembro de 2018. Um total de quarenta e oito amostras, em triplicata, foram analisadas por dois anos, permitindo também a avaliação da variação sazonal. As Figuras 15 e 16 apresentam a soma da concentração para cada classe. As concentrações detalhadas para cada amostra são apresentadas na Tabela VI em ANEXO I.

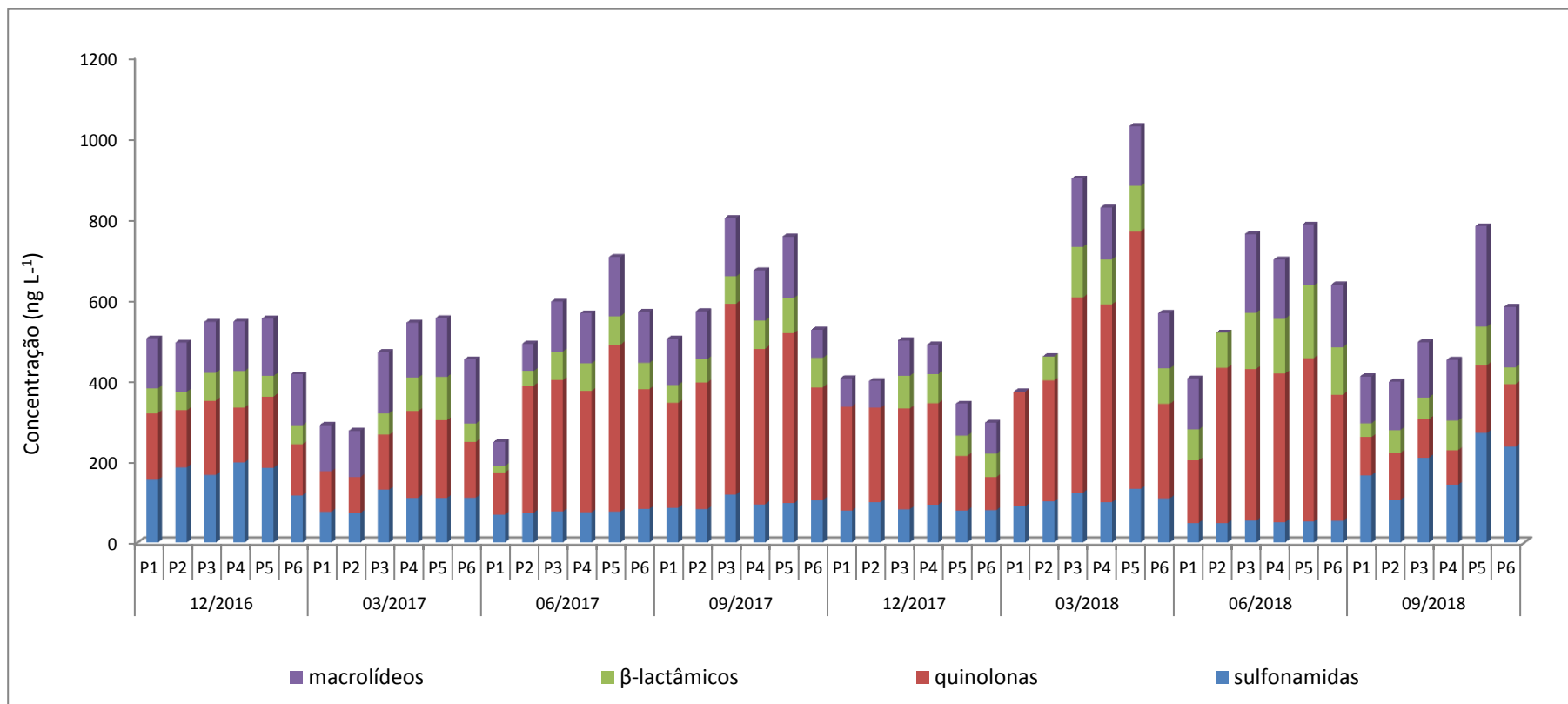
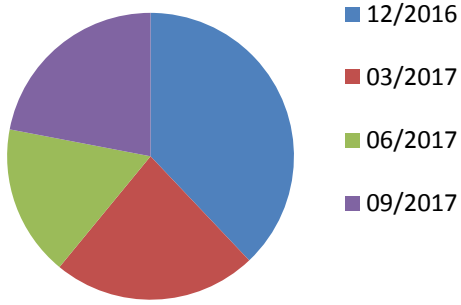
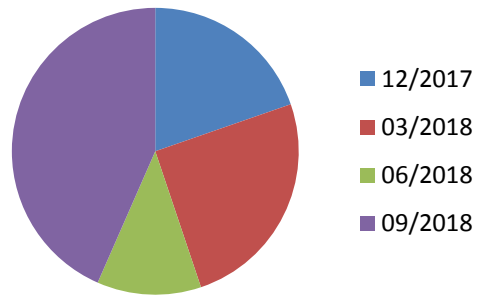


Figura 15. Dados da soma da concentração de ATBs, por classe, em cada campanha, nos 6 pontos de amostragem no Arroio Dilúvio.
Fonte: a autora.

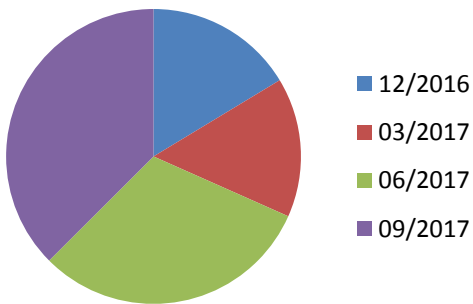
sulfonamidas



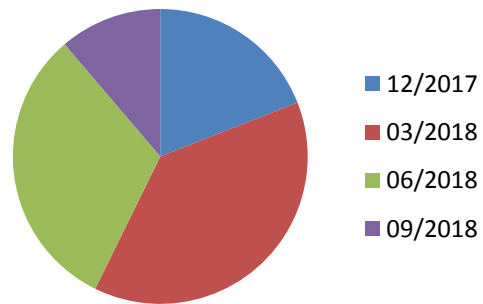
sulfonamidas



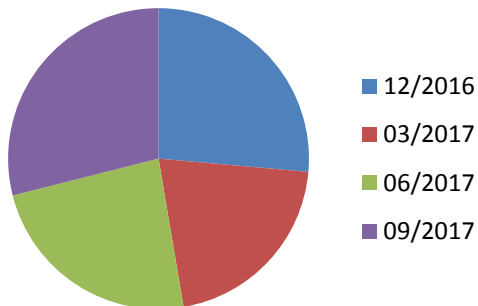
quinolonas



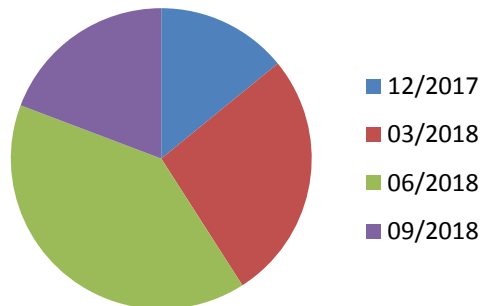
quinolonas



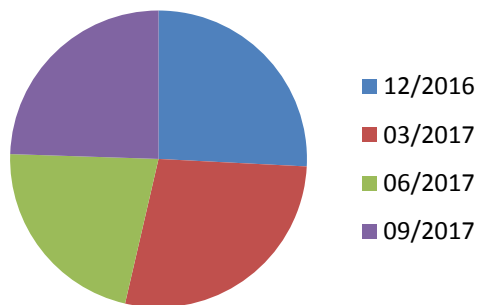
β -lactâmicos



β -lactâmicos



macrolídeos



macrolídeos

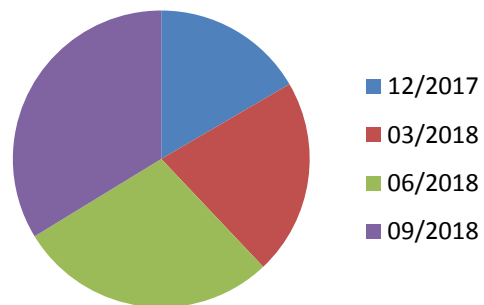


Figura 16. Soma das concentrações (%) para cada classe em cada campanha. A esquerda, dados do primeiro ano de monitoramento, e a direita, dados do segundo ano.

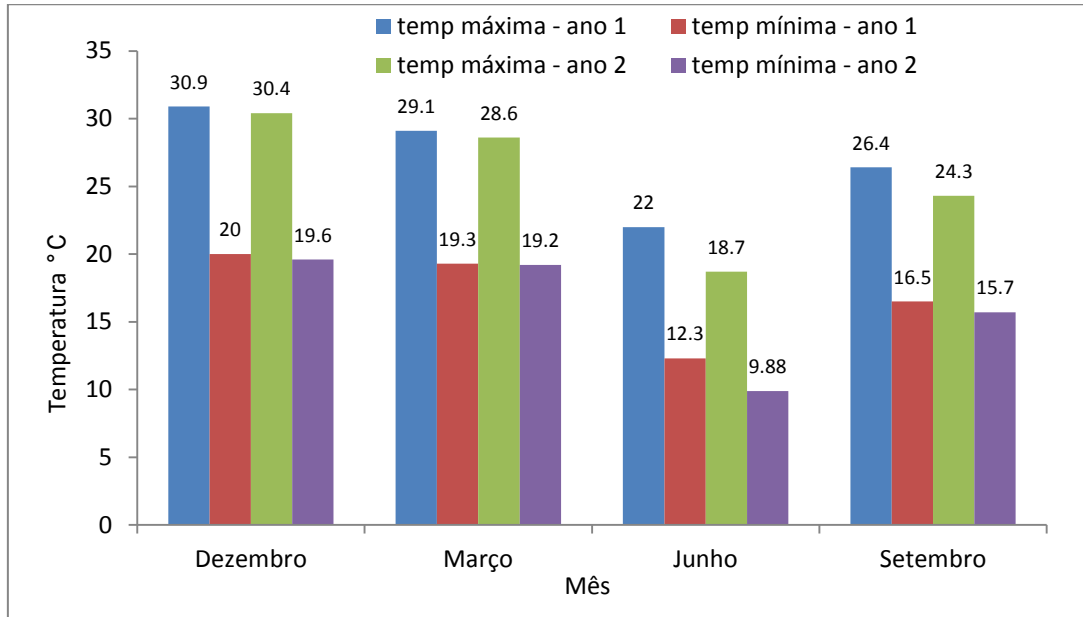


Figura 17. Valores de temperaturas médias máximas e mínimas nos meses de amostragem. Fonte: a autora.

Os ATBs β -lactâmicos (cefalexina), quinolonas (ciprofloxacino e norfloxacino), macrolídeos (azitromicina e clindamicina) e sulfonamidas (sulfadiazina e sulfametoxazol) foram as classes presentes em todas as amostras.

Quatro vias podem ser destacadas para o consumo dos ATBs: os fornecidos pelo SUS através da farmácia básica municipal; os prescritos e adquiridos com receita médica; os utilizados em hospitais em que cada unidade de saúde tem sua lista de medicamentos essenciais e finalmente, aqueles de uso veterinário.

Para a comparação dos resultados obtidos nos dois anos de monitoramento é importante avaliar a variação da temperatura ambiente ocorrida. Pela Figura 17, observa-se que houve uma variação entre as temperaturas médias nos meses de junho, sendo que no segundo ano as temperaturas médias foram inferiores ($\pm 3^\circ\text{C}$), o que pode ter refletido também nas temperaturas dos meses de setembro.

Este cenário pode justificar que os níveis maiores dos antimicrobianos comumente prescritos para tratar infecções respiratórias (macrolídeos e β -lactâmicos) foram encontrados em maior concentração no período de inverno do segundo ano do que no do primeiro ano. As quinolonas e sulfonamidas foram exceções, uma vez que estes compostos são geralmente usados para infecções urinárias e outras, que são

geralmente independentes do clima. As sulfonamidas tiveram uma maior quantidade no verão do primeiro ano e na primavera do segundo ano. As quinolonas tiveram maior consumo no inverno e primavera do primeiro ano, e outono e inverno do segundo, sendo que no inverno, os dois anos foram similares (Figura 16).

Considerando a alta incidência dos mesmos compostos durante o monitoramento, e devido à grande discussão em todo o mundo em relação às bactérias resistentes no ambiente, nas duas últimas campanhas também foram realizadas análises de PCR para detectar os GRAs e relacioná-los com os ATBs encontrados.

4.3. Detecção de genes de resistência a antibióticos

A análise para quatro GRAs conferindo resistência a sulfonamidas (*sul1*), β -lactâmicos (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolonas (*qnrS*) foi realizada em junho de 2018 e setembro de 2018.

A análise qualitativa baseada na PCR convencional de GRAs em amostras de água mostrou a presença dos genes *blaTEM*, *sul1*, *qnrS* e *ermB* em todos os seis pontos de coleta nas duas coletas de amostras (Tabela 10 e Figura 18). A presença de bactérias em todas as amostras coletadas foi confirmada pela amplificação do gene 16S. A extração de DNA e análise de PCR foram feitas em triplicata para cada ponto de amostragem. Os resultados de todas as análises estão presentes na Figura 1 em ANEXO II.

Tabela 10. Presença/ausência dos quatro GRAs que conferem resistência a sulfonamida (*sul1*), β -lactâmico (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolona (*qnrS*) em amostras de água do Arroio Dilúvio.

| Pontos de amostragem | GRAs - Junho 2018 | | | | GRAs - Setembro 2018 | | | |
|----------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>blaTEM</i> | <i>qnrS</i> | <i>sul1</i> | <i>ermB</i> | <i>blaTEM</i> | <i>qnrS</i> | <i>sul1</i> | <i>ermB</i> |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 3 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + |

(+) presença; (-) ausência. Fonte: a autora.

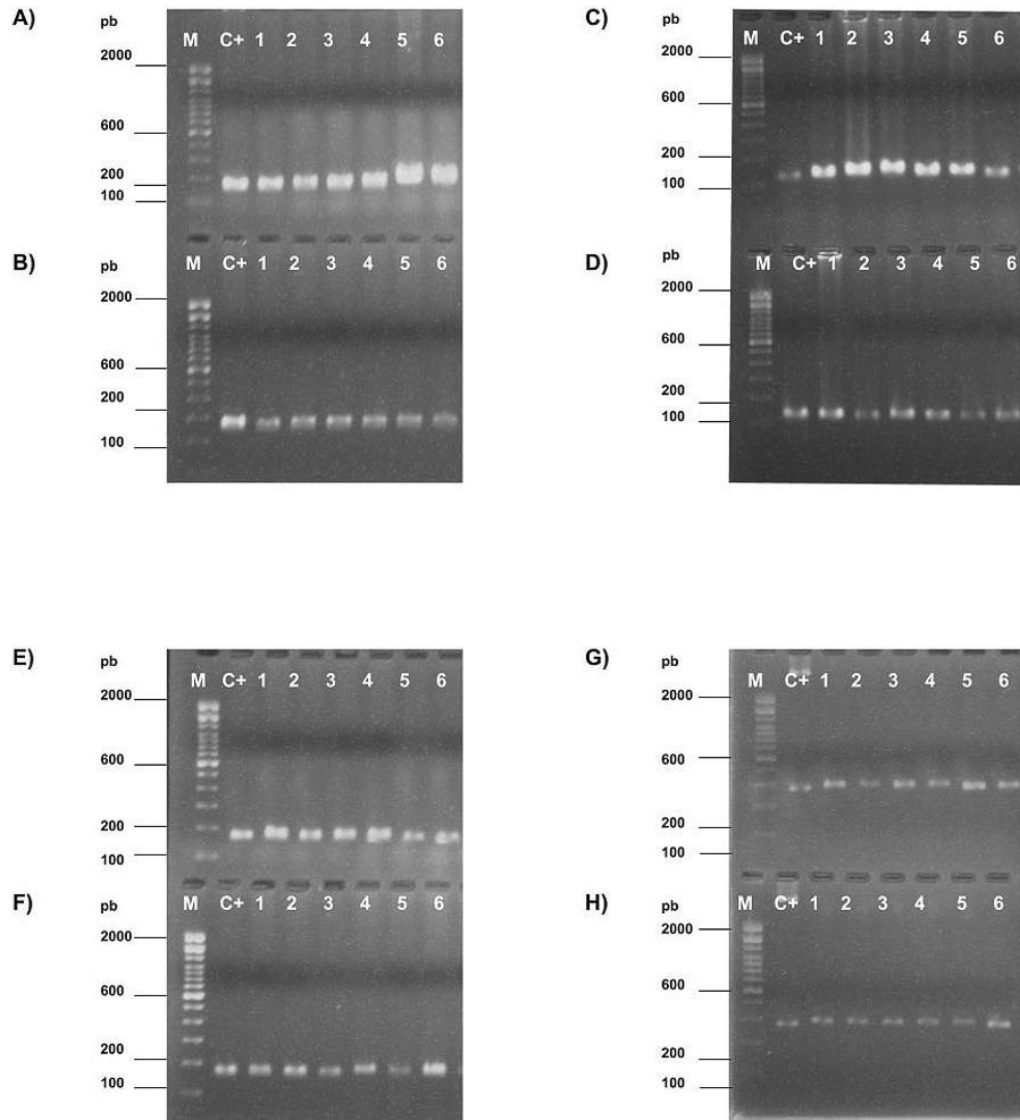


Figura 18. Produtos de amplificação por PCR analisados por electroforese em gel de agarose a 2%. (A) junho de 2018 e (B) setembro de 2018 produtos de amplificação *bla*TEM. (C) de junho de 2018 e (D) setembro de 2018 produtos de amplificação *qnr*S. (E) junho de 2018 e (F) setembro de 2018 *sul*1 produtos de amplificação. (G) Junho de 2018 e (H) Setembro de 2018 produtos de amplificação *erm*B. M: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); C +: Plasmídeo pIDTSmart contendo fragmentos *bla*TEM, *qnr*S, *sul*1 e *erm*B; 1 a 6: pontos de amostragem.

Fonte: a autora.

4.4. Correlação entre antibióticos e genes de resistência a antibióticos

O Arroio Dilúvio foi previamente caracterizado como um fluxo de água poluída, com presença significativa de contaminação fecal [113], enterotoxinas [107], enzimas resistentes a antibióticos [114], e fármacos [47]. Além do risco à saúde representado pelos altos níveis de contaminantes químicos e biológicos presentes em um rio urbano, os riscos são muito mais intensos, considerando que a foz do Arroio Dilúvio flui para o lago Guaíba, a fonte municipal de água potável [47].

A entrada constante de ATBs em rios urbanos pode fornecer microrganismos suscetíveis no ambiente para se tornarem resistentes aos ATBs. Os genes que codificam a resistência a antibióticos podem ser transmitidos para a próxima geração (transferência vertical de genes). Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a transferência horizontal de genes, que é o principal mecanismo para dividir GRAs entre não patógenos e bactérias patogênicas, permitindo a troca de elementos genéticos móveis entre microrganismos distintos. Em ambos os casos, estas formas de transmissão representam um risco potencial para a saúde humana.

Neste estudo, foi avaliada a presença de quatro genes *blaTEM*, *sul1*, *qnrS* e *ermB* que conferem resistência, respectivamente, às classes antimicrobianas β -lactâmicos, sulfonamidas, quinolonas e eritromicina, e se a ocorrência constante de antibiótico em água pode contribuir para o surgimento de GRAs.

Os níveis de ATBs encontrados no Arroio Diúvio estão de acordo com estudos semelhantes em todo o mundo [115]. Vários trabalhos mostram uma predominância de sulfonamidas, trimetoprim, macrolídeos e quinolonas [115,116]. Em relação a estudos similares realizados no Brasil, Monteiro *et al.* detectaram AMX, CFX e SMA em água superficial e potável no Rio de Janeiro, chegando a 105 ng L⁻¹ em águas superficiais, bem como ERT e AZT até 35 ng L⁻¹ [117]. Esses níveis se relacionam aos níveis médios presentes no Dilúvio durante todo o período de amostragem, como 60 ng L⁻¹ para SMA e 72 ng L⁻¹ para CFX.

Nossos resultados mostram que a classe com maior concentração são as quinolonas. Esses dados reforçam estudos prévios que mostram que as quinolonas são um grupo de ATBs sintéticos com maior relevância clínica, sendo uma das classes de agentes antimicrobianos mais frequentemente prescritas no mundo [118]. No entanto,

seu uso foi comprometido pelo crescente surgimento de cepas resistentes, que se tornou um problema clínico prevalente. A presença de quinolonas em quantidades relativamente altas no rio Dilúvio e a presença do gene *qnrS* em todas as amostras analisadas podem ser uma ameaça à saúde, uma vez que a resistência à quinolona mediada por plasmídeo (PMQR) fornece uma base favorável para a seleção de mecanismos de resistência adicionais e, portanto, para o surgimento de altos níveis de resistência às quinolonas. Além disso, estudos anteriores mostraram que genes *qnrS* são geralmente encontrados em plasmídeos multi-resistentes ligados a outros determinantes da resistência, como os genes de amplo espectro β -lactamase, *AmpC-type* β -lactamase e carbapenemase [119]. O PMQR é geralmente associado a um elemento móvel ou transponível. Tran e Jacoby mostram que o gene *qnrS1* está associado a um transposon superior *Tn3-like* em vários plasmídeos contendo um gene TEM-1 ativo [119]. Além disso, as fluoroquinolonas são recalcitrantes à biodegradação e transformação em sistemas aquosos, o que aumenta seu papel como contaminantes emergentes [120].

Os genes de resistência a sulfonamidas são um dos GRAs mais frequentemente detectados no meio aquático [121], o que também foi observado em nossos achados. Isso não é de surpreender, considerando que a associação sulfametoxazol-trimetoprim é amplamente utilizada no Brasil [122]. Considerando a alta extensão do metabolismo e transformação das sulfonamidas, a inclusão dos principais produtos do metabolismo da SMA, SDZ e TMP provavelmente poderia levar a níveis ainda mais elevados dessas substâncias nas águas superficiais.

A presença concomitante de ATBs e GRAs em amostras coletadas em junho e setembro de 2018 fornece evidências da correlação entre esses contaminantes emergentes. Esses achados estão de acordo com estudos similares realizados em outros corpos de água similares. Por exemplo, Liu *et al.* avaliou, entre outros, a abundância do gene de resistência a sulfonamida (*sul1*), do gene de resistência a quinolonas (*qnrS*) e do gene de resistência a macrolídeos (*ermB*) em um rio urbano em Beijing, China [123]. Esses autores observaram que *sul1* e *qnrS* tinham 100% de frequência de detecção e *ermB* 95,83%, levando à conclusão de que a maioria dos GRAs aumenta com o aumento da concentração de ATBs. De maneira semelhante, Bastos *et al.* analisaram a ocorrência de três genes de resistência bacteriana (*sul1*,

qnrA e *ermB*) para determinar os impactos das comunidades microbianas na aplicação de esterco em solo [124]. Eles observaram que altos níveis de GRAs presentes em solos que recebem esterco de animais alimentados com antibióticos e sugerem que a aplicação desse estrume amplifica a disseminação de resistências a antibióticos.

Aparentemente, as classes de ATBs predominantes e seus GRAs relacionados são constantes em todo o mundo. Na China, Yan *et al.* avaliaram a ocorrência de ATBs correlacionando com seus GRAs em um grande projeto hidrelétrico [125]. Em relação aos ATBs, as sulfonamidas e o trimetoprim apresentaram os maiores teores, acima das tetraciclina e das fluoroquinolonas, nas amostras de água, solo e sedimento. De acordo com os níveis de ATBs, o gene *sul1* foi dominante em todas as matrizes investigadas. As concentrações médias de TMP e SMA nas águas superficiais foram, respectivamente, 119,07 e 78,55 ng L⁻¹, níveis muito semelhantes aos determinados no Arroio Dilúvio.

Em outro estudo realizado nos rios da China, a presença de ATBs e GRAs também foi correlacionada com a composição da comunidade microbiana [126]. Dos 14 GRAs investigados por esses autores, foram detectados 2 GRAs de sulfa (*sul1* e *sul2*) e 5 GRAs de tetraciclina nos principais rios de Shenzhen, na China. A concentração média de ATBs para águas superficiais foi de 245 ng L⁻¹. Os níveis mais elevados foram encontrados para SDZ, STZ, AMP e LNC. O gene *sul1* foi o GRA predominante, enquanto a *Proteobacteria* foi o microrganismo mais abundante.

Esta foi a primeira avaliação da co-ocorrência de ATBs e GRAs em um rio urbano e destaca a necessidade de pesquisas adicionais para determinar corretamente o risco à saúde associados a esses contaminantes. Baseado em nossos dados atuais, um plano de monitoramento poderia ser estabelecido, incluindo a determinação quantitativa de GRAs, por análise de RT-PCR (PCR em tempo real), a fim de avaliar se o aumento sazonal de níveis de ATBs pode influenciar nos níveis de GRAs nos mesmos pontos de amostragem. Além disso, estudos adicionais também podem ser realizados para avaliar quais micro-organismos predominam nestes pontos de amostragem.

5. Conclusão

O método desenvolvido e validado para a quantificação de 40 antimicrobianos em águas superficiais por LC-MS/MS foi utilizado para a realização de um monitoramento ambiental nas águas do Arroio Dilúvio durante dois anos, com amostragens trimestrais. Antimicrobianos das classes β -lactâmicos, sulfonamidas, quinolonas e macrolídeos foram detectados e quantificados em todos os meses e pontos de amostragem. Devido à incidência destes ATBs, nos dois últimos meses foi realizada avaliação da presença de genes de resistência a antimicrobianos nas amostras. A presença de GRAs que conferem resistência a sulfonamida (*sul1*), β -lactâmico (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolona (*qnrS*) pode ser correlacionada com os ATBs das respectivas classes.

A ocorrência de GRAs na água tem sido associada à contaminação fecal, associada a um aporte constante de compostos com atividade bactericida ou bacteriostática, capazes de permitir seletividade na comunidade microbiana [127]. Assim, há uma necessidade de mais pesquisas sobre a correlação entre ATBs e GRAs em matrizes ambientais, especialmente em águas próximas às grandes áreas urbanas.

Os resultados do presente estudo mostram a qualidade da água no Arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre. Sabendo que o esgoto não tratado contém bactérias de origem humana, animal e ambiental e uma mistura de concentrações sub-terapêuticas de ATBs e outros agentes co-seletivos, concluímos que o Arroio Dilúvio se torna importante fonte de BRAs e GRAs devido aos grandes volumes lançados no meio ambiente.

CAPÍTULO III: Estudo de degradação e identificação de produtos de transformação de fármacos β -lactâmicos

1. Objetivos específicos

- Realizar estudo para cinética de degradação e identificar os principais metabólitos e produtos de transformação de alguns fármacos de amplo consumo utilizando ensaios de fotólise artificial, seguidos de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução.

2. Revisão bibliográfica

Vários autores relatam a atividade biológica dos antibióticos no ambiente [17,128]. Em alguns casos, não só o composto original é biologicamente ativo, mas também seus produtos de transformação (TPs), gerados pelo metabolismo e outros processos de degradação [17].

Conhecer as vias de degradação e transformação dos CE's é crucial por várias razões: 1) avaliar o risco associado aos CE's e seus TPs quando atingem o meio ambiente; 2) determinar a toxicidade de produtos desconhecidos e, 3) estudar processos para promover a remoção ou a completa degradação dos CE's em compostos não perigosos [2].

Amoxicilina (AMX) e ampicilina (AMP) são antibióticos da classe de β -lactâmicos amplamente utilizados na medicina humana e na produção animal. Mesmo doses baixas desses compostos podem mostrar efeitos biológicos. Vários autores relataram a presença de AMX e AMP em águas residuais urbanas, águas superficiais e água da torneira [129,130], e técnicas foram avaliadas para a remoção destes compostos a partir de matrizes aquosas [85].

Sabe-se que o metabolismo da AMX tem dois principais produtos: ácido amoxicilóico e amoxicilina piperazina-2,5-diona (DIKETO). Estes compostos não apresentam atividade antibiótica, no entanto, o ácido amoxicilóico pode ter propriedades alérgicas [131]. Alguns produtos secundários destes compostos foram obtidos após a hidrólise ácida [132].

Pérez-Parada *et al.* realizaram um estudo de degradação de AMX em condições ácidas e alcalinas (pH 2 e 10, respectivamente): a degradação de AMX foi espontânea e

rápida em ambas as condições (menos de 5 min). A degradação completa de AMX em meio alcalino foi alcançada em 24 h, enquanto que em meios ácidos, após 5 dias, os resíduos de AMX ainda foram identificados [129].

Alguns TPs formados por AMX, AMP e outros antibióticos β -lactâmicos são de grande preocupação, como o ácido penicilóico, pois podem estar relacionados com toxicidade e desenvolvimento de processos alérgicos [131,133,134].

Para AMP, os processos de transformação são muito semelhantes aos observados para AMX. Os TP identificados para AMP geralmente mostram uma diferença de 16 amu do produto equivalente da AMX.

Em termos de metabolismo, geralmente grande parte dos antibióticos β -lactâmicos é excretada sob a forma inalterada. Tanto para AMX como para AMP, os principais produtos de metabolismo são os respectivos ácidos penilóicos, ácidos penicilóicos e diketopiperazinas. No caso de AMP, a formação dos dois epímeros de estereoisômeros (3S, 5R) e (3S, 5S) do ácido penilóico foi demonstrada por Suwanrumpha *et al.* [135].

Como AMP e AMX contêm grupos básicos e ácidos, eles são capazes de gerar moléculas protonadas e desprotonadas. Porém, a maioria das análises de LC-MS/MS é realizada utilizando ionização no modo positivo.

O padrão de fragmentação de MS/MS da AMX é bem conhecido: AMX (m/z 366) facilmente perde uma amônia para formar o íon com razão massa/carga (m/z 349). Essa fragmentação também ocorre em AMP (m/z 350 > 333), mas é mais eficiente para AMX, devido à presença do grupo hidroxila, que permite a formação de uma estrutura mais estável [136].

Outro fragmento intenso para AMX é o íon m/z 208 (para AMP, m/z 192). Mecanismos plausíveis de formação para esses fragmentos foram propostos por vários autores [129,136,137].

Tanto para AMX como para AMP, é evidente a presença intensa do íon m/z 160 (ácido carboxílico tiazolidina), que é geralmente usado como um fragmento marcador para penicilinas em métodos quantitativos usando LC-MS/MS. Este fragmento pode ser observado não apenas para os compostos parentais, mas está presente em vários TPs de AMX e AMP [132,133,136]. Este fragmento ($C_6H_{10}NO_2S$) é formado pela quebra de duas ligações no anel de β -lactâmico.

Outro fragmento intenso observado para AMX é m/z 114. Embora vários autores tenham proposto que esse fragmento seja originado do m/z 160 [137], Franski *et al.* observam que este fragmento não foi encontrado para AMP e propôs que este fragmento deve ser ligado ao grupo hidroxila e possivelmente derivado de m/z 208 [136].

Outros fragmentos menores observados para AMX estão relacionados à perda de um carbonila do anel β -lactâmico e descarboxilação adicional (m/z 321, m/z 277, m/z 305) e clivagem do anel (m/z 234, m/z 208). Também é relatada a perda de um grupo fenol da cadeia lateral da forma desaminada de AMX (m/z 349,0849 > 255,0429) [138].

Para AMP, outros fragmentos intensos foram m/z 106 e m/z 174, o que provavelmente corresponde à ruptura de uma ligação C-C e a ruptura de duas ligações no anel β -lactâmico, respectivamente. Também se presume que o fragmento m/z 174 de AMP corresponde ao fragmento m/z 190, que é observado para AMX, mas geralmente apresentam baixa intensidade [136].

No Brasil, há poucos trabalhos sobre a ocorrência de AMX, AMP e seus TPs em águas superficiais e águas residuais [139]. Em um efluente industrial de uma empresa farmacêutica (produtor de AMX), foram encontrados resíduos de AMX, sugerindo que o tratamento efluente (hidrólise alcalina) não foi eficiente para completar a remoção/degradação de AMX e subprodutos [139]. Também é importante ressaltar que o Brasil é um importante mercado consumidor desses antibióticos: no período de 2004 a 2010, o Brasil importou mais de 6.191 toneladas de AMX e mais de 561 toneladas de AMP.

3. Materiais e métodos

3.1. *Estudo de cinética de degradação e identificação de metabólitos e produtos de transformação de β -lactâmicos (AMX e AMP) utilizando ensaios de fotólise artificial, seguidos de análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-Orbitrap-MS).*

Para o estudo de degradação, padrões analíticos de ampicilina tri-hidratada (AMP) e amoxicilina tri-hidratada (AMX) foram adquiridos da Fluka AG (Buchs, Suíça) com um mínimo de 90% de pureza. A acetonitrila (ACN) e o metanol (MeOH), todos de grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), respectivamente. O ácido fórmico (FA) foi adquirido a J.T.Baker. O grau de HPLC de água foi fornecido pela Fischer Scientific.

Soluções padrão de estoque de 1 mg mL^{-1} foram preparadas em água de grau HPLC. O perfil de degradação de AMX e AMP foi avaliado utilizando soluções de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de AMX ou AMP e preparado com água de grau HPLC e água de rio real. O pH médio das águas do rio e da HPLC foi de 9,25 e 6,74, respectivamente. O valor médio de condutividade para água do rio e HPLC foi de $-125,3$ e $4,6 \text{ } \mu\text{S/cm}$, respectivamente. O efeito do solvente foi avaliado utilizando soluções de 200 ng mL^{-1} de cada antibiótico em HPLC de água, ACN, H_2O : ACN (1: 1) e H_2O : MeOH (1: 1), cada um com ou sem 0,1% ácido fórmico.

A fim de elucidar a cinética da degradação e a identificar os produtos de transformação (TPs) de AMX e AMP em ecossistemas naturais, as amostras de águas foram submetidas a experimentos de fotólise sob luz solar simulada. O perfil de degradação, bem como a tentativa de atribuição de estruturas de TP, foram obtidos usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem com detecção por Orbitrap-MS. Esta etapa do trabalho foi realizada no *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua do Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (IDAEA-CSIC – Barcelona/ES), sob orientação da Dra. Sílvia Díaz Cruz e do Dr. Damià Barceló.

Os experimentos de fotodegradação foram conduzidos sob condições simuladas de irradiação solar num simulador Suntest CPS. O sistema foi equipado com uma lâmpada de arco de xenônio e filtros de vidro apropriados para restringir a transmissão de comprimentos de onda de irradiação abaixo de 290 nm, proporcionando um espectro de comprimento de onda similar à luz solar. A intensidade da lâmpada foi ajustada para uma irradiância de 500 Wm^{-2} correspondente a uma dose de luz de $1800 \text{ kJ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. As amostras irradiadas no aparelho Suntest foram contidas em frascos de quartzo de 20 mL com tampa. Após, as soluções foram retiradas e congeladas imediatamente.

Foram coletadas alíquotas de 50 μL do aparelho de fotólise e diluídas para 1,0 mL com H_2O : MeOH (95: 5) e armazenadas no congelador até o momento da análise. Assim, a concentração final de cada antibiótico nos frascos foi de 500 ng mL^{-1} . Inicialmente, uma alíquota foi tomada nos momentos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 min do experimento de fotólise; depois disso, as amostras seguiram sendo coletadas em 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 48 e 72 horas.

Experimentos de determinação de massa exata foram realizados UPLC Waters Acquity (Waters, Manchester, UK) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap Q Exactive (Thermo-Fisher, San Jose, CA). Os parâmetros da fonte de ionização por *electrospray* foram ajustados como se segue: polaridade (+), tensão de pulverização +3,5 kV, temperatura do aquecedor 300°C e temperatura capilar 350°C. A resolução de monitorização de íons selecionada (SIM) foi de 70000 e a resolução de dd-MS2 (MS-MS/MS) foi de 17500.

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Acquity UPLC BEH C18 (2,1 \times 50 mm, 1,7 μm). A fase móvel foi composta por (A) metanol com ácido fórmico a 0,1% e (B) água com ácido fórmico a 0,1%. O gradiente otimizado para a separação começa com 95% de B durante 6 minutos e decresce linearmente para 5% em 6 minutos e mantém-se durante 2 minutos. Finalmente, B% aumenta linearmente em 1 minuto para atingir 95% e mantendo-se até 13 minutos. O fluxo foi de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ com a coluna à 40°C. O volume de injeção foi de 10 μL .

O software MZmine 2.28 (<http://mzmine.github.io/>) foi utilizado no tratamentodos dados obtidos no UPLC-Orbitrap-MS [31]. ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net/downloads.shtml>) foi usado como conversor de formato para alterar o formato dos arquivos Thermo para .mzXML, uma extensão aberta e universal que foi necessário para tornar possível o processamento de dados por Mzmine.

A lista de m/z nas amostras foi obtida após a aplicação de algumas restrições, como o intervalo de massa (m/z 80-1100) e a detecção de massa (ruído < 1.0E2). A lista foi simplificada pela remoção de m/z cuja intensidade de sinal em amostras em branco era maior ou igual em amostras de teste.

Além disso, a revisão da literatura científica foi usada para construir um banco de dados de TPs de AMX e AMP. O banco de dados desenvolvido foi utilizado para

investigar a presença de AMX, AMP e seus TPs em efluentes reais e amostras industriais de águas residuais industriais do Brasil.

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo de cinética de degradação e identificação de metabólitos e produtos de transformação de amoxicilina e ampicilina

Para identificar os TPs de AMX e AMP, foi realizada uma busca na literatura e a composição elementar para produtos de fotólise, hidrólise, metanólise e metabolismo previamente relatados foi compilada [129,132,133,136,137,140–145]. Um banco de dados para 52 e 15 possíveis TPs para AMX e AMP, respectivamente, foi elaborado e aplicado para todas as amostras (Tabelas 11, 12 e 13).

Tabela 11. Base de dados de produtos de transformação de amoxicilina (TPs) para pesquisa em amostras experimentais e reais.

| TPs | m/z (exp) | m/z (teo) | Fragmentos | Ref |
|--------------------------|-----------|--|---|-------------------|
| AMX | 366,1116 | 366,1116 [C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S] ⁺ | 349,0849 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ S] ⁺ 321,0895 [C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₄ S] ⁺ 305,0950 277,1006 255,0429 234,0429 208,0423 [C ₁₀ H ₁₀ O ₂ NS] ⁺ 160,0425 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 114,0374 [C ₄ H ₄ ONS] ⁺ | [133,136,146–148] |
| AMX desaminada | 349,0849 | 349,0848 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ S] ⁺ | | [133,136,146–148] |
| Ácido penilóico AMX | 340,1323 | 340,1326 [C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S] ⁺ | 323,1056 [C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S] ⁺ 295,1112 [C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₃ S] ⁺ 277,1002 [C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₂ S] ⁺ 229,0638 [C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃ S] ⁺ 189,0688 [C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S] ⁺ 160,0423 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ | [133,136,146–148] |
| Diketopiperazina AMX | 366,1116 | 366,1118 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S] ⁺ | 207,0762 [C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃] ⁺ 160,0427 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 113,0344 [C ₄ H ₅ N ₂ O ₂] ⁺ | [133,136,146–148] |
| Ácido penicilóico AMX | 384,1226 | 384,1224 [C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₆ S] ⁺ | 367,0955 [C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₆ S] ⁺ 340,1322 [C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₄ S] ⁺ 323,1058 [C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₄ S] ⁺ 189,0690 [C ₇ H ₁₃ N ₂ O ₂ S] ⁺ 160,0424 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ | |

| | | | | |
|---|----------|---|--|-----------|
| Ácido amoxicilónico metil éster | 398,1378 | 398,1386 [C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₆ S] ⁺ | 381,1109 349,0852 [C ₁₆ H ₁₇ O ₂ N ₂ O ₅ S] ⁺ 335,1060 249,0868 222,0746 194,0822 160,0424 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ | [136,146] |
| 4-Hidroxifenilglicil AMX | 515,1607 | 515,1607 [C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O ₇ S] ⁺ | 498,1335 [C ₂₄ H ₂₄ N ₃ O ₇ S] ⁺ 339,1 160,0425 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 122,0606 [C ₇ H ₈ NO] ⁺ 114,0374 [C ₄ H ₄ ONS] ⁺ | [147] |
| AMX-S-óxido | 382,1073 | 382,1073 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₆ S] ⁺ | 365,08073 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₆ S] ⁺ 337,08581 [C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₅ S] ⁺ 247,0713 [C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₅ S] ⁺ 160,0444 [C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₄] ⁺ 763,20673 [C ₃₂ H ₃₉ N ₆ O ₁₂ S ₂] ⁺ (dimer) | [149,150] |
| Ácido tiazolidinecarboxílico | 160,0437 | 160,0444 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ | 114,0372 [C ₄ H ₄ ONS] ⁺ | [150] |
| 4-hidroxifenilglicina | 168,0655 | 168,0655 [C ₈ H ₉ NO ₃] ⁺ | | [147] |
| Ácido aminopenicilânico | 217,0636 | 217,0636 [C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ S] ⁺ | | [147] |
| N-pivaloil-4-hidroxifenilglicina | 252,1230 | 252,1230 [C ₁₃ H ₁₇ NO ₄] ⁺ | | [147] |
| PP-2-OH-3-(4-OH) fenilpirazina | 189,0654 | 189,0654 [C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂] ⁺ 211,0483 [M + Na] ⁺ | 171,0558 [C ₁₀ H ₇ N ₂ O] ⁺ 161,0715 [C ₉ H ₉ N ₂ O] ⁺ | [148] |
| Penicilamina disulfida | 297,0943 | 297,0942 [C ₁₀ H ₂₁ N ₂ O ₄ S ₂] ⁺ | 182,0318 [C ₅ H ₁₂ NO ₂ S ₂] ⁺ 180,0149 [C ₅ H ₁₀ NO ₂ S ₂] ⁺ 150,0583 [C ₅ H ₁₂ NO ₂ S] ⁺ | [148] |
| Ácido L-5,5-dimetiltiazolidin-4-carbônico | 162,0590 | 162,0589 [C ₆ H ₁₂ NO ₂ S] ⁺ | 145,0320 [C ₆ H ₉ O ₂ S] ⁺ 116,0536 [C ₅ H ₁₀ NS] ⁺ 87,0272 [C ₄ H ₇ S] ⁺ | [148] |
| Ácido 2-((E)-[5-(4-hidroxi-fenil)-3,6-dioxo-3,6-diidropirazina-2(1H)-ilideno]metil)amino)-3-metil-3-sulfanilbutanoico | 364,0969 | 364,0967 [C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₅ S] ⁺ | 244,0720 [C ₁₂ H ₁₀ N ₃ O ₃] ⁺ 215,0455 [C ₁₁ H ₇ N ₂ O ₃] ⁺ 187,0511 [C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂] ⁺ 159,0561 [C ₉ H ₇ N ₂ O ₂] ⁺ 132,0454 [C ₈ H ₆ NO] ⁺ | [148] |
| Ácido 2-[amino(carboxi)-metil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico | 235,0755 | 235,0753 [C ₈ H ₁₅ N ₂ O ₄ S] ⁺ | | [148] |
| Ácido dehidrocarboxilado AMX ácido penilóico | 316,1100 | 316,1096 [C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₂ NaS] ⁺ | 277,1013 [C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₂ S] ⁺ | [148] |
| 2-amino-2-(4-hdroxifenil)-N-((Z)-[3-(4-hidroxifenil)-2-oxo- | 381,1560 | 381,1563 [C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₄] ⁺ | 364,1297 [C ₂₀ H ₁₈ N ₃ O ₄] ⁺ 336,1348 [C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₃] ⁺ 230,0930 [C ₁₂ H ₁₂ N ₃ O ₂] ⁺ | [148] |

| | | | | |
|---|----------|---|---|-------|
| 2,3,6,7-tetrahidro-1H-1,4-diazepin-5-il]metilideno)-acetamida | | | 215,0821 [C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₂] ⁺ | |
| Amoxicilina peniciloaldeído | 209,0921 | 209,0921 [C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃] ⁺ | | [147] |
| Ácido Amoxicilina ácido penaldico | 253,0819 | 253,0819 [C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₅ S] ⁺ | | [147] |
| Produto de fotólise III | 354,1132 | 354,1132 [C ₁₅ H ₂₀ N ₃ O ₅ S] ⁺ | 337,0855 [C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₅ S] ⁺ 319,0744 [C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ S] ⁺ 293,0957 [C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₃ S] ⁺ 193,0611 [C ₉ H ₉ N ₂ O ₃] ⁺ 159,0586 [C ₈ H ₁₁ N ₂ OS] ⁺ 130,0322 [C ₈ H ₈ NOS] ⁺ 107,0493 [C ₇ H ₇ O] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise V | 400,1172 | 400,1172 [C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₇ S] ⁺ | 383,0907 [C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₇ S] ⁺ 365,0801 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₆ S] ⁺ 339,1009 [C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₅ S] ⁺ 235,0747 [C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₄ S] ⁺ 160,0426 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 122,0600 [C ₇ H ₈ NO] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise VI | 383,090 | 383,090 [C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₇ S] ⁺ | 365,0801 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₆ S] ⁺ 339,1009 [C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₅ S] ⁺ 235,0747 [C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₄ S] ⁺ 160,0426 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 122,0600 [C ₇ H ₈ NO] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise VII | 310,1219 | 310,1219 [C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₃ S] ⁺ | 293,0954 [C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₃ S] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise VIII | 231,0434 | 231,0434 [C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₄ S] ⁺ | 253,0253 [C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₄ NaS] ⁺ 160,0426 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 102,0913 [C ₆ H ₁₁ NO] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise IX | 428,0758 | 428,0758 [C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₉ S] ⁺ | 450,0577 [C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₉ NaS] ⁺ 410,0652 [C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₈ S] ⁺ 384,0859 [C ₁₅ H ₁₈ N ₃ O ₇ S] ⁺ 160,0426 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 94,0399 [C ₄ H ₄ N ₃] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise X | 176,0375 | 176,0375 [C ₆ H ₁₀ NO ₃ S] ⁺ | 158,0270 [C ₆ H ₈ NO ₂ S] ⁺ 130,0321 [C ₅ H ₈ NOS] ⁺ 102,0371 [C ₄ H ₈ NS] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise XI | 294,1270 | 294,1270 [C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₂ S] ⁺ | 277,1008 [C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₂ S] ⁺ 189,0663 [C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₂] ⁺ 171,0549 [C ₁₀ H ₇ N ₂ O] ⁺ | [147] |
| Produto de fotólise XII | 412,0811 | 412,0811 [C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₈ S] ⁺ | 434,0630 [C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₈ NaS] ⁺ 189,0670 [C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₂] ⁺ 160,0426 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ | [147] |

Fonte: a autora.

Tabela 12. Base de dados de produtos de transformação de ampicilina (TPs) para pesquisa em amostras experimentais e reais.

| TPs | m/z (exp) | m/z (theo) | Fragments | Ref |
|--|-----------|--|--|--------------------|
| AMP | 350,1175 | 350,1169 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₄ S] ⁺ | 333,0923 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ S] ⁺ 192,0487 [C ₁₀ H ₁₀ NOS] ⁺ 174,0552 [C ₁₀ H ₈ NO ₂] ⁺ 160,0429 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 106,0648 [C ₇ H ₈ N] ⁺ | [136,140] |
| AMP desaminada | 333,0922 | 333,0922 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ S] ⁺ | | [136,140] |
| Ácido penicilóico AMP | 368,1278 | 368,1275 [C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₅ S] ⁺ | 324,1367 307,1122 279,1140 | [136,140] |
| Ácido penilóico AMP | 324,1377 | 324,1376 [C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₃ S] ⁺ | 307 279 268 | [136,140] |
| AMP diketopiperazina | 350,1175 | 350,1169 [C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₄ S] ⁺ | 213 191 160,0429 114 | [136,140] |
| Ácido ampicilóico metil éster | 382,1437 | 382,1437 [C ₁₇ H ₂₂ N ₃ O ₆ S] ⁺ | 365,1170 [C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₅ S] ⁺ 333,0888 [C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ S] ⁺ 319,1112 [C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₃ S] ⁺ 233,0922 [C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃] ⁺ 223,1080 [C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₃] ⁺ 206,0821 [C ₁₁ H ₁₂ NO ₃] ⁺ 178,0863 [C ₁₀ H ₁₂ NO ₂] ⁺ 160,0435 [C ₆ H ₁₀ NO ₂ S] ⁺ 106,0651 [C ₇ H ₈ N] ⁺ | [136] |
| (Z)-2-amino-N-((2-oxo-3-fenil-2,3,6,7-tetrahydro-1H-1,4-diazepin-5-il)metileno)-2-fenilacetamida | 349,1659 | 349,1659 [C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₂] ⁺ | 332,1392 [C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₂] ⁺ 304,1449 [C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O] ⁺ 216,1129 [C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O] ⁺ 199,0866 [C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O] ⁺ 187,0857 [C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O] ⁺ 181,0758 [C ₁₂ H ₈ N ₂] ⁺ 171,0914 [C ₁₁ H ₁₀ N ₂] ⁺ | [140] |
| Ácido 2-(1-(2-amino-2-fenilacetamido)-2-((carboxi(fenil)metil)amino)-2-oxoetil-5,5,-dimetil-4,5-diidrotiazol-4-carboxílico | 499,1678 | 499,1646 [C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O ₆ S] ⁺ | 350,1165 [C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S] ⁺ 333,0905 [C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄ S] ⁺ 305,0954 [C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃ S] ⁺ 259,0710 [C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₄] ⁺ 322,1222 [C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃ S] ⁺ 340,1333 [C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₄ S] ⁺ 191,0818 [C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂] ⁺ 160,0428 [C ₆ H ₉ NO ₂ S] ⁺ | [140] |
| 3-fenirazine-2-ol | 173,0711 | 173,0709 [C ₁₀ H ₉ N ₂ O] ⁺ | 155 128 104 77 | [140] |
| dímero fechado AMP | 699,2265 | 699,2269 [C ₃₂ H ₃₉ N ₆ O ₈ S ₂] ⁺ | 540,1838 350,1175 333,0918 160,0427 | [140], este estudo |
| Ácido (E)-2-(((3,6-dioxo-5-fenil-1,6- | 348,1013 | 348,0996 [C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S] ⁺ | 330,0894 [C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃ S] ⁺ 302,0957 | [140] |

| | | | | |
|---|-----------|--|---|-----------|
| diidropirazin-2(3H)- ilideno) metil)amino)-3- mercapto-3- metilbutanóico | | | [C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂ S] ⁺ 268,1061 [C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂] ⁺ 228,0757 [C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₂] ⁺ 199,0501 [C ₁₁ H ₆ N ₂ O ₂] ⁺ 171,0546 [C ₁₀ H ₆ N ₂ O] ⁺ 143,0605 [C ₉ H ₆ N ₂] ⁺ | |
| Ácido 5- (amino(fenil)metil)- 7-formil- 2,2-dimetil-2,3- diidroimidazo [5,1-b]tiazol-3- carboxílico | 332,1067 | 332,1063 [C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₃ S] ⁺ | 315,0787 [C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃ S] ⁺ 304,1108 [C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ S] ⁺ 286,1004 [C ₁₅ H ₁₅ N ₃ OS] ⁺ 200,0814 [C ₁₁ H ₉ N ₃ O] ⁺ | [140] |
| dímero aberto AMP | 717,2374 | 717,2371 [C ₃₂ H ₄₁ N ₆ O ₉ S ₂] ⁺ | 673 514 324 174 160 106 | [140] |
| Trímero aberto AMP | 1066,3477 | 1066,3467 [C ₄₈ H ₆₀ N ₉ O ₁₃ S ₃] ⁺ | 1022 514 333 160 114 | [140] |
| Trímero fechado AMP | 1048,3365 | 1048,3362 [C ₄₈ H ₅₈ N ₉ O ₁₂ S ₃] ⁺ | 889,3 730,3 571,2 160 114 | [140,142] |
| D-fenilglicilampicilina | 483,1690 | 483,1697 [C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O ₅ S] ⁺ | 439,1 350 267 239,1 | [140,142] |
| Decarboxilaciona dímero aberto AMP | 673,2478 | 673,2473 [C ₃₁ H ₄₁ N ₆ O ₇ S ₂] ⁺ | | [140,142] |

Fonte: a autora.

Tabela 13. Outros m/z menos intensos para produtos de transformação (TPs) de AMX de acordo com Hirte *et al.* [143]

| Experimental mass | Molecular formula | Calculated mass | Observation |
|-------------------|---|-----------------|----------------------------------|
| 150,0554 | C ₈ H ₈ NO ₂ | 150,0555 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 206,0482 | C ₇ H ₁₂ NO ₄ S | 206,0487 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 217,0591 | C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃ Na | 217,0589 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 207,0773 | C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃ | 207,0770 | Produto de hidrólise pH 7 |
| 137,0716 | C ₇ H ₉ N ₂ O | 137,0715 | Produto de hidrólise pH 7 |
| 366,1330 | C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅ S | 366,1124 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 325,0896 | C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₅ S ₂ | 325,0892 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 249,1239 | C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₃ | 249,1239 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 249,1240 | C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₃ | 249,1239 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 247,0720 | C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₄ | 247,0719 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 234,0623 | C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ | 234,0622 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 192,0662 | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₃ | 192,0661 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 245,0929 | C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃ | 245,0926 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 205,0619 | C ₁₀ H ₉ N ₂ O ₃ | 205,0613 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 203,0818 | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ | 203,0821 | Produto de hidrólise pH 3 e 7 |
| 245,0540 | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₄ Na | 245,0538 | Produto de hidrólise pH 3 |
| 731,2161 | C ₃₂ H ₃₉ N ₆ O ₁₀ S ₂ | 731,2169 | AMX – dímero ác. Penicilóico AMX |
| 204,0634 | C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃ Na | 204,0637 | AMX impuro |
| 397,1515 | C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₅ | 397,1512 | Produtos de dimerização |
| 397,1519 | C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₅ | 397,1512 | Produtos de dimerização |
| 381,1204 | C ₁₉ H ₁₇ N ₄ O ₅ | 381,1199 | Produtos de dimerização |
| 415,1633 | C ₂₀ H ₂₃ N ₄ O ₆ | 415,1618 | Produtos de dimerização |
| 378,1124 | C ₁₇ H ₂₀ N ₃ O ₅ S | 378,1124 | Produtos de dimerização |
| 749,2273 | C ₃₂ H ₄₁ N ₆ O ₁₁ S ₂ | 749,2275 | Dímero ác. Penicilóico AMX |

4.2. Análise de amoxicilina e ampicilina

Para analisar TPs altamente hidrofílicos, recomendam-se colunas destinadas a reter compostos hidrofílicos. Por exemplo, Nagelle e Moritz usaram para analisar TPs de AMX uma coluna capilar "HILIC-like" (colunas de interação hidrofílica - fase estacionária fortemente polar utilizada em combinação com fase móvel com alta porcentagem de solvente orgânico) [132]. Não obstante, as colunas de fenil, C₈ ou C₁₈ também são capazes de realizar uma separação cromatográfica adequada desses compostos.

Embora AMX e AMP possam ser analisados por espectrometria de massa usando polaridade negativa para ionização, o uso de ionização positiva é mais frequente na literatura [136]. Alguns casos comuns relacionados com a análise das penicilinas utilizando MS foram observados em nosso estudo: a ocorrência de metanólise parcial de AMX e AMP e a desaminação na fonte de AMX, mesmo em solução padrão (m/z 366 > 349).

Assim, o uso de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) juntamente com o banco de dados *contruido*, permite a investigação de compostos *untargets* bem

voltada nas amostras, que podem ser posteriormente confirmados e/ou quantificados usando um padrão analítico adequado.

4.2.1. Fotólise

A cinética de fotólise de AMX e AMP na água do rio ocorre de acordo com a cinética de pseudo-primeira ordem (Figuras 19 e 20). As constantes calculadas a 30°C foram $k_{AMX} = 0,2169 \text{ h}^{-1}$ e $k_{AMP} = 0,148 \text{ h}^{-1}$.

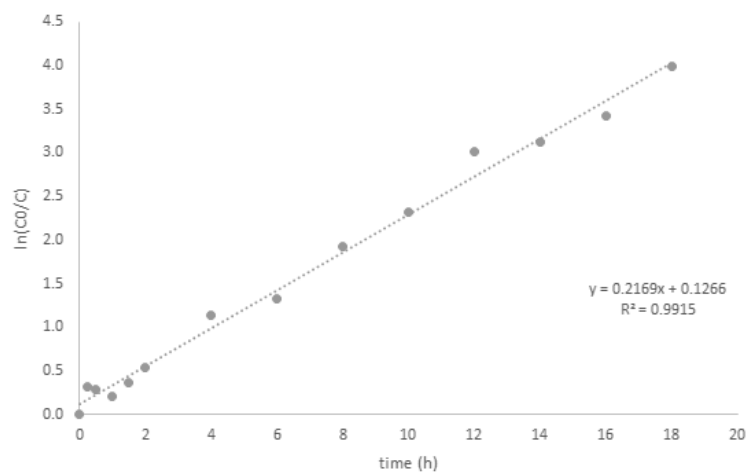


Figura 19. Gráfico de concentração/tempo linearizado de cinéticas de pseudo-primeira ordem para fotólise de AMX. A inclinação da reta de regressão é igual à constante de taxa global $k_{AMX} [\text{h}^{-1}]$. Fonte: a autora.

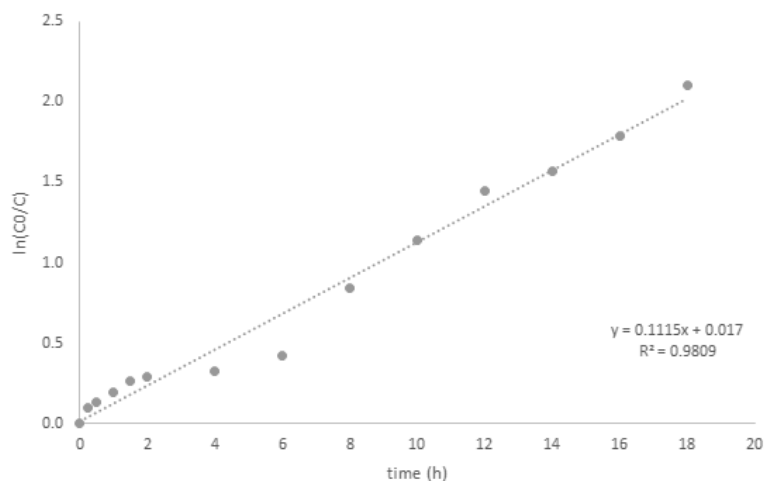


Figura 20. Gráfico de concentração/tempo linearizado de cinética de pseudo-primeira ordem para fotólise de AMP. A inclinação da reta de regressão é igual à constante de taxa global $k_{AMP} [\text{h}^{-1}]$. Fonte: a autora.

Outros autores investigaram o papel da metanólise na análise de AMX e AMP e concluíram que o uso de metanol, mesmo como eluente para a extração em fase sólida, pode levar à formação de derivados de éster metílico de AMX (m/z 398,1378) e AMP (m/z 382,1437) [129,136].

Hirte *et al.* também observam a epimerização de D-AMX sob pH 7 e em uma extensão menor em pH 11. A epimerização da cadeia de aminoácidos leva à formação de L-AMX. O pico designado como L-AMX foi detectado logo após o início das experiências de hidrólise. Vários íons de adutos de AMX também foram descritos por Hirte *et al.*, incluindo $[AMX + Na]^+$ (m/z 388), $[AMX + K]^+$ (m/z 404), bem como um dímero $[2 AMX + H]^+$ (m/z 731). O espectro de massa altamente similar, incluindo os íons de adutos, foi usado por esses autores para propor a epimerização de D-AMX para L-AMX [143].

Nossos resultados mostram que AMP e AMX têm uma rápida transformação sob fotólise, mas sem mineralização significativa, considerando que AMX e AMP ainda estavam presentes após um tempo de reação de 24 h [151]. Moreira *et al.* relataram resultados semelhantes para AMX, utilizando fotólise direta com irradiação UV/Vis de 300 nm. Outros autores relataram resultados semelhantes para AMX sob fotólise em 365 nm e 280 nm [130].

4.2.2. Identificação de produtos de transformação

4.2.2.1. Ampicilina

A partir dos dados de fotólise, pode-se observar que o AMP é relativamente estável nas condições experimentais. Após 72 h de irradiação, AMP ainda foi detectado. O padrão de fragmentação AMP estava de acordo com o relatado anteriormente na literatura, com um pico a m/z 350,1165 [136,140,142]. O perfil de fragmentação da AMP foi descrito por vários autores [140,142]. Usando a pesquisa de banco de dados, três TPs de AMP foram detectados e confirmados por dados MS2 (dímero de AMP, éster metílico de ácido ampicilóico e ácido penicilóico AMP). O cromatograma de íon extraído (XIC) e o espectro MS2 para esses compostos são mostrados na Figura 21.

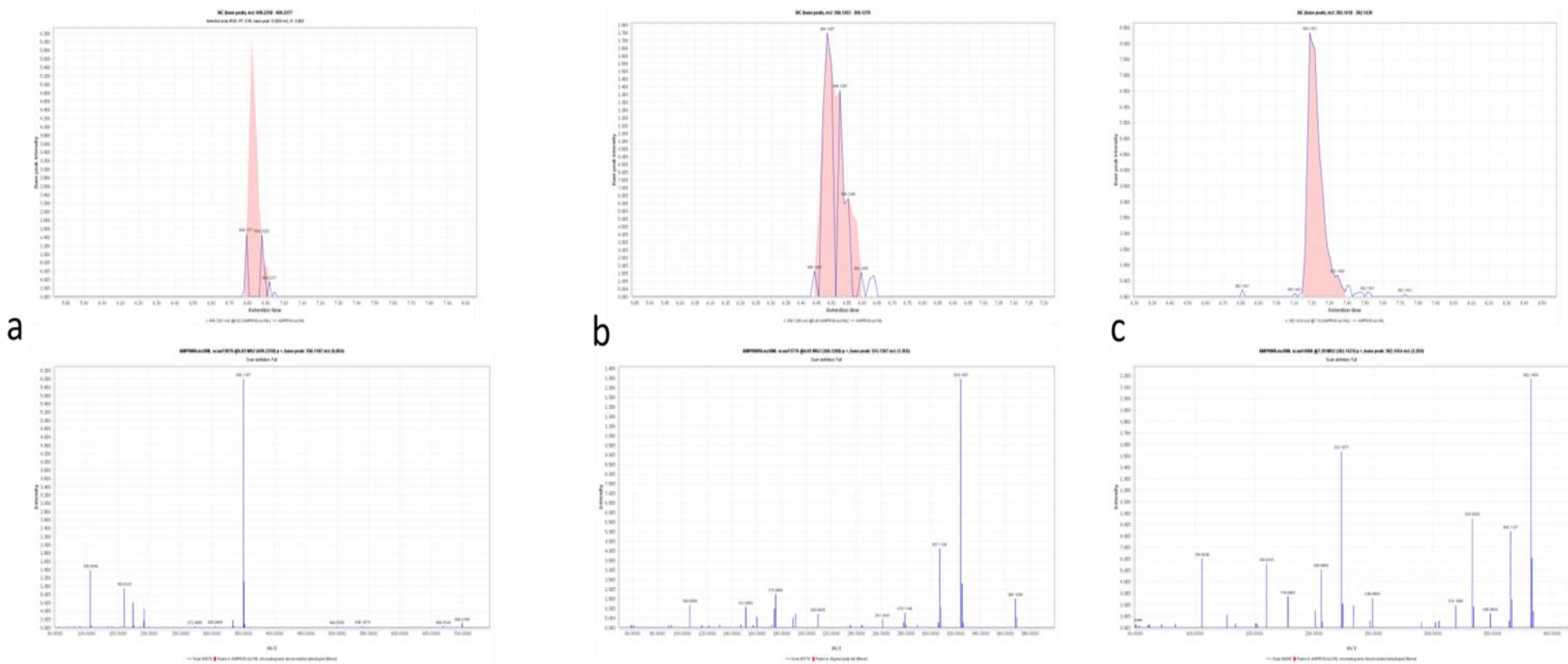


Figura 21. Cromatograma de íon extraído (XIC) e espectro MS2 para dímero AMP fechado (a), ácido penicílico AMP (b) e éster metílico do ácido ampicílico (c).

Fonte: a autora

O ácido penicilóico de AMP também foi relacionado por outros autores como um TP intenso em fotólise e hidrólise. Este composto também é um dos principais produtos de metabolismo da AMP e sua estrutura e padrão de fragmentação foi proposto por vários autores [130,135,140,142]. Franski *et al.* descobriu que o ácido penicilóico de AMP é o principal produto de hidrólise da AMP, de forma semelhante à observada para AMX [136].

A presença de éster metílico do ácido ampicilóico, um produto bem conhecido da metanólise AMP, foi provavelmente causada pela utilização de metanol como solvente de diluição para as amostras de fotólise e também foi utilizado como um componente de fase móvel no UHPLC-MS2. Os produtos de metanólise AMP e AMX foram discutidos em detalhes por Pérez-Parada *et al.* e Franski *et al.* [129,136].

O dímero de AMP é um composto relacionado ao AMP, anteriormente descrito por outros autores [140,142]. Outros três TPs de AMP também foram detectados com base na massa exata, mas com intensidade não alta o suficiente para permitir uma fragmentação MS2 adequada para confirmar sua identidade. Também foram identificados os ácido AMP penilóico (m/z experimental 324,1371 vs. 324,1376 calculado), 3-fenirazina-2-ol (experimental m/z 173.0708 experimental vs. 173,0709 calculado) e ácido (E)-2-(((3,6-dioxo-5-fenil-1,6-dihidropirazina-2(3H)-ilideno)metil)amino)-3-mercapto-3-metilbutanóico (m/z experimental 348,1006 vs. 348.1013 calculado) [140].

A forma desaminada de AMP não foi detectada, em contraste com a observada para AMX. Contudo, isso está de acordo com os resultados de outros autores, uma vez que a perda de amônia é mais eficiente a partir de AMX do que de AMP porque o grupo hidroxila em AMX facilita a formação de uma estrutura de quinona mais estável [136].

4.2.2.2. Amoxicilina

Os dados obtidos a partir dos experimentos de fotólise mostraram uma rápida degradação de AMX acompanhada pela formação de vários TPs. AMX, AMX desaminado e éster metílico do ácido amoxicilóico foram detectados em todas as amostras, com uma diminuição evidente desde a amostra RW0.

Conforme mencionado anteriormente, AMX desaminada (m/z 349,0849) pode ser formada pela degradação AMX na fonte do espectrômetro de massa e não necessariamente pela degradação promovida pela fotólise. Este composto foi detectado após 2 h de irradiação e foi indetectável após 12 horas em amostras de RW e LC.

O éster metílico do ácido amoxicilóico (m/z 398,1364) é designado como produto da metanólise AMX. O padrão de fragmentação deste composto foi proposto por Pérez-Parada *et al.* e Franski *et al.* [129,136]. De acordo com esses autores, o composto é formado durante a análise e não no processo de fotólise. O padrão de fragmentação obtido no presente estudo está de acordo com os achados de Pérez-Parada *et al.* [8] com predominância do produto íons m/z 381, 349, 194 e 160.

O íon m/z 189,0654 corresponde a PP-2-OH-3-(4-OH) fenilpirazina, que é um composto estável atribuído como produto final dos processos de transformação da AMX. Este composto foi detectado apenas nas duas últimas amostras.

Foi detectado um presumido dissulfureto de penicilamina (m/z 297,0942, $[C_{10}H_{21}N_2O_4S_2]^+$) na última amostra da experiência de fotólise. A caracterização deste composto e sua via de fragmentação foi proposta por Hirte *et al.* [143].

O íon m/z 340,1328, que pode ser identificado como o ácido penilóico AMX, foi observado entre 4 e 10 h de irradiação em amostras de RW e LC.

O ácido penicilóico AMX (m/z 384,1229) foi observado apenas em amostras de RW após 5 h. Após 10 h, o composto não era detectável. Considerando as diferenças de pH entre as amostras de RW e LC, pode-se supor que a formação deste composto é favorecida em meio alcalino.

Na última amostra da fotólise AMX, detectou-se um fragmento com m/z 381.1563. Com base na sua fragmentação MS2 e na comparação com dados previamente publicados, este TP foi identificado como 2-amino-2-(4-hidroxifenil)-N - {(Z)-[3-(4-hidroxifenil)-2-oxo-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-1,4-diazepin-5-il]metilideno}-acetamida, um produto de dimerização de AMX (m / z 381,1560, $[C_{20}H_{21}N_4O_4]^+$) que já foi proposto por Hirte *et al.* [143].

Na mesma amostra, um composto com m/z 731.2148 foi detectado. Hirte *et al.* descreveram este íon como um dímero de ácido penicilóico AMX-AMX, que também foi detectado por Raju *et al.* [143,152]. A fragmentação deste composto gera íons de

alta intensidade em m/z 366,1078 (AMX presumível), m/z 349,0830 (AMX desaminada), m/z 208.0408 (um dos fragmentos mais intensos de AMX), m/z 160,0412 e m/z 114,0004 (estes fragmentos de marcadores menos conhecidos para penicilinas). O cromatograma de íon extraído (XIC) e o espectro MS2 para todos os TP de AMX detectados e confirmados são mostrados na Figura 22.

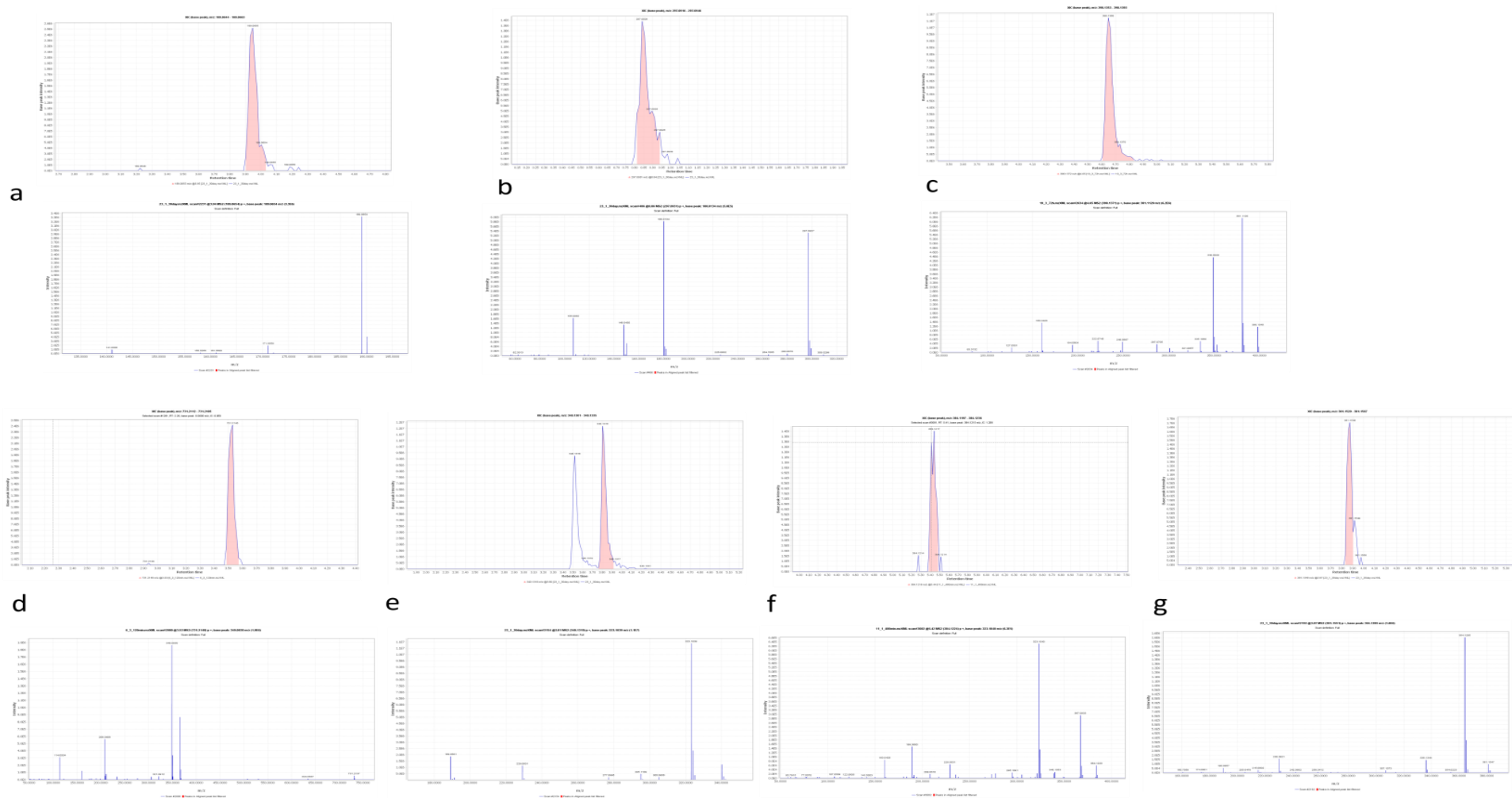


Figura 22. Cromatograma de íon extraído (XIC) e espectro MS2 para PP-2-OH-3-(4-OH) fenilpirazina (a), dissulfeto de penicilamina (b), éster metílico do ácido amoxicílico (c), dímero do ácido penicilóico AMX-AMX (d), ácido penicilóico AMX (e), ácido penicilóico AMX (f) e 2-amino-2-(4-hidroxifenil)-N-{{Z}}-[3-(4-hidroxifenil)-2-oxo-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-1,4-diazepin-5-il]metilideno}acetamida (g).

Fonte: a autora

5. Conclusão

O uso de instrumentos de HRMS também permitiu a detecção e identificação dos compostos com alta seletividade e especificidade. Dados obtidos da literatura foram considerados para estabelecer a identificação de AMX, AMP e seus TPs em experimentos de fotólise e amostras reais de águas superficiais. O banco de dados compilado a partir de trabalhos recentes sobre TPs de AMX e AMP foi utilizado para rastrear amostras reais, a fim de verificar a presença dos TP conhecidos em condições reais. Além disso, experimentos de fotólise de AMP e AMX foram realizados em água de rio para simular o comportamento desses compostos sob irradiação solar em águas superficiais. Os resultados concordaram com trabalhos anteriores: AMX e AMP sofreram intensa degradação em um período inferior a 2 dias. É importante destacar a confirmação de alguns TPs em amostras reais, considerando que algumas dessas substâncias foram relatadas anteriormente apenas em condições laboratoriais. Os resultados evidenciam a necessidade de mais estudos sobre TPs das penicilinas, considerando que os possíveis efeitos de vários TPs no ambiente ainda são desconhecidos.

CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO DESENVOLVIDO

A realização deste trabalho teve como inspiração resultados de monitoramentos anteriores, que demonstraram a grande problemática do Arroio Dilúvio. Observou-se a necessidade de ampliação do escopo dos analitos a serem avaliados. Neste sentido, desenvolvemos e validamos metodologias analíticas que contemplassem grande número de fármacos bem como de pesticidas utilizados em culturas comumente produzidas na região metropolitana de Porto Alegre. O monitoramento de 2 anos foi definido para possibilitar a réplica de ano, e as coletas sazonais poderiam estabelecer melhor o quadro de consumo/descarte destes compostos.

Foi desenvolvido e validado um método de *screening* rápido e simples para a detecção de CEs em amostras aquosas. As amostras de águas superficiais e efluentes de águas residuais foram incluídas no estudo de validação. Um protocolo de preparação de amostras baseado em SPE foi proposto para extração e concentração dos analitos. A validação foi baseada em protocolos de validação de análise *antidoping*, usando três diferentes níveis de concentração (0,01; 0,1 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

O monitoramento ambiental foi realizado com os métodos validados foi realizado em seis pontos do Arroio Dilúvio e um ponto no Rio dos Sinos e um no Gravataí. Os resultados mostram a incidência de 32 compostos, sendo 20 fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e antitérmicos, anestésicos, beta-bloqueadores e cafeína) e 12 pesticidas. O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado pelo método de Tucker3.

Os ensaios de ecotoxicidade utilizando *Danio rerio* foram realizados em três amostragens, tanto no Arroio Dilúvio quanto no rio dos Sinos e Gravataí. Após ensaios com embriões por 96 horas de exposição, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na morfologia ou morte dos embriões e larvas, indicando a baixa toxicidade das amostras.

Em trabalho anterior, realizado em dissertação de mestrado do grupo de pesquisa, a presença de antibióticos no Arroio Dilúvio, era uma constante. Naquele momento, apenas oito antibióticos eram analisados. No entanto, como estes fármacos

têm alto consumo, foi realizado monitoramento em separado dos mesmos utilizando metodologia de análise quantitativa, com ampliação de escopo.

O método quantitativo por LC-MS/MS para análise confirmatória de 40 antimicrobianos das classes β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, macrolídeos e fluor(quinolonas) em águas superficiais foi desenvolvido e validado. Foram quantificados os ATBs: cefalexina (β -lactâmico), ciprofloxacino e norfloxacino (quinolonas), azitromicina e clindamicina (macrolídeos) e sulfadiazina e sulfametoxazol (sulfonamidas) e trimetoprim. Estes fármacos apareceram como presença constante em todas as amostras, com variações que podem estar relacionadas às flutuações das temperaturas médias mínimas dos invernos dos dois anos monitorados.

Devido à incidência significativa dos antibióticos a necessidade de avaliar genes de resistência aparece dentro do trabalho. Neste sentido, foi implementada a análise de GRAs por PCR. A ocorrência dos GRAs *sul1* (sulfonamidas), *blaTEM* (β -lactâmicos), *ermB* (eritromicina) e *qnrS* (quinolonas), revela uma potencial correlação da presença de doses sub terapêuticas de antibióticos e a disseminação de genes resistentes a antibióticos.

O uso de instrumentos de HRMS também permitiu estabelecer a identificação de AMX, AMP e seus TPs em experimentos de fotólise e amostras reais de águas superficiais para simular o destino desses compostos sob efeito da radiação solar em águas superficiais. Um banco de dados compilados a partir de trabalhos recentes sobre TPs de AMX e AMP foi elaborado. Os resultados mostraram que a degradação de amoxicilina e ampicilina é quase completa e atinge o seu máximo em 48 h na água de rio.

Os dados obtidos demonstram claramente o lançamento de esgoto doméstico no Arroio Dilúvio, uma vez que a presença dos fármacos na água tem sua origem no consumo humano e veterinário, bem como no descarte inadequado de medicamentos. A sazonalidade em termos de consumo dos fármacos e pesticidas monitorados, por exemplo, no caso dos antibióticos, pode ser observada, pois se destaca sua maior incidência na primavera do que no verão.

O presente trabalho é uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de políticas locais e regionais para monitoramento da qualidade da água, destacando os riscos potenciais representados presença de fármacos, pesticidas, ATBs e GRAs no ciclo

hidrológico do município. Esses resultados são importantes porque o Arroio Dilúvio desagua no Lago Guaíba, de onde vem a maior parte da água consumida pela população de Porto Alegre. Isso se torna um problema porque os ambientes receptores formam outro ponto de acesso possível para a presença de CEs.

REFERÊNCIAS

- [1] P. Calza, C. Medana, E. Padovano, V. Giacotti, C. Minero, Fate of selected pharmaceuticals in river waters, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 2262–2270. doi:10.1007/s11356-012-1097-4.
- [2] T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, P. Hartemann, Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214 (2011) 442–448. doi:10.1016/j.ijheh.2011.08.002.
- [3] L. Mandaric, E. Diamantini, E. Stella, K. Cano-Paoli, J. Valle-Sistac, D. Molins-Delgado, A. Bellin, G. Chiogna, B. Majone, M.S. Diaz-Cruz, S. Sabater, D. Barcelo, M. Petrovic, Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism, *Sci. Total Environ.* 590–591 (2017) 484–494. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.02.185.
- [4] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. Lopez De Alda, D. Barceló, Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549–562. doi:10.1007/s00216-003-2184-7.
- [5] R.R. Chowdhury, P.A. Charpentier, M.B. Ray, Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 219 (2011) 67–75. doi:10.1016/j.jphotochem.2011.01.019.
- [6] G.-G. Ying, R.S. Kookana, Y.-J. Ru, Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environ. Int.* 28 (2002) 545–551. doi:10.1016/S0160-4120(02)00075-2.
- [7] R.W. Reis Filho, J.C. De Araújo, E.M. Vieira, Sexual estrogenic hormones: Bioactive contaminants, *Quim. Nova.* 29 (2006) 817–822.
- [8] M.N. Chong, B. Jin, C.W.K. Chow, C. Saint, Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review, *Water Res.* 44 (2010) 2997–3027. doi:10.1016/j.watres.2010.02.039.
- [9] Y. Souissi, S. Bourcier, S. Bouchonnet, C. Genty, M. Sablier, Estrone direct photolysis: By-product identification using LC-Q-TOF, *Chemosphere.* 87 (2012)

- 185–193. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.016.
- [10] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, D. Barceló, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 340–351. doi:10.1016/S0165-9936(03)00603-4.
- [11] R. Naidu, V.A. Arias Espana, Y. Liu, J. Jit, Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management, *Chemosphere.* 154 (2016) 350–357. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.068.
- [12] T.F.T. Omar, A. Ahmad, A.Z. Aris, F.M. Yusoff, Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds, *TrAC Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 241–259. doi:10.1016/J.TRAC.2016.08.004.
- [13] C.I. Kosma, D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece, *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 804–817. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2010.03.075.
- [14] M. Köck-Schulmeyer, M. Olmos, M. López de Alda, D. Barceló, Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1305 (2013) 176–187. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.036.
- [15] J. Gibs, H.A. Heckathorn, M.T. Meyer, F.R. Klapinski, M. Alebus, R.L. Lippincott, Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey, 2008, *Sci. Total Environ.* 458–460 (2013) 107–116. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.076.
- [16] S.D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B.J. Vanderford, S.A. Snyder, Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Res.* 41 (2007) 1013–1021. doi:10.1016/j.watres.2006.06.034.
- [17] M. Majewsky, D. Wagner, M. Delay, S. Bräse, V. Yargeau, H. Horn, Antibacterial activity of sulfamethoxazole transformation products (TPs): General relevance for sulfonamide TPs modified at the para position, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 1821–1828. doi:10.1021/tx500267x.
- [18] A. Längin, R. Alexy, A. König, K. Kümmerer, Deactivation and transformation

- products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin, *Chemosphere*. 75 (2009) 347–354. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.032.
- [19] F. Bonvin, J. Omlin, R. Rutler, W.B. Schweizer, P.J. Alaimo, T.J. Strathmann, K. McNeill, T. Kohn, Direct photolysis of human metabolites of the antibiotic sulfamethoxazole: Evidence for abiotic back-transformation, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 6746–6755. doi:10.1021/es303777k.
- [20] S. Coutu, V. Wyrsh, H.K. Wynn, L. Rossi, D.A. Barry, Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent, *Sci. Total Environ.* 458–460 (2013) 20–26. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.017.
- [21] Y. Chen, K.S.-Y. Leung, J.W.-C. Wong, A. Selvam, Preliminary occurrence studies of antibiotic residues in Hong Kong and Pearl River Delta, *Environ. Monit. Assess.* 185 (2013) 745–754. doi:10.1007/s10661-012-2589-x.
- [22] M. Gavrilescu, K. Demnerová, J. Aamand, S. Agathos, F. Fava, Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation, *N. Biotechnol.* 32 (2015) 147–156. doi:10.1016/j.nbt.2014.01.001.
- [23] J.F. Acar, G. Moulin, Antimicrobial resistance: A complex issue, *OIE Rev. Sci. Tech.* 31 (2012) 23–31.
- [24] M.O. Barbosa, N.F.F. Moreira, A.R. Ribeiro, M.F.R. Pereira, Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015 / 495, 94 (2016). doi:10.1016/j.watres.2016.02.047.
- [25] M. Köck-Schulmeyer, A. Ginebreda, S. González, J.L. Cortina, M.L. de Alda, D. Barceló, Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain), *Chemosphere*. 86 (2012) 8–16. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.08.034.
- [26] N. Dichtl, S. Rogge, K. Bauerfeld, Novel strategies in sewage sludge treatment, *Clean - Soil, Air, Water*. 35 (2007) 473–479. doi:10.1002/clen.200720022.
- [27] R.K. Boyd, C. Basic, R.A. Bethem, *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, 2008.
- [28] J. Aceña, S. Stampachiachiere, S. Pérez, D. Barceló, Advances in liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6289–6299.

- doi:10.1007/s00216-015-8852-6.
- [29] L. Viglino, K. Aboufadi, M. Prévost, S. Sauvé, Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS, *Talanta*. 76 (2008) 1088–1096. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.008.
- [30] J.E. Renew, C.-H. Huang, Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1042 (2004) 113–121. doi:10.1016/j.chroma.2004.05.056.
- [31] I. Senta, I. Krizman, M. Ahel, S. Terzic, Integrated procedure for multiresidue analysis of dissolved and particulate drugs in municipal wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3255–3268. doi:10.1007/s00216-013-6720-9.
- [32] Dados Gerais Edição 2016. Departamento Municipal de Água e Esgotos de Porto Alegre. (2016).
- [33] C. Cháfer-Pericás, T. Maquieira, R. Puchades, B. Company, J. Miralles, A. Moreno, Multiresidue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS, *Aquac. Res.* 41 (2010) e217–e225. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02504.x.
- [34] P. Gao, D. Mao, Y. Luo, L. Wang, B. Xu, L. Xu, Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment, *Water Res.* 46 (2012) 2355–2364. doi:10.1016/j.watres.2012.02.004.
- [35] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Trace organic chemicals contamination in ground water recharge, *Chemosphere*. 72 (2008) 333–342. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.02.031.
- [36] J.C. Niemeyer, S. Chelinho, J.P. Sousa, Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives, *Environ. Toxicol. Chem.* 36 (2017) 1795–1810. doi:10.1002/etc.3792.
- [37] E.E. Regulatórios, C.C. Montagner, C. Vidal, R.D. Acayaba, *Quim. Nova*, 40 (2017) 1094–1110.
- [38] S. Executiva, Ministério da Saúde, (2001). <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/endemias.pdf>. Acesso em 12 de

novembro de 2018.

- [39] A.F. Albuquerque, J.S. Ribeiro, F. Kummrow, A.J.A. Nogueira, C.C. Montagner, G.A. Umbuzeiro, Environmental Science Processes & Impacts Pesticides in Brazilian freshwaters : a critical review, (2016) 779–787. doi:10.1039/c6em00268d.
- [40] B. Arcelo, Critical Review REVIEW OF EMERGING CONTAMINANTS IN AQUATIC BIOTA FROM LATIN AMERICA : 2002 – 2016, 36 (2017) 1716–1727. doi:10.1002/etc.3626.
- [41] M.C.V.M. Starling, C.C. Amorim, M.M.D. Leão, Occurrence , control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil, J. Hazard. Mater. (2018) 0–1. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.04.043.
- [42] G.P. Pessoa, N.C. de Souza, C.B. Vidal, J.A.C. Alves, P.I.M. Firmino, R.F. Nascimento, A.B. dos Santos, Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants, Sci. Total Environ. 490 (2014) 288–295. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2014.05.008.
- [43] M.A.F. Locatelli, F.F. Sodr , W.F. Jardim, Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60 (2011) 385–393. doi:10.1007/s00244-010-9550-1.
- [44] W.F. Jardim, C.C. Montagner, I.C. Pescara, G.A. Umbuzeiro, A.M. Di Dea Bergamasco, M.L. Eldridge, F.F. Sodr , An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water, Sep. Purif. Technol. 84 (2012) 3–8. doi:10.1016/J.SEPPUR.2011.06.020.
- [45] C.C. Montagner, W.F. Jardim, Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil), J. Braz. Chem. Soc. 22 (2011) 1452–1462. doi:10.1590/S0103-50532011000800008.
- [46] L.G. Lopes, M.R.R. Marchi, J.B.G. Souza, J.A. Moura, C.S. Lorenzon, C. Cruz, L.A. Amaral, Estrog nios em  guas naturais e tratadas da regi o de jaboticabal - S o Paulo, Quim. Nova. 33 (2010) 639–643. doi:10.1590/S0100-40422010000300029.
- [47] L. Jank, R.B. Hoff, F. Justina, T. M. Pizzolato, International Journal of Environmental Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct

- classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography – electrospray ionisation mass spectrometry, (2014) 37–41. doi:10.1080/03067319.2014.914184.
- [48] Raquel Wielens Becker, Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS, Dissertação de Mestrado, PPGQ-UFRGS, 2012.
- [49] Alessandro Dallegrave, Determinação de hormônios estrógenos e progestógenos em amostras ambientais por GC-MS. Dissertação de Mestrado, PPGQ-UFRGS, 2012.
- [50] J. Segalin, C. Sirtori, L. Jank, M.F.S. Lima, P.R. Livotto, T.C. Machado, M.A. Lansarin, T.M. Pizzolato, Identification of transformation products of rosuvastatin in water during ZnO photocatalytic degradation through the use of associated LC – QTOF – MS to computational chemistry, *J. Hazard. Mater.* 299 (2015) 78–85. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.05.036.
- [51] B.M. da Cunha, Síntese e caracterização de catalisadores à base de titânia para degradação de antibióticos, Dissertação de Mestrado, PGCIMAT-UFRGS, 2014.
- [52] N.A. Campana, C.E.M. Tucci, Predicting floods from urban development scenarios: Case study of the Dilúvio Basin, Porto Alegre, Brazil, *Urban Water*. 3 (2001) 113–124. doi:10.1016/S1462-0758(01)00004-8.
- [53] Secretaria Estadual do Meio Ambiente (<https://www.sema.rs.gov.br/inicial>). Acesso em 19 de dezembro de 2018.
- [54] R. Bade, A. Causanilles, E. Emke, L. Bijlsma, J. V. Sancho, F. Hernandez, P. de Voogt, Facilitating high resolution mass spectrometry data processing for screening of environmental water samples: An evaluation of two deconvolution tools, *Sci. Total Environ.* 569 (2016) 434–441. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.162.
- [55] E. Pitarch, M. Inés, T. Portolés, M. Ibáñez, M. Barreda, A. Renau-pruñonosa, I. Morell, F. López, F. Albarrán, F. Hernández, Science of the Total Environment Comprehensive monitoring of organic micro-pollutants in surface and groundwater in the surrounding of a solid-waste treatment plant of, *Sci. Total Environ.* 548–549 (2016) 211–220. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.166.
- [56] F. Hernández, M. Ibáñez, E. Gracia-Lor, J. V. Sancho, Retrospective LC-QTOF-MS

- analysis searching for pharmaceutical metabolites in urban wastewater, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3517–3526. doi:10.1002/jssc.201100540.
- [57] S. Beck, A. Michalski, O. Raether, M. Lubeck, S. Kaspar, N. Goedecke, C. Baessmann, D. Hornburg, F. Meier, I. Paron, N.A. Kulak, J. Cox, M. Mann, The Impact II , a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics, (2015) 2014–2029. doi:10.1074/mcp.M114.047407.
- [58] M. Ibáñez, V. Borova, C. Boix, R. Aalizadeh, R. Bade, N.S. Thomaidis, F. Hernández, UHPLC-QTOF MS screening of pharmaceuticals and their metabolites in treated wastewater samples from Athens, *J. Hazard. Mater.* 323 (2017) 26–35. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.03.078.
- [59] M.J. Gómez, M.M. Gómez-Ramos, O. Malato, M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba, Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass , *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7038–7054. doi:10.1016/j.chroma.2010.08.070.
- [60] R.B. Hoff, T.M. Pizzolato, M.D.C.R. Peralba, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC-QqL, *Talanta.* 134 (2015) 768–778. doi:10.1016/j.talanta.2014.10.045.
- [61] M.C. Chiaradia, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos, *Química Nova*, 31 (2008) 623–636.
- [62] Bruker ToxScreener (www.bruker.com). Bruker Daltonics Inc. Acesso em 20 de maio de 2018.
- [63] R. Diaz, M. Ibá, J. V Sancho, F. Hernández, Qualitative validation of a liquid chromatography – quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters, 1276 (2013) 47–57. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.030.

- [64] M.J. Martínez Bueno, M.M. Ulaszewska, M.J. Gomez, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water, *J. Chromatogr. A.* 1256 (2012) 80–88. doi:10.1016/J.CHROMA.2012.07.038.
- [65] M. Ibáñez, V. Borova, C. Boix, R. Aalizadeh, R. Bade, N.S. Thomaidis, F. Hernández, UHPLC-QTOF MS screening of pharmaceuticals and their metabolites in treated wastewater samples from Athens, *J. Hazard. Mater.* 323 (2017) 26–35. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2016.03.078.
- [66] J.P. Bagnall, S.E. Evans, M.T. Wort, A.T. Lubben, B. Kasprzyk-Hordern, Using chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface and wastewater at the enantiomeric level, *J. Chromatogr. A.* 1249 (2012) 115–129. doi:10.1016/J.CHROMA.2012.06.012.
- [67] F. Hernández, M. Ibáñez, A.M. Botero-Coy, R. Bade, M.C. Bustos-López, J. Rincón, A. Moncayo, L. Bijlsma, LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6405–6416. doi:10.1007/s00216-015-8796-x.
- [68] A. Masiá, M. Ibáñez, C. Blasco, J.V. Sancho, Y. Picó, F. Hernández, Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples, *Anal. Chim. Acta.* 761 (2013) 117–127. doi:10.1016/j.aca.2012.11.032.
- [69] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, F. Hernández, Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 303–315. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.010.
- [70] A. Masiá, J. Campo, C. Blasco, Y. Picó, Ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify contaminants in water: An insight on environmental forensics, *J. Chromatogr. A.*

- 1345 (2014) 86–97. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.017.
- [71] F.F. Al-Qaim, M.P. Abdullah, M.R. Othman, J. Latip, Z. Zakaria, Multi-residue analytical methodology-based liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in surface water and effluents from sewage treatment plants and hospitals, *J. Chromatogr. A.* 1345 (2014) 139–153. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.025.
- [72] O.S.A. Al-Khazrajy, A.B.A. Boxall, Impacts of compound properties and sediment characteristics on the sorption behaviour of pharmaceuticals in aquatic systems, *J. Hazard. Mater.* 317 (2016) 198–209. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.065.
- [73] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta.* 70 (2006) 678–690. doi:10.1016/j.talanta.2006.05.024.
- [74] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 7901–7913. doi:10.1016/j.chroma.2011.08.092.
- [75] R. Bade, N.I. Rousis, L. Bijlsma, E. Gracia-Lor, S. Castiglioni, J. V. Sancho, F. Hernandez, Screening of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and surface waters of Spain and Italy by high resolution mass spectrometry using UHPLC-QTOF MS and LC-LTQ-Orbitrap MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8979–8988. doi:10.1007/s00216-015-9063-x.
- [76] http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf. Acesso em 25 de outubro de 2016.
- [77] C. Jiménez, R. Ventura, J. Segura, Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories, *J. Chromatogr. B.* 767 (2002) 341–351. doi:10.1016/S1570-0232(01)00593-1.
- [78] O.J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer, F.T. Delbeke, Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal.*

- Bioanal. Chem. 389 (2007) 1209–1224. doi:10.1007/s00216-007-1530-6.
- [79] S.L.R. Ellison, T. Fearn, Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 468–476. doi:10.1016/J.TRAC.2005.03.007.
- [80] V. Leendert, H. Van Langenhove, K. Demeestere, Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments, *TrAC Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 192–208. doi:10.1016/J.TRAC.2015.01.010.
- [81] Oecd, Fish, acute toxicity test, *Guidel. Test. Chem.* (1992) 1–9. doi:http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en.
- [82] O. Guidelines, F.O.R. The, T. Of, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, (2013) 1–22. doi:10.1787/9789264203709-en.
- [83] R. Freiry, J.A.A. Stelzer, L. Maltchik, A. Arenzon, Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) During Two Stages of Development Based on Acute Toxicity Tests, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93 (2014) 442–445. doi:10.1007/s00128-014-1367-6.
- [84] http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php, (n.d.). Acesso em 01 de outubro de 2018.
- [85] M.M. Sena, M.G. Trevisan, PARAFAC: UMA FERRAMENTA QUIMIOMÉTRICA PARA TRATAMENTO DE DADOS MULTIDIMENSIONAIS. APLICAÇÕES NA DETERMINAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO POR ESPECTROFLUORIMETRIA Marcelo M. Sena, 28 (2005) 910–920.
- [86] <https://www.fee.rs.gov.br/sinteseilustrada/caracteristicas-da-agropecuaria-do-rs/>, (n.d.). Acesso em 15 de fevereiro de 2019.
- [87] L. Cabrera, F. Costa, E. Primel, Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS, *Química Nova*, 31 (2008) 1982–1986.
- [88] A.E.P.D.E. Madeira, GUIA PARA ELABORAÇÃO DE RÓTULO E BULA DE, 2018.
- [89] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA PESQUISA MENSAL DE PREVISÃO E ACOMPANHAMENTO DAS SAFRAS AGRÍCOLAS NO ANO CIVIL RELATÓRIO DE OCORRÊNCIAS RIO GRANDE DO SUL, 2018.

- [90] M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, D. McMillan, R. Rao, Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 481–489. doi:10.1016/j.trac.2008.03.007.
- [91] E.K. Rousham, L. Unicomb, M.A. Islam, Human , animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural , epidemiological and One Health approaches, (2018).
- [92] E.O. Flaherty, E. Cummins, Human and Ecological Risk Assessment: An International Antibiotic resistance in surface water ecosystems : Presence in the aquatic environment , prevention strategies , and risk assessment, *Hum. Ecol. Risk Assess.* 23 (2017) 299–322. doi:10.1080/10807039.2016.1247254.
- [93] K. Ku, Presence , Fate and Risks of Pharmaceuticals in the Environment, (2016) 63–72.
- [94] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I, *Chemosphere.* 75 (2009) 417–434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.
- [95] K. Kümmerer, Chemosphere Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II, *Chemosphere.* 75 (2009) 435–441. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.006.
- [96] H.K. Allen, J. Donato, H.H. Wang, K.A. Cloud-Hansen, J. Davies, J. Handelsman, Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 251–259. doi:10.1038/nrmicro2312.
- [97] G. Ferro, F. Guarino, S. Castiglione, L. Rizzo, Science of the Total Environment Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV / H₂O₂ process, *Sci. Total Environ.* 560–561 (2016) 29–35. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.047.
- [98] P. Karaolia, I. Michael-Kordatou, E. Hapeshi, C. Drosou, Y. Bertakis, D. Christofilos, G.S. Armatas, L. Sygellou, T. Schwartz, N.P. Xekoukoulotakis, D. Fatta-Kassinos, Removal of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and their associated genes by graphene-based TiO₂ composite photocatalysts under solar radiation in urban wastewaters, *Appl. Catal. B Environ.* 224 (2018) 810–824. doi:10.1016/j.apcatb.2017.11.020.
- [99] S.K. Singh, R. Ekka, Association study of multiple antibiotic resistance and

- virulence : a strategy to assess the extent of risk posed by bacterial population in aquatic environment, (2017). doi:10.1007/s10661-017-6005-4.
- [100] Y. Zhang, Y. Zhuang, J. Geng, H. Ren, K. Xu, L. Ding, Science of the Total Environment Reduction of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by advanced oxidation processes, 550 (2016) 184–191. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.078.
- [101] P.A. Blackwell, A.B.A. Boxall, P. Kay, H. Noble, Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 2192–2201. doi:10.1021/jf049527b.
- [102] P. Struciński, K. Góralczyk, K. Czaja, A. Hernik, W. Korcz, J.K. Ludwicki, Consumer risk assessment in case of maximum residue levels (MRLs) violations in food, Roczn. Państwowego Zakładu Hig. 58 (2007) 377–388.
- [103] K. Kumar Sharma, T.M. Pramod Kumar, S.Z. Khaleeli, J. Kaur, A.J. Dave, G.V.S.S.N. Jyothi, Global pharma market scenario: Drug shortages, challenges & opportunities, J. Pharm. Sci. Res. 5 (2013) 62–66.
- [104] M. Tannoury, Z. Attieh, The Influence of Emerging Markets on the Pharmaceutical Industry, 86 (2017) 19–22. doi:10.1016/j.curtheres.2017.04.005.
- [105] M. von Sperling, Urban Wastewater Treatment in Brazil (Technical Notes), Inter-American Dev. Bank. (2016). doi:https://doi.org/10.18235/0000397.
- [106] J. Prichula, R. Inhoque, G. Raffo, L. Almansa, N. Cezar, C. Tolfo, N. Aguiar, A. Weber, M. Tavares, J. Frazzon, P. Alves, A. Paula, G. Frazzon, Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil, MPB. 105 (2016) 51–57. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.071.
- [107] A.P. Basso, P.D. Martins, G. Nachtigall, S. van der Sand, T.M. de Moura, A.P.G. Frazzon, Antibiotic resistance and enterotoxin genes in staphylococcus sp. Isolates from polluted water in southern Brazil, An. Acad. Bras. Cienc. 86 (2014) 1813–1820. doi:10.1590/0001-3765201420130512.
- [108] J.L. Martínez, T.M. Coque, F. Baquero, What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes, Nat. Rev. Microbiol. 13 (2015) 116–123. doi:10.1038/nrmicro3399.
- [109] P. Paíga, L.H.M.L.M. Santos, C. Delerue-Matos, Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and

- some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135 (2017) 75–86. doi:10.1016/j.jpba.2016.12.013.
- [110] L. Jank, R.B. Hoff, F.J. da Costa, T.M. Pizzolato, Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 94 (2014) 1013–1037. doi:10.1080/03067319.2014.914184.
- [111] LANAGRO, Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Resíduos de contaminantes em alimentos, 2011.
- [112] INMETRO, Normalização e Qualidade Industrial, 2010. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos., 2003.
- [113] Vecchia A.D., First description of Adenovirus , Enterovirus , Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the, 72 (n.d.) 323–329.
- [114] D.V. De Oliveira, L.S. Nunes, A.L. Barth, S.T. Van Der Sand, Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples, (2017) 599–607. doi:10.1007/s00248-017-0970-6.
- [115] Y. Yang, W. Song, H. Lin, W. Wang, L. Du, W. Xing, Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes : A review and, *Environ. Int.* 116 (2018) 60–73. doi:10.1016/j.envint.2018.04.011.
- [116] D.J. Duarte, R. Oldenkamp, A.M.J. Ragas, Science of the Total Environment Modelling environmental antibiotic-resistance gene abundance : A meta-analysis, *Sci. Total Environ.* 659 (2019) 335–341. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.233.
- [117] M.A. Monteiro, B.F. Spisso, R.G. Ferreira, M.U. Pereira, Development and Validation of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Determination of Beta-Lactams, Macrolides, Fluoroquinolones, Sulfonamides and Tetracyclines in Surface and Drinking Water from Rio de Janeiro, Brazil, 29 (2018) 801–813.
- [118] S. Correia, P. Poeta, H. Michel, Mechanisms of quinolone action and resistance : where do we stand ?, (2019) 551–559. doi:10.1099/jmm.0.000475.
- [119] J.H. Tran, G.A. Jacoby, Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance, 99

- (2002) 5638–5642.
- [120] C. Girardi, J. Greve, M. Lamshöft, I. Fetzer, A. Miltner, A. Schäffer, M. Kästner, Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities, *J. Hazard. Mater.* 198 (2011) 22–30. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.004.
- [121] L. Jiang, X. Hu, T. Xu, H. Zhang, D. Sheng, D. Yin, Science of the Total Environment Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China, *Sci. Total Environ.* 458–460 (2013) 267–272. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.038.
- [122] A. Rodrigues, Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado The profile of antimicrobial utilization in a private hospital, (n.d.) 1239–1247.
- [123] X. Liu, G. Zhang, Y. Liu, S. Lu, P. Qin, X. Guo, B. Bi, L. Wang, B. Xi, F. Wu, W. Wang, T. Zhang, Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China *, *Environ. Pollut.* 246 (2019) 163–173. doi:10.1016/j.envpol.2018.12.005.
- [124] M.C. Bastos, J. Augusto, M. De Castro, T. Le, L. Mondamert, Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application, (2018) 2472–2484. doi:10.1002/ldr.2964.
- [125] M. Yan, C. Xu, Y. Huang, H. Nie, J. Wang, Science of the Total Environment Tetracyclines, sulfonamides and quinolones and their corresponding resistance genes in the Three Gorges Reservoir, China, *Sci. Total Environ.* 631–632 (2018) 840–848. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.085.
- [126] W. Qiu, J. Sun, M. Fang, S. Luo, Y. Tian, P. Dong, Science of the Total Environment Occurrence of antibiotics in the main rivers of Shenzhen, China: Association with antibiotic resistance genes and microbial community, *Sci. Total Environ.* 653 (2019) 334–341. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.398.
- [127] A. Karkman, K. Pärnänen, D.G.J. Larsson, gene abundances in anthropogenically impacted, *Nat. Commun.* (n.d.) 1–8. doi:10.1038/s41467-018-07992-3.
- [128] A. Boxall, C. Long, Veterinary medicines and the environment, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 759–760. doi:10.1897/1552-8618(2005)24<759:VMATE>2.0.CO;2.

- [129] A. Pérez-Parada, A. Agüera, M. Del Mar Gómez-Ramos, J.F. García-Reyes, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: Identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 731–742. doi:10.1002/rcm.4902.
- [130] E.S. Elmolla, M. Chaudhuri, Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1476–1481. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2009.08.015.
- [131] M. Canterino, R. Marotta, N. Paxeus, Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of amoxicillin, *J. Hazard. Mater.* 122 (2005) 243–250. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2005.03.004.
- [132] E. Nägele, R. Moritz, Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MS_n and accurate mass determination by ESI TOF, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1670–1676. doi:10.1016/j.jasms.2005.06.002.
- [133] A. Junza, A. Montané, J. Barbosa, C. Minguillón, D. Barrón, High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from ??-lactam antibiotics in thermally treated milk, *J. Chromatogr. A.* 1368 (2014) 89–99. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.056.
- [134] M.R. EL-Zahry, I.H. Refaat, H.A. Mohamed, E. Rosenberg, B. Lendl, Utility of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for elucidation and simultaneous determination of some penicillins and penicilloic acid using hydroxylamine silver nanoparticles, *Talanta.* 144 (2015) 710–716. doi:10.1016/J.TALANTA.2015.07.015.
- [135] S. Suwanrumpha, R.B. Freast, Identification of metabolites of ampicillin using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry, *Biol. Mass Spectrom.* 18 (1989) 983–994. doi:10.1002/bms.1200181106.
- [136] R. Frański, J. Czerniel, M. Kowalska, M. Frańska, Electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of amoxicillin and ampicillin and their degradation products, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 713–722. doi:10.1002/rcm.6834.

- [137] A.G. Trovó, R.F. Pupo Nogueira, A. Agüera, A.R. Fernandez-Alba, S. Malato, Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process - Chemical and toxicological assessment, *Water Res.* 45 (2011) 1394–1402. doi:10.1016/j.watres.2010.10.029.
- [138] A. Freitas, J. Barbosa, F. Ramos, Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography--Tandem Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods.* 5 (2012) 471–479. doi:10.1007/s12161-011-9267-4.
- [139] E. Deschamps, O. Vasconcelos, L. Lange, C.L. Donnici, M.C. da Silva, J.A. Sales, Management of effluents and waste from pharmaceutical industry in Minas Gerais, Brazil, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 48 (2012) 727–736. doi:10.1590/S1984-82502012000400017.
- [140] T. Li, X. Xu, S. Fu, J. Zhang, K. Zhang, S. Wang, M. Zhao, W. Ding, Q. Wang, Structural elucidation of stress degradation products of ampicillin sodium by liquid chromatography/hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry and liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1929–1936. doi:10.1002/rcm.6970.
- [141] Y.J. Jung, W.G. Kim, Y. Yoon, J.W. Kang, Y.M. Hong, H.W. Kim, Removal of amoxicillin by UV and UV/H₂O₂ processes, *Sci. Total Environ.* 420 (2012) 160–167. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.12.011.
- [142] L. Zhang, X.L. Cheng, Y. Liu, M. Liang, H. Dong, B. Lv, W. Yang, Z. Luo, M. Tang, Identification of the Related Substances in Ampicillin Capsule by Rapid Resolution Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Methods Chem.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/397492.
- [143] K. Hirte, B. Seiwert, G. Schüürmann, T. Reemtsma, New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater, *Water Res.* 88 (2016) 880–888. doi:10.1016/j.watres.2015.11.028.
- [144] I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar, Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions, *Environ. Chem.* 7 (2010) 435–442. doi:10.1071/EN10037.

- [145] I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar, Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment, *Chemosphere*. 91 (2013) 985–992. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.095.
- [146] A. Pérez-Parada, A. Agüera, M.G.-R. Del, J.F. García-Reyes, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: Identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 731–742. doi:10.1002/rcm.4902.
- [147] A.G. Trovó, N. Pupo, A. Agüera, A.R. Fernandez-Alba, S. Malato, Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process - Chemical and toxicological assessment, *Water Res.* 45 (2011) 1394–1402. doi:10.1016/j.watres.2010.10.029.
- [148] K. Hirte, B. Seiwert, G. Schüürmann, T. Reemtsma, New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater, *Water Res.* 88 (2016) 880–888. doi:10.1016/j.watres.2015.11.028.
- [149] I. Gozlan, A. Rotstein, D. Avisar, Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment, *Chemosphere*. 91 (2013) 985–992. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.095.
- [150] Y.J. Jung, W.G. Kim, Y. Yoon, J.-W. Kang, Y.M. Hong, H.W. Kim, Removal of amoxicillin by UV and UV/H₂O₂ processes, *Sci. Total Environ.* 420 (2012) 160–167. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.12.011.
- [151] N.F.F. Moreira, C.A. Orge, A.R. Ribeiro, J.L. Faria, O.C. Nunes, M.F.R. Pereira, A.M.T. Silva, Fast mineralization and detoxification of amoxicillin and diclofenac by photocatalytic ozonation and application to an urban wastewater, *Water Res.* 87 (2015) 87–96. doi:10.1016/J.WATRES.2015.08.059.
- [152] C.B.V.N. Raju, H.K. Sharma, C.S. Rao, G.N. Rao, RP-HPLC method for analysis of related substances in amoxicillin drug substance, *Acta Chromatogr.* 21 (2009) 57–70. doi:10.1556/AChrom.21.2009.1.5.

ANEXO I

Tabela I. Dados de volume de precipitação e temperaturas mensais nos meses de coleta de amostra.

| Mês/ano | Precipitação total (mm) | Temp. max. média (°C) | Temp. compensada média (°C) | Temp. min. média (°C) |
|---------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| dez/16 | 128,1 | 30,9 | 24,7 | 20,0 |
| mar/17 | 165,6 | 29,1 | 23,4 | 19,3 |
| jun/17 | 196,9 | 22,0 | 15,9 | 12,3 |
| set/17 | 164,7 | 26,4 | 20,5 | 16,5 |
| dez/17 | 153,5 | 30,4 | 24,2 | 19,6 |
| mar/18 | 99,4 | 28,6 | 23,1 | 19,2 |
| jun/18 | 149,8 | 18,7 | 13,3 | 9,88 |
| set/18 | 168,0 | 24,3 | 19,3 | 15,7 |

Fonte: dados fornecidos pelo INMET, em <http://www.inmet.gov.br/>.

Tabela II. Lista dos fragmentos de m/z monitorados dos fármacos incluídos no método de triagem juntamente com os íons encontrados nas amostras da validação em água superficial e efluente.

| | | | | | Surface water | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| RT | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | | 0,01 ng mL ⁻¹ | | | 0,1 ng mL ⁻¹ | | | 1,0 ng mL ⁻¹ | | | |
| | | transition 1 | transition 2 | | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | | |
| PHARMACEUTICALS | | | | | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ |
| Acebutolol | 1,7 | 337,2122 | 116,1069 | 319,2021 | 337,2114 | 116,1077 | ND | 337,2124 | 116,107 | | 337,212 | 116,1067 | 319,2013 | |
| Acepromazine | 2,5 | 327,1526 | 254,0636 | 86,0964 | | | | | | | 327,1522 | 254,0634 | 86,0963 | |
| Amoxicillin | 0,7 | 366,1118 | 349,0857 | 208,043 | | | | | | | 366,1119 | 349,085 | 208,043 | |
| Ampicillin | 1,3 | 350,1169 | 160,0425 | 106,0648 | | | | 350,1175 | 160,0427 | 106,0653 | 350,1168 | 160,0425 | 106,0651 | |
| Anlodipine | 2,7 | 409,1525 | 238,0635 | 221,0369 | | | | | | | 409,1518 | 238,0627 | nd | |
| Atenolol | 0,8 | 267,1703 | 225,1234 | 190,0863 | 267,1704 | 225,1248 | 190,0858 | 267,1704 | 225,1239 | 190,0862 | 267,1702 | 225,1235 | 190,0861 | |
| Azaperol | 1,6 | 330,1976 | | | | | | | | | 330,1971 | | | |
| Betamethasone | 2,7 | 393,2072 | 373,201 | 237,1276 | | | | | | | 393,2063 | 373,2006 | 237,1266 | |
| Betaxolol | 2,3 | 308,222 | 116,1069 | 98,0964 | | | | 308,2217 | 116,1062 | 98,0967 | 308,222 | 116,1068 | 98,0964 | |
| Bromhexine | 2,6 | 375,0066 | 263,8842 | 114,1277 | | | | 375,0064 | 236,8832 | 114,1275 | 375,0056 | 263,8836 | 114,1275 | |
| Caffeine | 1,3 | 195,0874 | 138,066 | | 195,0877 | 138,0661 | | 195,0878 | 138,0662 | | 195,0874 | 138,066 | | |
| Carazolol | 2,1 | 299,1754 | 222,0913 | 300,1787 | | | | | | | 299,1749 | 222,091 | 300,1776 | |
| Carprofen | 3,7 | 274,0629 | 228,0573 | 256,0529 | | | | | | | 274,0629 | 228,0576 | nd | |
| Carvedilol | 2,7 | 407,1965 | | | | | | | | | 407,1963 | | | |
| Cefalonium | 1,5 | 459,0791 | 337,0311 | 158,0269 | | | | | | | 459,0791 | 337,0308 | 158,0268 | |
| Cefapirin | 1,2 | 424,0632 | 152,0136 | 181,0431 | 424,0634 | 152,0163 | nd | 424,0634 | nd | 181,0445 | 424,0630 | 152,0161 | 181,0429 | |
| Cefoperazone | 2,1 | 646,1497 | 143,0814 | 290,1134 | | | | | | | 646,1492 | 143,0831 | 290,113 | |
| Cefquinome | 1,5 | 529,1322 | 396,0433 | 324,0584 | | | | | | | 529,1323 | 396,0435 | 324,0585 | |
| Ceftiofur | 2,4 | 524,0363 | 241,0391 | 210,0204 | 524,0375 | nd | 210,019 | 524,0361 | 241,04 | 210,0193 | 524,0356 | 241,039 | 210,0202 | |
| Cephalexin | 1,5 | 348,1013 | 158,0269 | 174,0548 | | | | 348,1028 | 158,0269 | 174,0546 | 348,1014 | 158,0268 | 174,0549 | |
| Chlorpromazine | 2,9 | 319,103 | 86,0964 | 214,0416 | | | | 319,1028 | 86,0964 | nd | 319,1031 | 86,0966 | 214,0426 | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Chlortetracycline | 2 | 479,1216 | 444,0843 | 462,0951 | | | | | | | 479,1218 | 444,0828 | 462,096 |
| Ciprofloxacin | 1,6 | 332,1405 | 288,1509 | 245,1085 | | | | 332,1411 | ND | ND | 332,1405 | 288,1503 | nd |
| Clindamycin | 2 | 425,1871 | 126,1277 | 377,1835 | | | | 425,1869 | 126,1278 | nd | 425,1869 | 126,1275 | 377,1837 |
| Clopidol | 1,1 | 191,9977 | 157,0281 | 193,995 | 191,9977 | nd | 193,9949 | 191,998 | 157,0286 | 193,9951 | 191,9975 | 157,0282 | 193,9945 |
| Cloxacillin | 3,4 | 436,0728 | 160,0426 | 277,0375 | | | | 436,0711 | 160,0426 | 277,0373 | 436,0726 | 160,0424 | 277,0372 |
| Danofloxacin | 1,7 | 358,1561 | 359,1592 | 340,1455 | | | | | | | 358,1561 | 359,1582 | 340,145 |
| Decoquinat | 4,3 | 418,2588 | 372,2165 | 390,2284 | | | | 418,2582 | 372,2167 | 390,2287 | 418,2548 | 372,2163 | 390,2273 |
| Dexamethasone | 2,7 | 393,2072 | 373,201 | 279,1743 | | | | | | | 393,2063 | 373,2006 | 237,1266 |
| Diaveridine | 1,3 | 261,1346 | 245,1035 | 123,0663 | 261,1335 | ND | 123,0658 | 261,1349 | 245,1038 | 123,0667 | 261,1348 | 245,1031 | 123,0664 |
| Diclofenac | 3,8 | 296,024 | 214,0417 | 250,0183 | 296,0234 | 214,0412 | 250,0181 | 296,0238 | 214,0411 | 250,018 | 296,0239 | 214,0416 | 250,0182 |
| Dicloxacillin | 3,6 | 470,0339 | 160,0424 | 114,037 | | | | 470,0332 | 160,0426 | 114,0366 | 470,0336 | 160,0424 | 114,0367 |
| Difloxacin | 1,9 | 400,1467 | 356,1569 | 299,0991 | | | | 400,1471 | 356,1562 | nd | 400,1464 | 356,1565 | 299,0987 |
| Doxytetracycline | 1,7 | 445,1605 | 154,05 | 428,1356 | | | | | | | 445,1604 | 154,05 | 428,1373 |
| Enrofloxacin | 1,7 | 360,1718 | 316,182 | 342,1613 | | | | 360,172 | 316,1824 | ND | 360,1716 | 316,1822 | 342,1621 |
| Erythromycin | 2,4 | 734,4685 | 576,3745 | 158,1175 | | | | 734,4679 | nd | nd | 734,467 | 576,3728 | 158,1166 |
| Flunixin | 2,9 | 297,0845 | 279,0741 | 298,0878 | 297,0844 | 279,0745 | 298,0877 | 297,0845 | 279,0737 | 298,0874 | 297,0843 | 279,0739 | 298,0878 |
| Hydrochlorothiazide | 1,3 | 297,9718 | 139,9898 | 107,9902 | 297,9725 | ND | ND | 297,9719 | nd | nd | 297,9715 | 139,9883 | nd |
| Indomethacin | 3,8 | 358,0841 | 138,9944 | 110,9996 | | | | 358,084 | 138,9942 | nd | 358,0832 | 138,994 | 110,9998 |
| Ketoprofen | 3,1 | 255,1016 | 209,0961 | 105,0335 | | | | 255,1014 | 209,0958 | 105,0334 | 255,1013 | 209,0958 | 105,0333 |
| Labetalol | 2,1 | 329,186 | 162,0547 | 294,1486 | 329,187 | 162,0558 | ND | 329,1867 | 162,0562 | ND | 329,1865 | 162,0547 | 294,1486 |
| Lasalocid sodium | 5,1 | 613,3711 | 573,378 | 555,3675 | | | | 613,3696 | nd | nd | 613,3698 | 573,3783 | 555,3674 |
| Lidocaine | 1,4 | 235,1805 | 86,0966 | 58,0652 | 235,1803 | 86,0966 | 58,0652 | 235,1806 | 86,0964 | 58,0649 | 235,1804 | 86,0963 | 58,0649 |
| Lincomycin | 1,2 | 407,221 | 126,1277 | 359,218 | 407,2216 | 126,1273 | 359,2189 | 407,2213 | 126,1276 | 359,2177 | 407,2208 | 126,1275 | 359,2175 |
| Maduramicin ammonium | 5,1 | 934,5734 | 629,4043 | 647,4146 | | | | | | | 934,5724 | 629,4039 | 647,4137 |
| Mefenamic acid | 4 | 242,1176 | 224,1069 | | | | | 242,1174 | 224,1066 | | 242,1172 | 224,1066 | |
| Meloxicam | 3,3 | 352,042 | 353,0446 | 115,0281 | 352,0424 | 353,0435 | nd | 352,042 | 353,0445 | nd | 352,0416 | 353,0447 | 115,0323 |
| Metoprolol | 1,7 | 268,1907 | 116,107 | 133,0648 | 268,1909 | 116,107 | 133,0659 | 268,191 | 116,1066 | 133,0638 | 268,1906 | 116,1068 | 133,0645 |
| Miconazole | 3,6 | 414,9933 | 416,9901 | 69,0452 | 414,9929 | 416,9901 | 69,0438 | 414,9931 | 416,9899 | 69,044 | 414,9929 | 416,9901 | 69,0445 |
| Monensin sodium | 4,9 | 693,4184 | 461,3 | 479,3 | | | | 693,4163 | 461,325 | nd | 693,4176 | 461,3256 | 479,323 |
| Nadolol | 1,4 | 310,2015 | 254,1388 | 201,0911 | | | | 310,2014 | 254,1389 | 201,0914 | 310,2012 | 254,1387 | 201,0908 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Nafcillin | 3,4 | 415,1321 | 256,0968 | 199,0753 | | | | | | | 415,1318 | 256,0966 | 199,075 |
| Nalidixic acid | 2,6 | 233,0921 | 215,0814 | 187,0501 | | | | 233,0923 | 215,0813 | 187,0501 | 233,0916 | 215,0811 | 187,0499 |
| Naproxen | 3,2 | 231,1016 | 185,096 | 170,0728 | | | | | | | 231,101 | 185,0957 | 170,0721 |
| Nebivolol | 2,9 | 406,1824 | | | | | | 406,1821 | | | 406,1823 | | |
| Nimesulide | 3,6 | 309,054 | 145,0634 | 128,0577 | | | | 309,0544 | 145,064 | ND | 309,0538 | 145,0635 | 128,062 |
| Norfloxacin | 1,5 | 320,1405 | 231,0562 | 302,1292 | | | | 320,1418 | ND | ND | 320,1408 | nd | nd |
| Oxacillin | 3 | 402,1118 | 160,0426 | 243,0765 | | | | 402,1105 | 160,0428 | 243,0755 | 402,1115 | 160,0424 | 243,0762 |
| Oxolinic acid | 2,2 | 262,071 | 244,0606 | 216,0294 | 262,0712 | 244,0606 | nd | 262,0709 | 244,0604 | 216,0304 | 262,0708 | 244,0605 | 216,0285 |
| Oxytetracycline | 1,6 | 461,1555 | 426,1185 | 444,1301 | | | | | | | 461,1543 | 426,1183 | nd |
| Paracetamol | 0,8 | 152,0706 | 110,06 | 93,0334 | 152,0706 | 110,0613 | 93,0335 | 152,0705 | 110,0609 | 93,0337 | 152,0703 | 110,0601 | 93,0335 |
| Penbutolol | 2,8 | 292,2271 | 236 | 293 | 292,2274 | | | 292,2269 | 236,1645 | 293,2285 | 292,227 | 236,1643 | 293,2304 |
| Penicillin G | 2,6 | 335,106 | 160,0425 | 114,0372 | | | | | | | 335,1058 | 160,0424 | 114,0369 |
| Penicillin V | 2,7 | 351,1009 | 160,0425 | 114,0372 | | | | | | | 351,1006 | 160,0425 | 114,037 |
| Piroxicam | 2,6 | 332,07 | 121,0395 | 95,0604 | 332,0705 | 121,0397 | 95,06 | 332,0699 | 121,0394 | 95,0604 | 332,0694 | 121,0394 | 95,0602 |
| Phenylbutazone | 3,7 | 309,1598 | 211,0871 | 69,0704 | | | | 309,1589 | ND | 69,0698 | 309,1588 | nd | 69,0703 |
| Prednisolone | 2,4 | 361,201 | 343,1903 | 325,1798 | | | | 361,2007 | 343,1901 | 325,1796 | 361,2008 | 343,1903 | 325,1792 |
| Prednisone | 2,4 | 359,1853 | 341,175 | 237,1275 | | | | 359,1847 | 341,1752 | nd | 359,1851 | 341,1748 | 237,1273 |
| Propranolol | 2,2 | 260,1645 | 74,06 | 116,107 | 260,1655 | 74,0606 | 116,1079 | 260,1645 | 74,0603 | 116,1068 | 260,1645 | 74,0602 | 116,1069 |
| Propyphenazone | 2,7 | 231,1492 | 189,1022 | 201,1026 | 231,1477 | 189,1029 | ND | 231,149 | 189,1011 | 201,9994 | 231,149 | 189,1019 | 201,1016 |
| Robenidine | 3,2 | 334,0621 | 155,037 | 138,0105 | | | | 334,0621 | ND | ND | 334,0615 | 155,0366 | 138,0105 |
| Sarafloxacin | 1,9 | 386,1311 | 387,1373 | 299,1014 | | | | 386,131 | nd | nd | 386,1306 | nd | nd |
| Sotalol | 0,8 | 273,1267 | 133,076 | 255,1162 | | | | 273,1268 | 133,0755 | 255,1165 | 273,1266 | 133,0758 | 255,1162 |
| Sulfachloropyridazine | 2 | 285,0208 | 156,0111 | 108,0443 | 285,021 | 156,0114 | 108,0443 | 285,0207 | 156,0117 | 108,0454 | 285,0208 | 156,0111 | 108,0443 |
| Sulfadiazine | 1,2 | 251,0597 | 156,0111 | 108,0443 | 251,0591 | nd | 108,0455 | 251,0595 | 156,0111 | 108,0445 | 251,0598 | 156,0111 | 108,0442 |
| Sulfadimethoxine | 2,3 | 311,0809 | 156,0111 | 108,0443 | 311,0822 | 156,0119 | nd | 311,0808 | 156,011 | 108,0446 | 311,081 | 156,0113 | 108,0443 |
| Sulfadoxine | 2 | 311,0809 | 245,1032 | 156,0111 | 311,0815 | nd | 156,0118 | 311,0809 | nd | 108,0445 | 311,0804 | 245,1035 | 156,0111 |
| Sulfamerazine | 1,4 | 265,0754 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 265,0755 | 156,012 | 108,0443 | 265,0753 | 156,011 | 108,0443 |
| Sulfamethazine | 1,6 | 279,091 | 156,0111 | 92,0494 | | | | 279,091 | 156,0112 | 92,0506 | 279,0909 | 156,0112 | 92,0495 |
| Sulfamethoxazole | 2 | 254,0594 | 156,0111 | 92,0495 | 254,0595 | 156,0114 | 92,0501 | 254,0594 | 156,0115 | 92,0500 | 254,0591 | 156,0112 | 92,0495 |
| Sulfaquinoxaline | 2,4 | 301,0754 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 301,0747 | 156,0111 | 108,045 | 301,0752 | 156,0111 | 108,0443 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Sulfathiazole | 1,3 | 256,0209 | 156,0111 | 108,0443 | 256,0217 | 156,0105 | 108,0446 | 256,021 | 156,0114 | 108,0444 | 256,0209 | 156,0112 | 108,0443 |
| Tetracycline | 1,7 | 445,1605 | 410,1238 | 427,1504 | | | | | | | 445,1604 | 410,1228 | 427,1492 |
| Tolfenamic acid | 4,1 | 262,0629 | 244,0529 | 216,058 | | | | 262,0625 | 244,0526 | nd | 262,0628 | 244,0518 | nd |
| Toltrazuril | 4,1 | 426,073 | | | | | | 426,0735 | | | 426,072 | | |
| Trimethoprim | 1,4 | 291,1453 | 275,1141 | 230,1163 | 291,1444 | nd | 230,1178 | 291,1453 | 275,1146 | 230,1173 | 291,1451 | 275,114 | 230,1163 |
| Tylosin | 2,6 | 916,5264 | 174,1125 | 101,0597 | | | | 916,5265 | 174,1123 | 101,0596 | 916,5246 | 174,1117 | 101,0596 |
| Xylazine | 1,7 | 221,1107 | 90 | 147 | | | | 221,1116 | 90,037 | 147,023 | 221,1107 | 90,0374 | 147,0229 |
| Effluent water | | | | | | | | | | | | | |
| | RT | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | 0,01 ng mL ⁻¹ | | | 0,1 ng mL ⁻¹ | | | 1,0 ng mL ⁻¹ | | |
| PHARMACEUTICALS | | | | | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 |
| Acebutolol | 1,7 | 337,2122 | 116,1069 | 319,2021 | | | | 337,212 | 116,1071 | nd | 337,2117 | 116,1069 | 319,2009 |
| Acepromazine | 2,5 | 327,1526 | 254,0636 | 86,0964 | | | | | | | | | |
| Amoxicillin | 0,7 | 366,1118 | 349,0857 | 208,043 | | | | | | | | | |
| Ampicillin | 1,3 | 350,1169 | 160,0425 | 106,0648 | | | | | | | 350,1174 | 160,0433 | 106,0651 |
| Anlodipine | 2,7 | 409,1525 | 238,0635 | 221,0369 | | | | | | | | | |
| Atenolol | 0,8 | 267,1703 | 225,1234 | 190,0863 | 267,1707 | 225,1232 | 190,0865 | 267,1702 | 225,1235 | 190,0862 | 267,1702 | 225,1235 | 190,0862 |
| Azaperol | 1,6 | 330,1976 | | | | | | | | | 330,1972 | | |
| Betamethasone | 2,7 | 393,2072 | 373,201 | 237,1276 | | | | 393,2068 | 373,1992 | 237,1267 | | | |
| Betaxolol | 2,3 | 308,222 | 116,1069 | 98,0964 | | | | 308,2217 | 116,1071 | 98,0966 | 308,2217 | 116,1067 | 98,0966 |
| Bromhexine | 2,6 | 375,0066 | 263,8842 | 114,1277 | | | | | | | 375,0062 | 263,8848 | 114,1276 |
| Caffeine | 1,3 | 195,0874 | 138,066 | | 195,0878 | 138,0661 | | 195,0874 | 138,0661 | | 195,0876 | 138,0661 | |
| Carazolol | 2,1 | 299,1754 | 222,0913 | 300,1787 | | | | | | | | | |
| Carprofen | 3,7 | 274,0629 | 228,0573 | 256,0529 | | | | | | | | | |
| Carvedilol | 2,7 | 407,1965 | | | | | | | | | | | |
| Cefalonium | 1,5 | 459,0791 | 337,0311 | 158,0269 | | | | | | | 459,0794 | 337,0311 | 158,027 |
| Cefapirin | 1,2 | 424,0632 | 152,0136 | 181,0431 | | | | 424,0632 | 152,0165 | 181,0439 | 424,063 | 152,0163 | 181,0431 |
| Cefoperazone | 2,1 | 646,1497 | 143,0814 | 290,1134 | | | | | | | 646,1482 | 143,0814 | nd |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|
| Cefquinome | 1,5 | 529,1322 | 396,0433 | 324,0584 | | | | | | | | | | |
| Ceftiofur | 2,4 | 524,0363 | 241,0391 | 210,0204 | 524,0376 | nd | nd | 524,0352 | 241,0384 | 210,0194 | 524,0358 | 241,0391 | 210,0217 | |
| Cephalexin | 1,5 | 348,1013 | 158,0269 | 174,0548 | | | | 348,1026 | 158,0273 | 174,0559 | 348,1011 | 158,027 | 174,0549 | |
| Chlorpromazine | 2,9 | 319,103 | 86,0964 | 214,0416 | | | | | | | | | | |
| Chlortetracycline | 2 | 479,1216 | 444,0843 | 462,0951 | | | | | | | | | | |
| Ciprofloxacin | 1,6 | 332,1405 | 288,1509 | 245,1085 | 332,1403 | 288,1527 | nd | 332,1403 | 288,1505 | nd | 332,1406 | 288,1515 | nd | |
| Clindamycin | 2 | 425,1871 | 126,1277 | 377,1835 | 425,1878 | 126,1279 | 377,1833 | 425,1868 | 126,1279 | 377,1825 | 425,1865 | 126,1276 | 377,1835 | |
| Clopidol | 1,1 | 191,9977 | 157,0281 | 193,995 | 191,9977 | nd | 193,9948 | 191,9976 | nd | 193,995 | 191,9977 | 157,0281 | 193,9947 | |
| Cloxacillin | 3,4 | 436,0728 | 160,0426 | 277,0375 | | | | | | | 436,0734 | 160,0427 | 277,0376 | |
| Danofloxacin | 1,7 | 358,1561 | 359,1592 | 340,1455 | | | | | | | 358,1562 | 359,16 | 314,1479 | |
| Decoquinat | 4,3 | 418,2588 | 372,2165 | 390,2284 | | | | | | | 418,2588 | 372,2154 | 390,2295 | |
| Dexamethasone | 2,7 | 393,2072 | 373,201 | 279,1743 | | | | 393,2068 | 373,1992 | 279,1714 | | | | |
| Diaveridine | 1,3 | 261,1346 | 245,1035 | 123,0663 | | | | 261,134 | nd | nd | 261,1346 | 245,1034 | 123,0661 | |
| Diclofenac | 3,8 | 296,024 | 214,0417 | 250,0183 | 296,0252 | 214,0414 | 250,0193 | 296,0232 | 214,0416 | 250,0178 | 296,0239 | 214,0417 | 250,0181 | |
| Dicloxacillin | 3,6 | 470,0339 | 160,0424 | 114,037 | | | | | | | 470,034 | 160,0426 | 114,0363 | |
| Difloxacin | 1,9 | 400,1467 | 356,1569 | 299,0991 | | | | | | | 400,1461 | 356,1568 | 299,099 | |
| Doxytetracycline | 1,7 | 445,1605 | 154,05 | 428,1356 | | | | | | | 445,1595 | 154,051 | 428,1359 | |
| Enrofloxacin | 1,7 | 360,1718 | 316,182 | 342,1613 | | | | 360,1719 | 316,1805 | 342,1626 | 360,1715 | 316,1816 | 342,1622 | |
| Erythromycin | 2,4 | 734,4685 | 576,3745 | 158,1175 | 734,4682 | nd | 158,116 | 734,4662 | 576,3724 | 158,1172 | 734,4683 | 576,3723 | 158,1169 | |
| Flunixin | 2,9 | 297,0845 | 279,0741 | 298,0878 | 297,0858 | 279,076 | 298,0899 | 297,0844 | 279,0741 | 298,088 | 297,0844 | 279,074 | 298,0879 | |
| Hydrochlorothiazide | 1,3 | 297,9718 | 139,9898 | 107,9902 | 297,9722 | 139,9888 | nd | 297,9719 | 139,9891 | 107,9906 | 297,972 | 139,9893 | 107,9882 | |
| Indomethacin | 3,8 | 358,0841 | 138,9944 | 110,9996 | | | | 358,0848 | 138,9932 | nd | 358,0834 | 138,9941 | 110,9988 | |
| Ketoprofen | 3,1 | 255,1016 | 209,0961 | 105,0335 | 255,1026 | 209,0966 | 105,0338 | 255,1013 | 209,0956 | 105,0333 | 255,1014 | 209,0959 | 105,0331 | |
| Labetalol | 2,1 | 329,186 | 162,0547 | 294,1486 | | | | | | | | | | |
| Lasalocid sodium | 5,1 | 613,3711 | 573,378 | 555,3675 | | | | | | | | | | |
| Lidocaine | 1,4 | 235,1805 | 86,0966 | 58,0652 | 235,1807 | 86,0965 | 58,0653 | 235,1802 | 86,0964 | 58,0653 | 235,1805 | 86,0964 | 58,0651 | |
| Lincomycin | 1,2 | 407,221 | 126,1277 | 359,218 | 407,2207 | 126,1276 | 359,2166 | 407,2211 | 126,1275 | 359,2163 | 407,221 | 126,1277 | 359,2179 | |
| Maduramicin ammonium | 5,1 | 934,5734 | 629,4043 | 647,4146 | | | | | | | | | | |
| Mefenamic acid | 4 | 242,1176 | 224,1069 | | 242,1175 | nd | | 242,117 | 224,1069 | | 242,1177 | 224,1066 | | |
| Meloxicam | 3,3 | 352,042 | 353,0446 | 115,0281 | 352,042 | 353,0454 | | 352,0419 | 353,045 | nd | 352,042 | 353,0449 | 115,0324 | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Metoprolol | 1,7 | 268,1907 | 116,107 | 133,0648 | 268,1911 | 116,107 | 133,0649 | 268,1906 | 116,1071 | 133,0648 | 268,1906 | 116,1068 | 133,0649 |
| Miconazole | 3,6 | 414,9933 | 416,9901 | 69,0452 | | | | | | | 414,993 | 416,9901 | 69,0445 |
| Monensin sodium | 4,9 | 693,4184 | 461,3 | 479,3 | | | | | | | 693,4168 | 461,325 | nd |
| Nadolol | 1,4 | 310,2015 | 254,1388 | 201,0911 | | | | 310,2012 | 254,1382 | nd | 310,2015 | 254,1388 | 201,0919 |
| Nafcillin | 3,4 | 415,1321 | 256,0968 | 199,0753 | | | | | | | | | |
| Nalidixic acid | 2,6 | 233,0921 | 215,0814 | 187,0501 | 233,0916 | 215,0813 | 187,0501 | 233,0916 | 215,0813 | 187,0501 | 233,0921 | 215,0815 | 187,0102 |
| Naproxen | 3,2 | 231,1016 | 185,096 | 170,0728 | | | | | | | 231,1013 | 185,0957 | 170,0729 |
| Nebivolol | 2,9 | 406,1824 | | | | | | | | | | | |
| Nimesulide | 3,6 | 309,054 | 145,0634 | 128,0577 | | | | | | | 309,0535 | 145,0648 | nd |
| Norfloracin | 1,5 | 320,1405 | 231,0562 | 302,1292 | | | | | | | 320,1403 | nd | 302,1299 |
| Oxacillin | 3 | 402,1118 | 160,0426 | 243,0765 | | | | | | | 402,1112 | 160,0425 | 243,0761 |
| Oxolinic acid | 2,2 | 262,071 | 244,0606 | 216,0294 | 262,0714 | 244,0617 | nd | 262,0705 | 244,0603 | nd | 262,0707 | 244,0602 | 216,0263 |
| Oxytetracycline | 1,6 | 461,1555 | 426,1185 | 444,1301 | | | | | | | 461,1554 | 426,1183 | 444,1288 |
| Paracetamol | 0,8 | 152,0706 | 110,06 | 93,0334 | | | | | | | 152,0704 | 110,06 | 93,033 |
| Penbutolol | 2,8 | 292,2271 | 236 | 293 | | | | 292,2266 | 236,1661 | 293,2105 | 292,227 | 236,1649 | 293,229 |
| Penicillin G | 2,6 | 335,106 | 160,0425 | 114,0372 | | | | | | | | | |
| Penicillin V | 2,7 | 351,1009 | 160,0425 | 114,0372 | | | | | | | | | |
| Piroxicam | 2,6 | 332,07 | 121,0395 | 95,0604 | 332,0711 | 121,0393 | 95,0601 | 332,0694 | 121,0396 | 95,0602 | 332,0695 | 121,0393 | 95,0602 |
| Phenylbutazone | 3,7 | 309,1598 | 211,0871 | 69,0704 | | | | | | | 309,1593 | 211,0861 | 69,0699 |
| Prednisolone | 2,4 | 361,201 | 343,1903 | 325,1798 | 361,2021 | 343,1897 | 325,1791 | 361,2007 | 343,1899 | 325,1791 | | | |
| Prednisone | 2,4 | 359,1853 | 341,175 | 237,1275 | 359,1857 | 341,1756 | 237,1268 | 359,1847 | 341,1746 | 237,127 | | | |
| Propranolol | 2,2 | 260,1645 | 74,06 | 116,107 | 260,1653 | 74,0605 | 116,1072 | 260,1644 | 74,0604 | 116,1068 | 260,1642 | 74,0599 | 116,1066 |
| Propyphenazone | 2,7 | 231,1492 | 189,1022 | 201,1026 | 231,1487 | nd | nd | 231,1488 | 189,1051 | 201,1022 | 231,149 | 189,1023 | 201,1019 |
| Robenidine | 3,2 | 334,0621 | 155,037 | 138,0105 | | | | | | | | | |
| Sarafloxacin | 1,9 | 386,1311 | 387,1373 | 299,1014 | | | | | | | 386,1304 | 387,133 | 299,1009 |
| Sotalol | 0,8 | 273,1267 | 133,076 | 255,1162 | 273,1272 | 133,076 | 255,1162 | 273,1269 | 133,0761 | 255,1161 | 273,1268 | 133,0758 | 255,1162 |
| Sulfachloropyridazine | 2 | 285,0208 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 285,0213 | nd | 108,0446 | 285,0207 | 156,0112 | 108,0443 |
| Sulfadiazine | 1,2 | 251,0597 | 156,0111 | 108,0443 | 251,0587 | nd | 108,0446 | 251,0595 | 156,0115 | 108,0447 | 251,0602 | 156,0113 | 108,0442 |
| Sulfadimethoxine | 2,3 | 311,0809 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 311,081 | 156,0116 | 108,0446 | 311,081 | 156,0117 | 108,0445 |
| Sulfadoxine | 2 | 311,0809 | 245,1032 | 156,0111 | | | | 311,0814 | nd | 156,0115 | 311,0806 | 245,1028 | 156,0112 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Sulfamerazine | 1,4 | 265,0754 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 265,0743 | 156,0119 | 108,0444 | 265,0754 | 156,0115 | 108,0445 |
| Sulfamethazine | 1,6 | 279,091 | 156,0111 | 92,0494 | 279,0904 | nd | 92,0497 | 279,0902 | nd | 92,0497 | 279,0912 | 156,0113 | 92,0494 |
| Sulfamethoxazole | 2 | 254,0594 | 156,0111 | 92,0495 | 254,0598 | 156,0119 | 92,0498 | 254,0593 | 156,0116 | 92,0502 | 254,0593 | 156,0112 | 92,05 |
| Sulfaquinoxaline | 2,4 | 301,0754 | 156,0111 | 108,0443 | | | | | | | 301,0752 | 156,0112 | 108,0445 |
| Sulfathiazole | 1,3 | 256,0209 | 156,0111 | 108,0443 | | | | 256,0207 | 156,0112 | 108,0445 | 256,021 | 156,0112 | 108,0444 |
| Tetracycline | 1,7 | 445,1605 | 410,1238 | 427,1504 | | | | | | | 445,1595 | 410,1236 | 427,1513 |
| Tolfenamic acid | 4,1 | 262,0629 | 244,0529 | 216,058 | | | | | | | | | |
| Toltrazuril | 4,1 | 426,073 | | | | | | | | | | | |
| Trimethoprim | 1,4 | 291,1453 | 275,1141 | 230,1163 | 291,1454 | 275,1155 | 230,1187 | 291,145 | 275,1135 | 230,117 | 291,1453 | 275,1141 | 230,1173 |
| Tylosin | 2,6 | 916,5264 | 174,1125 | 101,0597 | | | | | | | 916,5237 | 174,1112 | 101,0596 |
| Xylazine | 1,7 | 221,1107 | 90 | 147 | | | | | | | 221,1107 | 90,0371 | 147,0231 |

Fonte: a autora.

Tabela III. Lista dos fragmentos de m/z monitorados dos pesticidas incluídos no método de triagem juntamente com os íons encontrados nas amostras da validação em água superficial e efluente.

| PESTICIDAS | RT | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | Surface water | | | | | | | | |
|-----------------|-----|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | | | 0,01 ng mL ⁻¹ | | | 0,1 ng mL ⁻¹ | | | 1,0 ng mL ⁻¹ | | |
| | | | | | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 |
| Acephate | 0,8 | 184,0192 | 142,9926 | 124,9823 | | | | | | | 184,0198 | 142,9926 | 124,9828 |
| Acetamiprid | 2,2 | 223,0745 | 56,0503 | 126,0107 | 223,0742 | | 126,0109 | 223,0749 | | 126,0114 | 223,0742 | 56,0498 | 126,0107 |
| Alachlor | 3,7 | 270,1255 | 162,1276 | 238,0992 | | | | 270,1263 | 162,1287 | 238,0996 | 270,1252 | 162,1275 | 238,0990 |
| Azinphos ethyl | 4,0 | 346,0443 | 132,0441 | 160,0502 | | | | | | | 346,0447 | 132,0445 | 160,0508 |
| Azinphos methyl | 3,5 | 318,0130 | 132,0442 | 261,0045 | | | | | | | 318,0125 | 132,0445 | 261,0447 |
| Azoxystrobin | 3,7 | 404,1240 | 344,1035 | 372,0984 | 404,1244 | | 372,0980 | 404,1252 | 344,1045 | 372,0987 | 404,1251 | 344,1035 | 372,0986 |
| Benomyl | 1,6 | 291,1452 | | | 291,1452 | | | 291,1454 | | | 291,1454 | | |
| Bitertanol | 3,8 | 338,1863 | 70,0400 | 99,0076 | | | | | | | 338,1867 | 70,0400 | 99,0076 |
| Boscalid | 3,7 | 343,0399 | 307,0638 | 139,9903 | | | | 343,0403 | 307,0642 | 139,9904 | 343,0402 | 307,0630 | 139,9898 |
| Bromuconazole | 3,6 | 375,9614 | 158,9761 | 70,0400 | | | | 375,9627 | 158,9770 | 70,0405 | 375,9616 | 158,9759 | 70,0400 |
| Bupirimate | 3,2 | 317,1642 | 166,0975 | 108,0114 | 317,1649 | | | 317,1653 | 166,0971 | 108,0125 | 317,1639 | 166,0987 | 108,0108 |
| Carbaryl | 2,4 | 202,0863 | 145,0653 | 117,0704 | 202,0860 | | 117,0707 | 202,0859 | | 117,0700 | 202,0855 | 143,0651 | 117,0696 |
| Carbendazim | 1,2 | 192,0768 | 160,0511 | 132,0562 | 192,0770 | 160,0513 | 132,0564 | 192,0769 | 160,0508 | 132,0554 | 192,0765 | 160,0503 | 132,0556 |
| Carbofuran | 2,7 | 222,1125 | 165,0916 | 123,0446 | 222,1135 | 165,0908 | 123,0440 | 222,1127 | 165,0915 | 123,0443 | 222,1120 | 165,0906 | 123,0437 |
| Chlorfenvinphos | 4,0 | 358,9768 | 155,0465 | 127,0154 | 358,9752 | 155,0475 | 127,0158 | 358,9776 | 155,0474 | 127,0161 | 358,9771 | 155,0464 | 127,0155 |
| Chlorbromuron | 3,5 | 292,9687 | | | | | | 292,9685 | | | 292,9681 | | |
| Cyproconazole | 3,4 | 292,1211 | 70,0402 | 125,0154 | 292,1213 | 70,0392 | 125,0140 | 292,1217 | 70,0403 | 125,0157 | 292,1208 | 70,0398 | 125,0151 |
| DEET | 2,9 | 192,1383 | 119,0492 | 91,0542 | 192,1384 | 119,0490 | 91,0545 | 192,1389 | 119,0499 | 91,0549 | 192,1382 | 119,0487 | 91,0548 |
| Diazinon | 4,0 | 305,1083 | 169,0803 | 153,1028 | 305,1096 | 169,0804 | | 305,1092 | 169,0800 | 153,1027 | 305,1082 | 169,0790 | 153,1021 |
| Dichlorvos | 2,5 | 220,9532 | 127,0151 | 205,1580 | | | | 220,9539 | 127,0164 | 205,1582 | 220,9533 | 127,0156 | |
| Dicrotophos | 1,7 | 238,0839 | | | | | | 238,0844 | | | 238,0837 | | |
| Difenoconazole | 4,1 | 406,0720 | 251,0030 | 337,0398 | | | | 406,0734 | 251,0032 | 337,0397 | 406,0722 | 251,0011 | 337,0398 |
| Dimethoate | 2,1 | 230,0069 | 124,9826 | 170,9705 | | | | 230,0067 | 124,9826 | 170,9713 | 230,0066 | 124,9820 | 170,9694 |
| Dimethomorph | 3,5 | 388,1310 | 301,0633 | 165,0549 | | | | 388,1323 | 301,0640 | ND | 388,1310 | 301,0622 | 165,0538 |
| Dimoxystrobin | 3,9 | 327,1703 | 116,0494 | 205,0972 | | | | 327,1703 | 116,0501 | 205,0977 | 327,1705 | 116,0493 | 205,0969 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Disulfoton sulfone | 3,4 | 307,0256 | | | | | | 307,0267 | | | 307,0254 | | |
| Disulfoton sulfoxide | 3,0 | 291,0307 | | | 291,0306 | | | 291,0313 | | | 291,0303 | | |
| Diuron | 3,0 | 233,0242 | 176,0511 | 72,0449 | 233,0258 | | 72,0442 | 233,0249 | | 72,0449 | 233,0239 | 72,0443 | |
| Dodemorph | 3,0 | 282,2791 | 116,1068 | 98,0964 | | | | 282,2803 | 116,1074 | 98,0972 | 282,1786 | 116,1068 | 98,0964 |
| Epoxiconazole | 3,6 | 330,0804 | 123,0330 | 141,0144 | 330,0798 | | | 330,0813 | 123,0249 | 141,0112 | 330,0803 | 123,0240 | 141,0099 |
| Esfenvalerate | 3,6 | 330,0804 | | | | | | 330,0813 | | | 330,0804 | | |
| Ethiocarb sulfone | 2,3 | 258,0795 | | | | | | | | | 258,0795 | | |
| Ethiofencarb sulfoxide | 1,9 | 242,0845 | | | | | | 242,0850 | | | 242,0845 | | |
| Ethiprole | 3,5 | 396,9899 | | | | | | 396,9904 | | | 396,9900 | | |
| Ethirimol | 1,9 | 210,1601 | | | 210,1600 | | | 210,1602 | | | 210,1598 | | |
| Ethoprophos | 3,5 | 243,0637 | 172,9857 | 130,9833 | 243,0638 | | | 243,0640 | 172,9862 | | 243,0631 | 172,9852 | 130,9839 |
| Etrinfos | 4,0 | 293,0719 | 265,0404 | 142,9924 | 293,0737 | 265,0407 | 142,9914 | 293,0728 | 265,0412 | 142,9932 | 293,0717 | 265,0404 | 142,9931 |
| Fenamiphos | 3,5 | 304,1131 | 217,0082 | 234,0348 | 304,1133 | | 234,0329 | 304,1139 | 217,0087 | 234,0355 | 304,1127 | 217,0078 | 234,0345 |
| Fenamiphos sulfone | 2,8 | 336,1029 | 266,0247 | 308,0716 | 336,1023 | 266,0259 | 308,0703 | 336,1034 | 266,0249 | 308,0722 | 336,1027 | 266,0239 | 308,0709 |
| Fenarimol | 3,5 | 331,0399 | 268,0523 | 81,0446 | 331,0383 | | | 331,0409 | 268,0530 | 81,0458 | 331,0397 | 268,0521 | 81,0449 |
| Fenobucarb | 3,3 | 208,1332 | 95,0497 | 152,0712 | 208,1327 | 95,0498 | 152,0713 | 208,1331 | 95,0502 | 152,0721 | 208,1330 | 95,0490 | 152,0709 |
| Flufenacet | 3,9 | 364,0737 | 152,0512 | | | | | 364,0759 | 152,0516 | | 364,0746 | 152,0505 | |
| Flusilazole | 3,8 | 316,1076 | 187,0575 | 165,0694 | 316,1069 | | | 316,1086 | 187,0599 | 165,0703 | 316,1076 | 187,0581 | 165,0701 |
| Flutriafol | 3,0 | 302,1099 | 233,0773 | 123,0240 | 302,1094 | 233,0784 | 123,0231 | 302,1107 | 233,0782 | 123,0249 | 302,1095 | 233,0766 | 123,0239 |
| Foramsulfuron | 2,7 | 453,1187 | 182,0566 | 272,0705 | | | | 453,1192 | 182,0566 | 272,0709 | 453,1199 | 182,0556 | 272,0696 |
| Fosthiazate | 2,9 | 284,0538 | 104,0164 | 227,9912 | 284,0542 | 104,0162 | 227,9917 | 284,0549 | 104,0168 | 227,9918 | 284,0535 | 104,0162 | 227,9907 |
| Hexaconazole | 3,7 | 314,0821 | | | 314,0819 | | | 314,0828 | | | 314,0822 | | |
| Imazalil | 2,8 | 297,0556 | 255,0073 | 200,9876 | | | | 297,0561 | | 200,9869 | 297,0550 | 255,0089 | 200,9863 |
| Imazapic | 2,0 | 276,1343 | | | | | | 276,1348 | | | 276,1342 | | |
| Imazapyr | 1,7 | 262,1186 | | | | | | | | | 262,1185 | | |
| Imidacloprid | 2,1 | 256,0596 | 209,0586 | 175,0979 | 256,0604 | | | 256,0597 | 209,0591 | 175,0987 | 256,0595 | 209,0585 | 175,0976 |
| Iprobenphos | 3,7 | 289,1022 | | | | | | 289,1038 | | | 289,1021 | | |
| Iprodione | 3,9 | 330,0407 | 244,9880 | 287,9937 | | | | 330,0401 | 244,9881 | 287,9953 | 330,0407 | 244,9883 | 287,9964 |
| Iprovalicarb | 3,5 | 321,2173 | 119,0861 | 203,1396 | | | | 321,2179 | 119,0860 | 203,1397 | 321,2169 | 119,0852 | 203,1385 |
| Isoproturon | 2,9 | 207,1492 | 72,0443 | 165,1021 | 207,1492 | 72,0444 | | 207,1496 | 72,0448 | 165,1020 | 207,1488 | 72,0443 | 165,1019 |
| Linurom | 3,4 | 249,0192 | 159,9718 | 81,0707 | | | | 249,0209 | 159,9718 | 81,0705 | 249,0187 | 159,9712 | 81,0702 |
| Malaoxon | 2,7 | 315,0662 | 99,0076 | 127,0389 | 315,0657 | 99,0074 | 127,0389 | 315,0669 | 99,0080 | 127,0392 | 315,0660 | 99,0074 | 127,0387 |
| Malathion | 3,8 | 331,0433 | 127,0395 | 99,0085 | | | | 331,0448 | 127,0395 | 99,0085 | 331,0432 | 127,0388 | 99,0075 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mephospholan | 2,5 | 270,0382 | | | 270,0374 | | | 270,0386 | | | 270,0377 | | |
| Mesotrione | 2,9 | 340,0485 | 227,9959 | | | | | 340,0482 | 227,9965 | | 340,0482 | 227,9958 | |
| Metalaxyl | 3,0 | 280,1543 | 220,1325 | 192,1381 | 280,1539 | 220,1338 | 192,1386 | 280,1548 | 220,1336 | 192,1388 | 280,1540 | 220,1328 | 192,1379 |
| Metazachlor | 3,2 | 278,1055 | 134,0965 | 210,0681 | | | | 278,1060 | 134,0969 | 210,0681 | 278,1048 | 134,0961 | 210,0675 |
| Metconazole | 3,8 | 320,1524 | 70,0399 | 125,0156 | 320,1522 | 70,0400 | | 320,1533 | 70,0403 | 125,0184 | 320,1524 | 70,0400 | 125,0160 |
| Methamidophos | 0,6 | 142,0086 | 94,0053 | 95,0136 | | | | | | | | | |
| Methidathion | 3,5 | 302,9691 | 85,0400 | 145,0065 | | | | 302,9708 | 85,0403 | 145,0079 | 302,9678 | 85,0396 | 145,0066 |
| Methiocarb sulfone | 1,9 | 258,0795 | | | | | | | | | 258,0791 | | |
| Methiocarb sulfone NH4 | 2,0 | 275,1066 | | | | | | | | | 275,1062 | | |
| Methiocarb sulfoxide | 1,8 | 242,0845 | | | | | | 242,0850 | | | 242,0845 | | |
| Methomyl | 1,4 | 163,0536 | 88,0216 | 106,0322 | | | | | | | 163,0535 | 88,0215 | 106,0323 |
| Methoxyfenozide | 3,7 | 369,2179 | 313,1552 | 149,0603 | | | | 369,2187 | 313,1557 | 149,0602 | 369,2177 | 313,1550 | 149,0595 |
| Metoxuron | 2,4 | 229,0738 | 72,0443 | 156,0210 | 229,0745 | 72,0443 | | 229,0741 | 72,0448 | | 229,0733 | 72,0443 | 156,0183 |
| Metsulfuron methyl | 2,8 | 382,0816 | 167,0569 | 199,0065 | 382,0824 | 167,0559 | | 382,0828 | 167,0567 | 199,0047 | 382,0816 | 167,0557 | 199,0073 |
| Mevinphos | 2,1 | 225,0523 | 127,0155 | 193,0263 | | | | | | | 225,0525 | 127,0154 | 193,0261 |
| Monocrotophos | 1,4 | 224,0682 | 127,0154 | 98,0605 | | | | 224,0691 | 127,0160 | 98,0605 | 224,0683 | 127,0154 | 98,0599 |
| Monuron | 2,5 | 199,0633 | 72,0444 | 154,0050 | 199,0631 | 72,0441 | 154,0046 | 199,0639 | 72,0448 | 154,0035 | 199,0628 | 72,0443 | 154,0051 |
| Myclobutanil | 3,6 | 289,1215 | 91,0549 | 164,0704 | 289,1218 | 91,0544 | | 289,1219 | 91,0550 | | 289,1212 | 91,0547 | ND |
| Nitenpyram | 1,6 | 271,0956 | 196,0642 | 126,0111 | | | | 271,0955 | 196,0642 | 126,0125 | 271,0967 | 196,0633 | 126,0120 |
| Nuarimol | 3,3 | 315,0695 | 252,0819 | 81,0447 | 315,0692 | 252,0802 | 81,0443 | 315,0702 | 252,0822 | 81,0454 | 315,0691 | 252,0818 | 81,0448 |
| Omethoate | 1,0 | 214,0297 | 142,9932 | 124,9820 | | | | | | | 214,0298 | 142,9931 | 124,9821 |
| Oxycarboxin | 2,4 | 268,0639 | 175,0065 | 146,9752 | | | | 268,0651 | 175,0059 | | 268,0635 | 175,0056 | 146,9747 |
| Paclobutrazol | 3,3 | 294,1368 | 70,0400 | 125,0151 | 294,1362 | 70,0402 | | 294,1374 | 70,0403 | 125,0149 | 294,1363 | 70,0398 | 125,0154 |
| Paraoxon ethyl | 3,1 | 276,0632 | 220,0006 | 94,0414 | 276,0639 | 220,0013 | | 276,0643 | 220,0013 | 94,0425 | 276,0626 | 220,0006 | 94,0414 |
| Paraoxon methyl | 2,6 | 248,0319 | 202,0388 | 90,0464 | 248,0312 | | 90,0462 | 248,0327 | 202,0409 | | 248,0313 | 202,0391 | 90,0457 |
| Penconazole | 3,7 | 284,0716 | 70,0399 | 158,9760 | 284,0709 | 70,0397 | | 284,0720 | 70,0403 | 158,9767 | 284,0714 | 70,0399 | 158,9759 |
| Pencycuron | 4,3 | 329,1415 | 125,0151 | 89,0591 | | | | | | | 329,1415 | 125,0157 | 89,0599 |
| Phosphamidon | 2,5 | 300,0762 | | | 300,0759 | | | 300,0764 | | | 300,0759 | | |
| Pirimicarb | 1,8 | 239,1503 | 72,0452 | 182,1291 | 239,1498 | 72,0455 | 182,1287 | 239,1505 | 72,0446 | 182,1292 | 239,1501 | 72,0444 | 182,1285 |
| Pirimiphos ethyl | 4,2 | 334,1349 | 198,1079 | 182,1292 | | | | 334,1357 | 198,1067 | 182,1300 | 334,1341 | 198,1061 | 182,1295 |
| Pirimiphos methyl | 3,8 | 306,1036 | 164,1197 | 278,0743 | 306,1040 | 164,1187 | 278,0760 | 306,1043 | 164,1189 | 278,0750 | 306,1032 | 164,1182 | |
| Prochloraz | 3,4 | 376,0381 | 265,9540 | 308,0016 | | | | 376,0389 | 265,9531 | 308,0012 | 376,0379 | 265,9536 | 308,0008 |
| Procymidone NH4 | 2,8 | 301,0511 | | | | | | 301,0492 | | | 301,0491 | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Promecarb | 3,4 | 208,1332 | 109,0653 | 151,1123 | | | 208,1331 | 109,0651 | 151,1124 | 208,1330 | 109,0646 | 151,1116 | |
| Prometryn | 2,7 | 242,1434 | 186,0799 | 200,0973 | 242,1433 | 200,0962 | 242,1437 | | 200,0967 | 242,1429 | | 200,0960 | |
| Propamocarb | 1,1 | 189,1604 | 102,0555 | 144,1025 | 189,1598 | 102,0548 | 144,1025 | 189,1601 | 102,0551 | 144,1030 | 189,1595 | 102,0548 | 144,1021 |
| Propanil | 3,2 | 218,0134 | 127,0189 | 161,9877 | | | 218,0145 | 127,0189 | 161,9888 | 218,0130 | 127,0180 | 161,9869 | |
| Propiconazole | 3,9 | 342,0771 | 158,9762 | 69,0699 | 342,0770 | 158,9758 | 69,0702 | 342,0780 | 158,9769 | 69,0698 | 342,0773 | 158,9760 | 69,0700 |
| Propoxur | 2,7 | 210,1125 | 111,0446 | 93,0340 | | | 210,1136 | 111,0443 | 93,0340 | 210,1119 | 111,0448 | 93,0333 | |
| Prosulfuron | 3,6 | 420,0948 | | | | | 420,0954 | | | 420,0958 | | | |
| Pyrazophos | 4,2 | 374,0934 | 222,0872 | 194,0559 | | | | | | 374,0954 | 222,0880 | | |
| Simazine | 2,4 | 202,0852 | 104,0015 | 132,0328 | 202,0860 | 132,0332 | 202,0859 | 104,0009 | 132,0333 | 202,0848 | 104,0010 | 132,0320 | |
| Tebuconazole | 3,6 | 308,1524 | 125,0158 | 151,0315 | 308,1513 | | 308,1532 | 125,0168 | 151,0329 | 308,1522 | 125,0159 | 151,0313 | |
| Thiabendazole | 1,4 | 202,0433 | 175,0330 | 131,0606 | 202,0445 | 175,0332 | 202,0436 | 175,0334 | | 202,0432 | 175,0322 | 131,0634 | |
| Thiacloprid | 2,5 | 253,0309 | 126,0112 | 186,0151 | 253,0319 | 126,0116 | 253,0319 | 126,0109 | | 253,0305 | 126,0112 | 186,0144 | |
| Thiamethoxam | 1,8 | 292,0266 | 211,0654 | 152,0282 | 292,0267 | 211,0652 | 292,0275 | 211,0652 | 152,0292 | 292,0267 | 211,0647 | 152,0278 | |
| Thifensulfuron methyl | 2,8 | 388,0383 | 269,9493 | 167,0563 | 388,0374 | 167,0576 | 388,0385 | 269,9517 | 167,0568 | 388,0383 | 269,9454 | 167,0558 | |
| Thiodicarb | 2,9 | 355,0563 | 88,0221 | 107,9936 | 355,0556 | 88,0216 | 107,9954 | 355,0579 | 88,0216 | 107,9939 | 355,0558 | 88,0212 | 107,9932 |
| Thiophanate methyl | 2,8 | 343,0529 | 151,0324 | 192,0759 | | | | | | 343,0531 | 151,0334 | 192,0683 | |
| Triadimefon | 3,6 | 294,1004 | 197,0742 | 69,0708 | 294,1002 | 197,0730 | 69,0702 | 294,1013 | 197,0733 | 69,0702 | 294,1001 | 197,0725 | 69,0698 |
| Triadimenol | 3,4 | 296,1160 | 70,0399 | 99,0804 | | | 296,1167 | 70,0398 | 99,0805 | 296,1158 | 70,0399 | 99,0805 | |
| Triasulfuron | 3,0 | 402,0635 | 141,0776 | 167,0569 | 402,0636 | 141,0777 | 167,0579 | 402,0641 | 141,0779 | 167,0570 | 402,0637 | 141,0768 | 167,0558 |
| Triazophos | 3,8 | 314,0723 | 162,0661 | 114,9622 | 314,0730 | 162,0662 | | 314,0729 | 162,0666 | 114,9619 | 314,0722 | 162,0659 | 114,9912 |
| Trichlorfon | 1,8 | 256,9299 | 109,0047 | 220,9532 | | | | 256,9300 | 109,0052 | 220,9535 | 256,9298 | 109,0050 | 220,9542 |
| Tricyclazole | 2,2 | 190,0438 | 136,0221 | 163,0330 | 190,0437 | 163,0337 | 190,0436 | 136,0223 | 163,0329 | 190,0430 | 136,0215 | 163,0322 | |
| Trifloxysulfuron | 3,1 | 438,0690 | | | 438,0681 | | | 438,0707 | | 438,0690 | | | |
| Trinexapac ethyl | 3,2 | 253,1071 | 207,0657 | 165,0188 | | | 253,1081 | 207,0677 | 165,0173 | 253,1068 | 207,0651 | 165,0185 | |

Effluent water

| | RT | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | 0,01 ng mL ⁻¹ | 0,1 ng mL ⁻¹ | 1,0 ng mL ⁻¹ | | | | | | |
|-------------------|-----|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| PESTICIDES | | | | | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 | [M+H] ⁺ | [M+H] ⁺ transition 1 | [M+H] ⁺ transition 2 |
| Acephate | 0,8 | 184,0192 | 142,9926 | 124,9823 | | | | | | | | | |
| Acetamiprid | 2,2 | 223,0745 | 56,0503 | 126,0107 | | 223,0747 | 56,0503 | 126,0110 | 223,0750 | 56,0493 | 126,0108 | | |
| Alachlor | 3,7 | 270,1255 | 162,1276 | 238,0992 | | 270,1247 | 162,1277 | 238,0994 | 270,1258 | 162,1279 | 238,0996 | | |
| Azinphos ethyl | 4,0 | 346,0443 | 132,0441 | 160,0502 | | | | | 346,0466 | 132,0449 | 160,0502 | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Azinphos methyl | 3,5 | 318,0130 | 132,0442 | 261,0045 | | | | | | | 318,0138 | 132,0448 | 261,0053 |
| Azoxystrobin | 3,7 | 404,1240 | 344,1035 | 372,0984 | 404,1247 | 344,1047 | 372,0984 | 404,1234 | 344,1018 | 372,0970 | 404,1250 | 344,1036 | 372,0988 |
| Benomyl | 1,6 | 291,1452 | | | 291,1449 | | | 291,1446 | | | 291,1456 | | |
| Bitertanol | 3,8 | 338,1863 | 70,0400 | 99,0076 | | | | 338,1874 | 70,0401 | 99,0076 | 338,1873 | 70,0403 | 99,0078 |
| Boscalid | 3,7 | 343,0399 | 307,0638 | 139,9903 | 343,0404 | | | 343,0382 | 307,0617 | 139,9894 | 343,0406 | 307,0638 | 139,9906 |
| Bromuconazole | 3,6 | 375,9614 | 158,9761 | 70,0400 | | | | 375,9604 | 158,9758 | 70,0402 | 375,9621 | 158,9767 | 70,0404 |
| Bupirimate | 3,2 | 317,1642 | 166,0975 | 108,0114 | 317,1658 | | | 317,1633 | 166,0964 | 108,0108 | 317,1649 | 166,0969 | 108,0113 |
| Carbaryl | 2,4 | 202,0863 | 145,0653 | 117,0704 | 202,0856 | 145,0653 | | 202,0852 | 145,0659 | 117,0708 | 202,0857 | 145,0653 | 117,0713 |
| Carbendazim | 1,2 | 192,0768 | 160,0511 | 132,0562 | 192,0768 | 160,0506 | 132,0555 | 192,0767 | 160,0505 | 132,0565 | 192,0768 | 160,0505 | 132,0562 |
| Carbofuran | 2,7 | 222,1125 | 165,0916 | 123,0446 | | | | 222,1125 | 165,0911 | 123,0442 | 222,1129 | 165,0912 | 123,0443 |
| Chlorfenvinphos | 4,0 | 358,9768 | 155,0465 | 127,0154 | 358,9776 | 155,0472 | 127,0165 | 358,9757 | 155,0472 | 127,0156 | 358,9776 | 155,0472 | 127,0158 |
| Chlorbromuron | 3,5 | 292,9687 | | | | | | 292,9692 | | | 292,9690 | | |
| Cyproconazole | 3,4 | 292,1211 | 70,0402 | 125,0154 | 292,1224 | 70,0411 | 125,0159 | 292,1204 | 70,0401 | 125,0154 | 292,1216 | 70,0403 | 125,0156 |
| DEET | 2,9 | 192,1383 | 119,0492 | 91,0542 | 192,1384 | 119,0493 | 91,0549 | 192,1381 | 119,0490 | 91,0543 | 192,1385 | 119,0494 | 91,0547 |
| Diazinon | 4,0 | 305,1083 | 169,0803 | 153,1028 | 305,1094 | 169,0805 | 153,1023 | 305,1080 | 169,0797 | 153,1021 | 305,1093 | 169,0797 | 153,1026 |
| Dichlorvos | 2,5 | 220,9532 | 127,0151 | 205,1580 | | | | 220,9519 | 127,0165 | 205,1589 | 220,9536 | 127,0162 | 205,1590 |
| Dicrotophos | 1,7 | 238,0839 | | | | | | 238,0844 | | | 238,0839 | | |
| Difenoconazole | 4,1 | 406,0720 | 251,0030 | 337,0398 | | | | | | | 406,0733 | | |
| Dimethoate | 2,1 | 230,0069 | 124,9826 | 170,9705 | | | | 230,0086 | 124,9828 | 170,9709 | 230,0077 | 124,9825 | 170,9704 |
| Dimethomorph | 3,5 | 388,1310 | 301,0633 | 165,0549 | | | | 388,1304 | 301,0625 | 165,0545 | 388,1314 | 301,0628 | 165,0550 |
| Dimoxystrobin | 3,9 | 327,1703 | 116,0494 | 205,0972 | | | | 327,1694 | 116,0493 | 205,0971 | 327,1714 | 116,0496 | 205,0974 |
| Disulfoton sulfone | 3,4 | 307,0256 | | | | | | 307,0252 | | | 307,0258 | | |
| Disulfoton sulfoxide | 3,0 | 291,0307 | | | 291,0306 | | | 291,0303 | | | 291,0312 | | |
| Diuron | 3,0 | 233,0242 | 176,0511 | 72,0449 | 233,0247 | | 72,0445 | 233,0242 | | 72,0446 | 233,0247 | | 72,0447 |
| Dodemorph | 3,0 | 282,2791 | 116,1068 | 98,0964 | 282,2787 | 116,1080 | 98,0972 | 282,2792 | 116,1066 | 98,0976 | 282,2797 | 116,1073 | 98,0966 |
| Epoxiconazole | 3,6 | 330,0804 | 123,0330 | 141,0144 | 330,0817 | | | 330,0795 | 123,0243 | 141,0091 | 330,0814 | 123,0245 | 141,0107 |
| Esfenvalerate | 3,6 | 330,0804 | | | | | | | | | 330,0814 | | |
| Ethiocarb sulfone | 2,3 | 258,0795 | | | | | | | | | 258,0806 | | |
| Ethiofencarb sulfoxide | 1,9 | 242,0845 | | | | | | | | | | | |
| Ethiprole | 3,5 | 396,9899 | | | | | | 396,9899 | | | 396,9904 | | |
| Ethirimol | 1,9 | 210,1601 | | | 210,1605 | | | 210,1601 | | | 210,1604 | | |
| Ethoprophos | 3,5 | 243,0637 | 172,9857 | 130,9833 | 243,0639 | 172,9850 | | 243,0633 | 172,9857 | | 243,0639 | 172,9854 | |
| Etrinfos | 4,0 | 293,0719 | 265,0404 | 142,9924 | 293,0721 | 265,0406 | | 293,0716 | 265,0399 | 142,9932 | 293,0728 | 265,0413 | 142,9932 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Fenamiphos | 3,5 | 304,1131 | 217,0082 | 234,0348 | 304,1143 | 217,0100 | 234,0358 | 304,1124 | 217,0080 | 234,0345 | 304,1135 | 217,0084 | 234,0351 |
| Fenamiphos sulfone | 2,8 | 336,1029 | 266,0247 | 308,0716 | | | | 336,1026 | 266,0248 | 308,0725 | 336,1036 | 266,0252 | 308,0724 |
| Fenarimol | 3,5 | 331,0399 | 268,0523 | 81,0446 | 331,0021 | | | 331,0389 | 268,0532 | 81,0455 | 331,0408 | 268,0527 | 81,0453 |
| Fenobucarb | 3,3 | 208,1332 | 95,0497 | 152,0712 | | | | | | | 208,1336 | 95,0493 | 152,0712 |
| Flufenacet | 3,9 | 364,0737 | 152,0512 | | | | | 364,0744 | 152,0507 | | 364,0744 | 152,0509 | |
| Flusilazole | 3,8 | 316,1076 | 187,0575 | 165,0694 | 316,1071 | | | 316,1069 | 187,0580 | 165,0709 | 316,1085 | 187,0589 | 165,0702 |
| Flutriafol | 3,0 | 302,1099 | 233,0773 | 123,0240 | 302,1094 | | | 302,1094 | 233,0775 | 123,0244 | 302,1104 | 233,0776 | 123,0244 |
| Foramsulfuron | 2,7 | 453,1187 | 182,0566 | 272,0705 | | | | 453,1187 | 182,0562 | 272,0701 | 453,1195 | 182,0562 | 272,0702 |
| Fosthiazate | 2,9 | 284,0538 | 104,0164 | 227,9912 | 284,0531 | 104,0171 | 227,9923 | 284,0535 | 104,0166 | 227,9911 | 284,0544 | 104,0166 | 227,9916 |
| Hexaconazole | 3,7 | 314,0821 | | | 314,0828 | | | 314,0814 | | | 314,0830 | | |
| Imazalil | 2,8 | 297,0556 | 255,0073 | 200,9876 | | | | 297,0553 | 255,0051 | 200,9863 | 297,0563 | 255,0098 | 200,9870 |
| Imazapic | 2,0 | 276,1343 | | | 276,1344 | | | 276,1337 | | | 276,1351 | | |
| Imazapyr | 1,7 | 262,1186 | | | 262,1185 | | | 262,1185 | | | | | |
| Imidacloprid | 2,1 | 256,0596 | 209,0586 | 175,0979 | 256,0603 | 209,0503 | 175,0983 | 256,0591 | 209,0583 | 175,0945 | 256,0601 | 209,0597 | 175,0978 |
| Iprobenphos | 3,7 | 289,1022 | | | | | | 289,1015 | | | 289,1026 | | |
| Iprodione | 3,9 | 330,0407 | 244,9880 | 287,9937 | | | | | | | 330,0417 | 244,9883 | 287,9952 |
| Iprovalicarb | 3,5 | 321,2173 | 119,0861 | 203,1396 | | | | | | | 321,2178 | 119,0856 | 203,1393 |
| Isoproturon | 2,9 | 207,1492 | 72,0443 | 165,1021 | 207,1486 | 72,0448 | | 207,1487 | 72,0445 | 165,1013 | 207,1493 | 72,0446 | 165,1023 |
| Linurom | 3,4 | 249,0192 | 159,9718 | 81,0707 | | | | 249,0191 | 159,9714 | 81,0697 | 249,0196 | 159,9719 | 81,0701 |
| Malaoxon | 2,7 | 315,0662 | 99,0076 | 127,0389 | | | | 315,0658 | 99,0075 | 127,0388 | 315,0670 | 99,0078 | 127,0392 |
| Malathion | 3,8 | 331,0433 | 127,0395 | 99,0085 | | | | 331,0438 | 127,0391 | 99,0073 | 331,0439 | 127,0400 | 99,0073 |
| Mephospholan | 2,5 | 270,0382 | | | 270,0391 | | | 270,0379 | | | 270,0386 | | |
| Mesotrione | 2,9 | 340,0485 | 227,9959 | | | | | 340,0468 | 227,9961 | | 340,0489 | 227,9963 | |
| Metalaxyl | 3,0 | 280,1543 | 220,1325 | 192,1381 | | | | 280,1541 | 220,1331 | 192,1384 | 280,1548 | 220,1334 | 192,1385 |
| Metazachlor | 3,2 | 278,1055 | 134,0965 | 210,0681 | | | | 278,1059 | 134,0964 | 210,0679 | 278,1060 | 134,0966 | 210,0683 |
| Metconazole | 3,8 | 320,1524 | 70,0399 | 125,0156 | 320,1521 | 70,0411 | | 320,1513 | 70,0401 | | 320,1535 | 70,0403 | 125,0166 |
| Methamidophos | 0,6 | 142,0086 | 94,0053 | 95,0136 | | | | | | | 142,0094 | 94,0037 | |
| Methidathion | 3,5 | 302,9691 | 85,0400 | 145,0065 | | | | | | | 302,9694 | 85,0399 | 145,0067 |
| Methiocarb sulfone | 1,9 | 258,0795 | | | | | | | | | | | |
| Methiocarb sulfone NH4 | 2,0 | 275,1066 | | | | | | | | | | | |
| Methiocarb sulfoxide | 1,8 | 242,0845 | | | | | | | | | 242,0848 | | |
| Methomyl | 1,4 | 163,0536 | 88,0216 | 106,0322 | | | | | | | 163,0539 | 88,0220 | 106,0324 |
| Methoxyfenozide | 3,7 | 369,2179 | 313,1552 | 149,0603 | | | | 369,2173 | 313,1552 | 149,0599 | 369,2179 | 313,1552 | 149,0600 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Metoxuron | 2,4 | 229,0738 | 72,0443 | 156,0210 | 229,0746 | 72,0445 | | 229,0733 | 72,0447 | 156,0183 | 229,0742 | 72,0446 | 156,0207 |
| Metsulfuron methyl | 2,8 | 382,0816 | 167,0569 | 199,0065 | | | | 382,0811 | 167,0563 | 199,0058 | 382,0820 | 167,0565 | 199,0069 |
| Mevinphos | 2,1 | 225,0523 | 127,0155 | 193,0263 | | | | | | | 225,0534 | 127,0157 | 193,0266 |
| Monocrotophos | 1,4 | 224,0682 | 127,0154 | 98,0605 | | | | 224,0689 | 127,0155 | 98,0606 | 224,0687 | 127,0157 | 98,0602 |
| Monuron | 2,5 | 199,0633 | 72,0444 | 154,0050 | | | | 199,0631 | 72,0445 | 154,0069 | 199,0635 | 72,0447 | 154,0062 |
| Myclobutanil | 3,6 | 289,1215 | 91,0549 | 164,0704 | 289,1226 | 91,0548 | | 289,1207 | 91,0545 | | 289,1221 | 91,0550 | |
| Nitenpyram | 1,6 | 271,0956 | 196,0642 | 126,0111 | | | | | | | | | |
| Nuarimol | 3,3 | 315,0695 | 252,0819 | 81,0447 | 315,0702 | | | 315,0689 | 252,0825 | 81,0446 | 315,0700 | 252,0823 | 81,0451 |
| Omethoate | 1,0 | 214,0297 | 142,9932 | 124,9820 | | | | 214,0301 | | 124,9826 | 214,0300 | 142,9936 | 124,9823 |
| Oxycarboxin | 2,4 | 268,0639 | 175,0065 | 146,9752 | | | | | | | 268,0645 | 175,0062 | 146,9750 |
| Paclobutrazol | 3,3 | 294,1368 | 70,0400 | 125,0151 | 294,1361 | 70,0403 | | 294,1361 | 70,0401 | 125,0157 | 294,1371 | 70,0402 | 125,0154 |
| Paraoxon ethyl | 3,1 | 276,0632 | 220,0006 | 94,0414 | | | | 276,0630 | 220,0002 | 94,0396 | 276,0636 | 220,0009 | 94,0414 |
| Paraoxon methyl | 2,6 | 248,0319 | 202,0388 | 90,0464 | | | | 248,0317 | 202,0379 | 90,0473 | 248,0322 | 202,0398 | 90,0479 |
| Penconazole | 3,7 | 284,0716 | 70,0399 | 158,9760 | 284,0725 | 70,0405 | | 284,0708 | 70,0401 | 158,9760 | 284,0721 | 70,0403 | 158,9765 |
| Pencycuron | 4,3 | 329,1415 | 125,0151 | 89,0591 | | | | | | | | | |
| Phosphamidon | 2,5 | 300,0762 | | | 300,0774 | | | 300,0754 | | | 300,0770 | | |
| Pirimicarb | 1,8 | 239,1503 | 72,0452 | 182,1291 | 239,1503 | 72,0450 | 182,1289 | 239,1502 | 72,0446 | 182,1287 | 239,1507 | 72,0447 | 182,1291 |
| Pirimiphos ethyl | 4,2 | 334,1349 | 198,1079 | 182,1292 | | | | | | | 334,1351 | 198,1057 | 182,1290 |
| Pirimiphos methyl | 3,8 | 306,1036 | 164,1197 | 278,0743 | 306,1040 | 164,1199 | | 306,1026 | 164,1189 | 278,0745 | 306,1042 | 164,1186 | 278,0749 |
| Prochloraz | 3,4 | 376,0381 | 265,9540 | 308,0016 | | | | 376,0386 | | | 376,0388 | 265,9553 | 308,0000 |
| Procymidone NH4 | 2,8 | 301,0511 | | | | | | 301,0496 | | | 301,0507 | | |
| Promecarb | 3,4 | 208,1332 | 109,0653 | 151,1123 | | | | | | | 208,1335 | 109,0653 | 151,1121 |
| Prometryn | 2,7 | 242,1434 | 186,0799 | 200,0973 | 242,1439 | | | 242,1434 | | 200,0966 | 242,1437 | | 200,0967 |
| Propamocarb | 1,1 | 189,1604 | 102,0555 | 144,1025 | 189,1601 | 102,0552 | 144,1019 | 189,1599 | 102,0549 | 144,1027 | 189,1598 | 102,0550 | 144,1023 |
| Propanil | 3,2 | 218,0134 | 127,0189 | 161,9877 | | | | 218,0128 | 127,0199 | 161,9873 | 218,0138 | 127,0182 | 161,9874 |
| Propiconazole | 3,9 | 342,0771 | 158,9762 | 69,0699 | 342,0780 | | | 342,0763 | 158,9768 | 69,0702 | 342,0781 | 158,9764 | 69,0702 |
| Propoxur | 2,7 | 210,1125 | 111,0446 | 93,0340 | | | | | | | 210,1127 | 111,0443 | 93,0339 |
| Prosulfuron | 3,6 | 420,0948 | | | | | | 420,0939 | | | 420,0953 | | |
| Pyrazophos | 4,2 | 374,0934 | 222,0872 | 194,0559 | | | | | | | | | |
| Simazine | 2,4 | 202,0852 | 104,0015 | 132,0328 | 202,0867 | | 132,0326 | 202,0852 | 104,0010 | 132,0327 | 202,0854 | 104,0012 | 132,0325 |
| Tebuconazole | 3,6 | 308,1524 | 125,0158 | 151,0315 | 308,1527 | | | 308,1516 | 125,0150 | | 308,1531 | 125,0158 | 151,0328 |
| Thiabendazole | 1,4 | 202,0433 | 175,0330 | 131,0606 | 202,0440 | | 131,0613 | 202,0435 | 175,0329 | | 202,0434 | 175,0324 | |
| Thiacloprid | 2,5 | 253,0309 | 126,0112 | 186,0151 | | | | 253,0312 | 126,0105 | | 253,0315 | 126,0108 | 186,0157 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Thiamethoxam | 1,8 | 292,0266 | 211,0654 | 152,0282 | | | | 292,0279 | 211,0650 | | 292,0273 | 211,0653 | |
| Thifensulfuron methyl | 2,8 | 388,0383 | 269,9493 | 167,0563 | 388,0374 | | | 388,0374 | | 167,0566 | 388,0380 | | 167,0565 |
| Thiodicarb | 2,9 | 355,0563 | 88,0221 | 107,9936 | | | | 355,0578 | 88,0225 | 107,9946 | 355,0575 | 88,0226 | 107,9936 |
| Thiophanate methyl | 2,8 | 343,0529 | 151,0324 | 192,0759 | | | | | | | 343,0533 | 151,0337 | |
| Triadimefon | 3,6 | 294,1004 | 197,0742 | 69,0708 | 294,1001 | 197,0752 | 69,0702 | 294,0997 | 197,0728 | 69,0701 | 294,1009 | 197,0731 | 69,0702 |
| Triadimenol | 3,4 | 296,1160 | 70,0399 | 99,0804 | | | | 296,1159 | 70,0402 | 99,0804 | 296,1165 | 70,0404 | 99,0810 |
| Triasulfuron | 3,0 | 402,0635 | 141,0776 | 167,0569 | | | | 402,0629 | 141,0770 | 167,0568 | 402,0638 | 141,0773 | 167,0566 |
| Triazophos | 3,8 | 314,0723 | 162,0661 | 114,9622 | 314,0724 | 162,0670 | | 314,0715 | 162,0664 | | 314,0731 | 162,0664 | 114,9616 |
| Trichlorfon | 1,8 | 256,9299 | 109,0047 | 220,9532 | | | | 256,9294 | 109,0051 | 220,9539 | 256,9305 | 109,0052 | 220,9537 |
| Tricyclazole | 2,2 | 190,0438 | 136,0221 | 163,0330 | 190,0436 | | 163,0347 | 190,0431 | 136,0216 | 163,0328 | 190,0436 | 136,0219 | 163,0327 |
| Trifloxysulfuron | 3,1 | 438,0690 | | | 438,0696 | | | 438,0691 | | | 438,0697 | | |
| Trinexapac ethyl | 3,2 | 253,1071 | 207,0657 | 165,0188 | | | | 253,1062 | 207,0647 | 165,0186 | 253,1074 | 207,0657 | 165,0192 |

Fonte: a autora.

Tabela IV. Dados de áreas dos compostos detectados no monitoramento ambiental do Arroio Dilúvio.

| classe | composto | SETEMBRO 2016 | | | | | | DEZEMBRO 2016 | | | | | | MARÇO 2107 | | | | | |
|--------|-------------------|---------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| 1 | ác. mefenâmico | 2046 | 4021 | 7243 | 5032 | 11385 | 8126 | 112 | | 1035 | 2807 | 3132 | 2628 | | | 649 | | 841 | 1974 |
| 3 | ampicilina | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | atenolol | 88968 | 188888 | 270257 | 326158 | 330986 | 310697 | 35456 | 41671 | 77263 | 140648 | 154837 | 174851 | 18227 | 42253 | 165114 | 126258 | 167366 | 168332 |
| 5 | cafeína | 192102 | 582072 | 1115074 | 1282671 | 1275350 | 1301991 | 63735 | 130373 | 230958 | 379698 | 440251 | 526749 | 174030 | 355841 | 673036 | 537393 | 624998 | 650040 |
| 3 | cefalexina | | | | 1967 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | ciprofloxacino | 1773 | | 3063 | 2676 | | | | | | | | | 3651 | | 2165 | 7754 | | |
| 3 | clindamicina | | | | | 2915 | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | diclofenaco | 565 | 1904 | 2755 | 3456 | 3558 | 4808 | 405 | 195 | 894 | 4430 | 2964 | 3270 | | 377 | 850 | 703 | 795 | 2955 |
| 4 | lidocaína | 9948 | 12491 | 30765 | 13576 | 45055 | 14015 | 7859 | 13976 | 24143 | 22492 | 33662 | 16756 | 4263 | 8415 | 21679 | 23575 | 24947 | 31869 |
| 2 | metoprolol | 8894 | 30631 | 35315 | 33311 | 45875 | 34153 | 7766 | 9851 | 13062 | 18222 | 96049 | 27370 | 4798 | 10414 | 25939 | 22914 | 34474 | 34446 |
| 1 | naproxeno | | | 1772 | 1947 | 2379 | 1767 | | | | 1469 | 1053 | 849 | | | | | | 1130 |
| 3 | norfloxacino | 792 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | paracetamol | 20025 | 52636 | 114751 | 101411 | 125241 | 46096 | 7995 | 9166 | 4944 | | | | 12494 | 13547 | 93229 | 38700 | 35942 | 1453 |
| 2 | propranolol | 3237 | 6803 | 11407 | 8725 | 9171 | 7150 | | | | | 1626 | 3580 | | | 1271 | 1033 | 1384 | 1233 |
| 6 | prednisolona | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | prednisona | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | sotalol | | | 3364 | 3211 | 5745 | 4517 | | | 958 | 1952 | 4021 | 3273 | | | 2285 | 1687 | 5378 | 3481 |
| 3 | sulfadiazina | | | | 631 | | | 623 | 880 | 559 | 750 | 659 | 495 | | | 605 | 302 | | 698 |
| 3 | sulfametoxazol | 4445 | 9101 | 10222 | 6900 | 7823 | 7994 | 694 | 1786 | 2435 | 4384 | 7517 | 5799 | 1118 | 2105 | 12720 | 4361 | 6194 | 11339 |
| 3 | trimetoprim | 2333 | 5700 | 17021 | 5079 | 8854 | 4684 | 1010 | 3186 | 4156 | 4998 | 9326 | 7069 | | 2520 | 14918 | 11566 | 15124 | 14352 |
| 7 | azoxitrombina | | | | | | | | | | | | | 570 | 581 | 1100 | 1064 | 1484 | 1162 |
| 7 | benomil | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | carbendazim | 8771 | 9802 | 15277 | 12994 | 15076 | 17411 | 9092 | 9619 | 14849 | 27613 | 24770 | 23332 | 5088 | 6431 | 14673 | 10456 | 13998 | 15551 |
| 7 | ciproconazol | | | | | | | | | | | | | | | 973 | 356 | | |
| 7 | DEET | 43004 | 66480 | 58406 | 109143 | 100937 | 114085 | 109726 | 113105 | 116840 | 157539 | 165182 | 198456 | 139520 | 149464 | 179303 | 230195 | 288767 | 283770 |
| 7 | diazinon | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | diuron | 1218 | 1561 | 4666 | 2269 | 3065 | 3487 | 827 | 822 | 1587 | 2702 | 2948 | 4103 | 628 | 760 | 1497 | 2008 | 3299 | 1823 |
| 7 | esfenvalerato | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | imazapir | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | imidacloprido | | | | | | | | | | | | | | | | 1094 | 919 | 1174 |
| 7 | propiconazol | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | tebuconazol | | | | | | | | | | | | | 1031 | 909 | 1276 | 1407 | 1844 | 2540 |
| 7 | triciclazole | 655 | 641 | 665 | 581 | 351 | 462 | 547 | 250 | 299 | 361 | 336 | 366 | 2625 | 3203 | 3287 | 4117 | 4626 | 5483 |

| classe | composto | JUNHO 2107 | | | | | | SETEMBRO 2017 | | | | | | DEZEMBRO 2017 | | | | | | |
|--------|----------------|------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------------|--------|---------|---------|--------|---------|------|
| | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | |
| 1 | ác. mefenâmico | 1252 | 482 | 2891 | 1487 | 1432 | 2035 | | | | | | 481 | 360 | | 768 | 860 | 215 | | |
| 3 | ampicilina | | | | | | | | | | | | | | | | 2700 | 2182 | 1741 | 2124 |
| 2 | atenolol | 115194 | 102511 | 187803 | 247208 | 289996 | 251222 | 56738 | 107321 | 234375 | 298799 | 399061 | 289927 | 36647 | 78208 | 155739 | 223581 | 204051 | 198086 | |
| 5 | cafeína | 501546 | 945834 | 954398 | 840663 | 1059525 | 1130071 | 367151 | 456374 | 1236523 | 1018114 | 1371935 | 1161316 | 390038 | 436319 | 1042672 | 1056726 | 999611 | 1042242 | |
| 3 | cefalexina | | | | | | | | | | | | | | | 1397 | 644 | 455 | 882 | |
| 3 | ciprofloxacino | | | | 1057 | | | | | | | | | | | | 457 | 3504 | | |
| 3 | clindamicina | | | | | | | | | | | | | | | | 2217 | | 357 | |
| 1 | diclofenaco | 524 | 749 | 1050 | 1261 | 1734 | 2072 | | | | | | | 10049 | 936 | 142 | 500 | | | |
| 4 | lidocaína | 3671 | 4670 | 13959 | 6708 | 15405 | 5276 | 1817 | 4460 | 20518 | 11172 | 13655 | 25547 | 9638 | 12510 | 46393 | 29000 | 44700 | 37528 | |
| 2 | metoprolol | 9708 | 15984 | 20551 | 22008 | 38260 | 23854 | 3728 | 7508 | 21284 | 23734 | 36042 | 21522 | 4933 | 12604 | 20569 | 28189 | 39978 | 38640 | |
| 1 | naproxeno | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | norfloxacino | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | paracetamol | 45054 | 27593 | 76063 | 76311 | 105728 | 62133 | 19245 | 12861 | 37049 | 31435 | 26832 | | 34038 | 39405 | 79945 | 76082 | 34931 | 31058 | |
| 2 | propranolol | | 1130 | 1597 | 1387 | 5294 | 1791 | | | | | | 3952 | 1902 | | 2104 | 323 | 407 | 1201 | |
| 6 | prednisolona | | | | | | | | | 1217 | 1542 | 1595 | | | | 11727 | | | 4333 | 614 |
| 6 | prednisona | | | | | | | | | | | | | | | 31198 | | | | |
| 2 | sotalol | | | | | 3279 | 1730 | | | | | | 2695 | | | | | 1866 | 2805 | 2789 |
| 3 | sulfadiazina | | | | | | | | | | | | | | | 1025 | | 402 | 237 | 93 |
| 3 | sulfametoxazol | 1600 | 1291 | 3951 | 1722 | 2751 | 2108 | | 420 | 746 | 924 | 1082 | 1182 | 1684 | 3836 | 2126 | 5024 | 2254 | 3212 | |
| 3 | trimetoprim | 1687 | 1706 | 8647 | 3887 | 5831 | 4341 | 795 | 1349 | 3946 | 3924 | 1595 | 4678 | | 2104 | 4298 | 12857 | 7565 | 5701 | |
| 7 | azoxitrombina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | benomil | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | carbendazim | 5733 | 6871 | 7870 | 11255 | 12112 | 14542 | 1697 | 2659 | 8216 | 8056 | 1082 | 12055 | 6194 | 8116 | 11309 | 25897 | 18309 | 28533 | |
| 7 | ciproconazol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | DEET | 66944 | 75183 | 65076 | 110816 | 130839 | 134110 | 25078 | 70547 | 171283 | 234498 | 2695 | 170167 | 76953 | 77563 | 110919 | 164106 | 130526 | 178583 | |
| 7 | diazinon | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | diuron | | 309 | 471 | 479 | 803 | 866 | | | 611 | 646 | 9395 | 1837 | 602 | 744 | 1607 | 3302 | 4898 | 4862 | |
| 7 | esfenvalerato | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | imazapir | | | 5343 | 5534 | 18889 | 16718 | 2344 | 4580 | 12241 | 8568 | 171517 | 8164 | | | | | | | |
| 7 | imidacloprido | | | | | | | | | | | | | | 619 | | 432 | 544 | 212 | |
| 7 | propiconazol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | tebuconazol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | triciclazole | | | | | | | | | | | | | | | | 243 | 319 | 109 | |

| classe | composto | MARÇO 2018 | | | | | | JUNHO 2018 | | | | | | SETEMBRO 2018 | | | | | | |
|--------|----------------|------------|--------|---------|--------|---------|--------|------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | |
| 1 | ác. mefenâmico | | | 4026 | | | 854 | 3326 | 1006 | | 1978 | 4347 | 2237 | 1396 | 1829 | 3264 | 3779 | 4647 | 3806 | |
| 3 | ampicilina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | atenolol | 74551 | 81653 | 155592 | 188810 | 247866 | 185532 | 162981 | 120522 | 189591 | 202797 | 207578 | 197795 | 76764 | 104925 | 180866 | 207107 | 239974 | 243977 | |
| 5 | cafeína | 597517 | 471658 | 1088926 | 913569 | 1155816 | 970282 | 919460 | 731369 | 1300940 | 1245635 | 1272787 | 1372220 | 490609 | 500806 | 669225 | 661996 | 706431 | 820015 | |
| 3 | cefalexina | | 1492 | 4444 | 3696 | 3722 | 3129 | 2245 | 3264 | 6630 | 5088 | 6613 | 3981 | | | | | | | |
| 3 | ciprofloxacino | | | 5116 | 2408 | 6075 | 3065 | | | 3933 | | 6204 | | | | | | 3333 | | |
| 3 | clindamicina | | | 5828 | 2488 | | | | | 8548 | 3638 | 4410 | 4248 | | | | | | | |
| 1 | diclofenaco | 394 | 2815 | 1126 | 483 | 1599 | 622 | 33259 | 1836 | 480 | 1754 | 4305 | 1440 | 1608 | 1241 | 1488 | 1772 | 2301 | 2148 | |
| 4 | lidocaína | 13951 | 31196 | 73005 | 43407 | 68859 | 68208 | 11116 | 18135 | 30598 | 16322 | 41223 | 30494 | 9537 | 14846 | 26780 | 21918 | 97281 | 22705 | |
| 2 | metoprolol | 13032 | 21349 | 31952 | 34692 | 44845 | 38250 | 18847 | 24886 | 34802 | 36091 | 46646 | 40708 | 14963 | 27529 | 31256 | 27116 | 53879 | 42279 | |
| 1 | naproxeno | | | | | 2544 | | 2927 | 77289 | | | 1576 | | | | | | | | |
| 3 | norfloxacino | | | | | 17533 | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | paracetamol | 42093 | 35831 | 73531 | 82248 | 88159 | 11913 | 92549 | 3491 | 133852 | 130436 | 139171 | 111940 | 48730 | 48246 | 90144 | 118125 | 149696 | 43111 | |
| 2 | propranolol | | 4792 | 7641 | 3551 | 6557 | 4434 | 6025 | 890 | 6108 | 6979 | 12224 | 9072 | 5437 | 6731 | 8707 | 8501 | 12103 | 7578 | |
| 6 | prednisolona | | | | 2194 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | prednisona | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | sotalol | | | 3660 | 4395 | 8909 | 4778 | | | 2574 | 4140 | 5630 | 4506 | | | 3230 | 5743 | 6202 | 5865 | |
| 3 | sulfadiazina | 977 | 1248 | 1803 | 1161 | 1903 | 1510 | 1239 | 4753 | 872 | 1119 | 881 | 1173 | 3903 | 1803 | 2973 | | 1790 | 2305 | |
| 3 | sulfametoxazol | 2195 | 6980 | 11251 | 8879 | 14947 | 6921 | 5154 | 5207 | 6910 | 5250 | 5625 | 6581 | 1867 | 2258 | 6143 | 5199 | 12727 | 9073 | |
| 3 | trimetoprim | | | | | | | | | 19436 | 5508 | 10662 | 8487 | | 3880 | 17334 | 10875 | 31713 | 17380 | |
| 7 | azoxitrombina | 1566 | 1773 | 3740 | 3566 | 3693 | 3101 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | benomil | | | | | | | | | | | | | | | | 17761 | 10933 | 33255 | 7374 |
| 7 | carbendazim | 11336 | 10608 | 13222 | 18025 | 24837 | 22752 | 9753 | 8231 | 11284 | 14694 | 17415 | 19788 | 8429 | 10202 | 16115 | 14579 | 26310 | 32229 | |
| 7 | ciproconazol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | DEET | 254289 | 281736 | 295055 | 368008 | 387373 | 445831 | 71232 | 68742 | 76362 | 71139 | 96297 | 92219 | 27719 | 29580 | 37770 | 43919 | 45885 | 65895 | |
| 7 | diazinon | | 650 | 967 | | 467 | 415 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | diuron | 2158 | 1943 | 3157 | 4183 | 6054 | 6521 | 1588 | 1823 | 2445 | 3487 | 4766 | 6412 | 921 | 1030 | 1665 | 2288 | 4200 | 5583 | |
| 7 | esfenvalerato | 607 | 495 | 944 | 647 | 812 | 551 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | imazapir | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | imidacloprido | | | | | | 1339 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | propiconazol | | | 669 | 420 | 568 | 494 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | tebuconazol | 4487 | 5543 | 11054 | 5726 | 9614 | 6200 | 1496 | 2022 | | 1438 | 1192 | | 966 | 832 | 705 | 841 | 843 | 530 | |
| 7 | triciclazole | 5623 | 6638 | 9964 | 10402 | 9037 | 9802 | 1787 | 1425 | 1090 | 884 | 836 | 926 | 581 | 572 | 486 | 498 | 465 | 536 | |

1: AINEs e analgésicos; 2: β -bloqueadores; 3: ATBs; 4: anestésicos; 5: cafeína; 6: corticoides; 7: pesticidas.

Fonte: a autora.

Tabela V. Análises físico-químicas complementares das amostras analisadas.

| Amostra | | pH | Condutividade ($\mu\text{S/cm}$) | Alcalinidade (mg L^{-1}) | Turbidez (NTU) |
|---------|----|------|---------------------------------------|--|-------------------|
| set/16 | P1 | 7,95 | 210 | 6,8 | 8,68 |
| | P2 | 8,16 | 281 | 7,7 | 5,76 |
| | P3 | 9,05 | 345 | 9,3 | 6 |
| | P4 | 9,03 | 364 | 10,4 | 6,08 |
| | P5 | 8,85 | 389 | 10,2 | 7,45 |
| | P6 | 8,6 | 378 | 11,0 | 6,8 |
| dez/16 | P1 | 6,42 | 376 | 11,7 | 8,42 |
| | P2 | 6,62 | 362 | 9,9 | 8,21 |
| | P3 | 6,63 | 380 | 11,2 | 7,02 |
| | P4 | 6,56 | 406 | 10,9 | 6,25 |
| | P5 | 6,45 | 417 | 11,1 | 7,75 |
| | P6 | 6,55 | 415 | 10,9 | 6,02 |
| | SI | 5,83 | 94,6 | 3,1 | 10,72 |
| | GR | 6,24 | 144,9 | 3,8 | 14,82 |
| mar/17 | P1 | 7,54 | 209 | 5,9 | 15,48 |
| | P2 | 7,72 | 234 | 6,0 | 6,48 |
| | P3 | 7,82 | 307 | 7,4 | 10,8 |
| | P4 | 7,82 | 294 | 7,3 | 7,92 |
| | P5 | 7,51 | 319 | 7,8 | 7,44 |
| | P6 | 7,21 | 343 | 8,8 | 4,20 |
| | SI | 6,95 | 71 | 2,8 | 10,72 |
| | GR | 6,55 | 72,5 | 1,9 | 16,32 |
| jun/17 | P1 | 6,96 | 232 | 8,8 | 8,52 |
| | P2 | 7,08 | 234 | 6,1 | 7,20 |
| | P3 | 7,29 | 291 | 8,8 | 6,96 |
| | P4 | 7,28 | 308 | 8,5 | 9,36 |
| | P5 | 7,19 | 342 | 9,8 | 10,20 |
| | P6 | 7,09 | 328 | 7,6 | 9,00 |
| | SI | 7,2 | 90,9 | 3,1 | 10,20 |
| | GR | 6,72 | 82,9 | 2,7 | 13,32 |
| set/17 | P1 | 7,42 | 256 | 7,0 | 10,08 |
| | P2 | 7,74 | 269 | 6,0 | 8,52 |
| | P3 | 7,72 | 335 | 3,3 | 9,24 |
| | P4 | 7,54 | 350 | 6,3 | 6,24 |
| | P5 | 7,35 | 388 | 10,0 | 7,68 |
| | P6 | 7,16 | 397 | 8,3 | 5,52 |
| | SI | 6,74 | 85,3 | 2,8 | 12,36 |
| | GR | 6,38 | 72,6 | 2,3 | 16,44 |
| dez/17 | P1 | 7,66 | 177,7 | 4,3 | 8,21 |
| | P2 | 7,41 | 211 | 4,6 | 7,55 |
| | P3 | 7,76 | 247 | 6,6 | 6,99 |
| | P4 | 7,68 | 266 | 7,4 | 6,25 |
| | P5 | 7,23 | 295 | 8,2 | 7,68 |
| | P6 | 7,26 | 292 | 9,0 | 5,24 |
| | SI | 7,52 | 75,6 | 2,2 | 10,12 |
| | GR | 7,15 | 65,1 | 2,0 | 15,71 |
| mar/18 | P1 | 7,09 | 213 | 4,4 | 14,88 |
| | P2 | 7,45 | 232 | 7,9 | 7,92 |
| | P3 | 7,93 | 268 | 7,6 | 7,8 |
| | P4 | 7,59 | 282 | 8,7 | 10,32 |
| | P5 | 7,47 | 302 | 10,1 | 9,48 |
| | P6 | 7,24 | 300 | 10,4 | 6,48 |
| | SI | 6,99 | 94,4 | 3,7 | 8,88 |
| | GR | 6,78 | 141 | 5,7 | 17,88 |

| | | | | | |
|--------|----|------|-------|-----|-------|
| jun/18 | P1 | 6,9 | 284 | 6,3 | 6,24 |
| | P2 | 6,85 | 283 | 6,4 | 4,8 |
| | P3 | 6,84 | 343 | 6,5 | 6 |
| | P4 | 6,89 | 339 | 7,2 | 7,44 |
| | P5 | 6,85 | 356 | 7,5 | 13,68 |
| | P6 | 6,68 | 360 | 7,0 | 5,76 |
| | SI | 6,77 | 106 | 2,0 | 15 |
| | GR | 6,45 | 117,5 | 1,5 | 15,24 |
| set/18 | P1 | 6,88 | 191 | 5,4 | 6,96 |
| | P2 | 7,04 | 211 | 5,7 | 7,2 |
| | P3 | 7,36 | 254 | 7,5 | 5,76 |
| | P4 | 7,41 | 255 | 8,2 | 7,44 |
| | P5 | 7,3 | 283 | 7,6 | 7,8 |
| | P6 | 7,28 | 305 | 8,0 | 4,68 |
| | SI | 7,3 | 58,6 | 2,8 | 17,16 |
| | GR | 6,85 | 56 | 1,9 | 17,4 |

P1 a P6: pontos de amostragem no Arroio Dilúvio; SI: rio do Sinos; GR: rio Gravataí.

Fonte: a autora

Tabela VI. Nível de antimicrobianos detectados em cada ponto de amostragem e campanha.

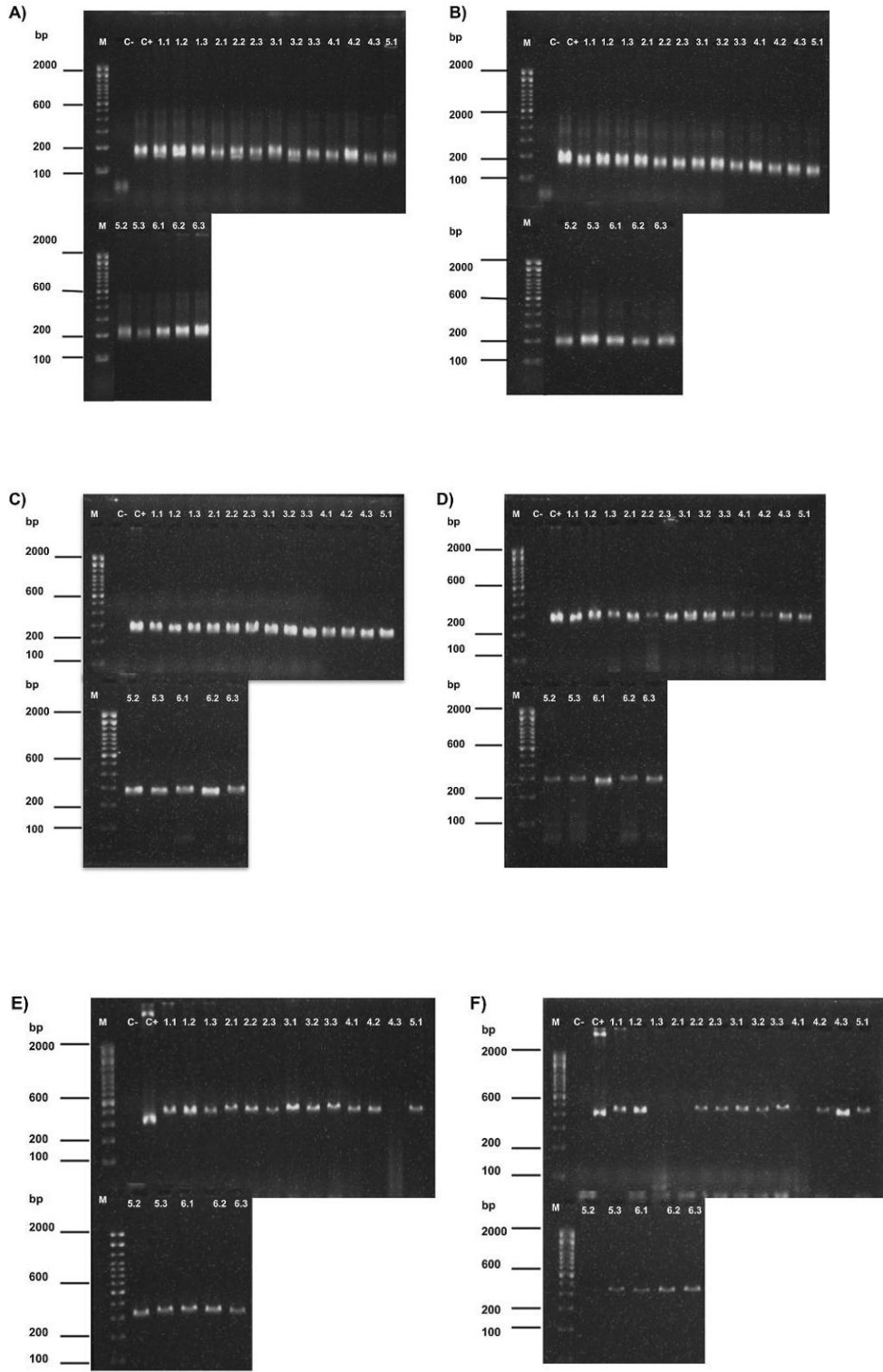
| Mês/ano | Amostra\ATB | Concentração (ng L ⁻¹) | | | | | | | |
|---------|-------------|------------------------------------|-----|-------|-----|-----|------|------|------|
| | | SMA | SDZ | CIPRO | NOR | TMP | CFX | AZT | CLN |
| Dez/16 | Ponto 1 | 45 | 110 | 78 | 87 | 27 | 61 | 68 | 55 |
| | Ponto 2 | 66 | 119 | 100 | 41 | 42 | 46 | 62 | 60 |
| | Ponto 3 | 84 | 83 | 102 | 81 | 42 | 69 | 63 | 63 |
| | Ponto 4 | 98 | 100 | 75 | 61 | 38 | 90 | 64 | 58 |
| | Ponto 5 | 115 | 70 | 111 | 65 | 49 | 51 | 71 | 71 |
| | Ponto 6 | 65 | 52 | 89 | 37 | 39 | 47 | 66 | 60 |
| Mar/17 | Ponto 1 | 34 | 42 | 59 | 41 | 24 | <LOQ | 61 | 53 |
| | Ponto 2 | 38 | 35 | 48 | 41 | 27 | <LOQ | 62 | 53 |
| | Ponto 3 | 79 | 52 | 62 | 73 | 48 | 53 | 73 | 78 |
| | Ponto 4 | 57 | 54 | 113 | 101 | 50 | 83 | 67 | 68 |
| | Ponto 5 | 64 | 46 | 127 | 66 | 56 | 107 | 72 | 74 |
| | Ponto 6 | 67 | 44 | 72 | 65 | 43 | 45 | 67 | 92 |
| Jun/17 | Ponto 1 | 37 | 32 | 60 | 44 | 20 | 16 | <LOQ | 59 |
| | Ponto 2 | 41 | 33 | 258 | 56 | 24 | 36 | <LOQ | 67 |
| | Ponto 3 | 40 | 37 | 230 | 95 | 25 | 71 | 48 | 75 |
| | Ponto 4 | 41 | 33 | 227 | 73 | 26 | 68 | 54 | 70 |
| | Ponto 5 | 41 | 35 | 297 | 115 | 26 | 70 | 64 | 82 |
| | Ponto 6 | 42 | 41 | 202 | 94 | 26 | 65 | 51 | 75 |
| Set/17 | Ponto 1 | 47 | 39 | 163 | 96 | 25 | 45 | 48 | 66 |
| | Ponto 2 | 45 | 38 | 253 | 60 | 25 | 58 | 50 | 68 |
| | Ponto 3 | 60 | 59 | 314 | 157 | 31 | 67 | 59 | 85 |
| | Ponto 4 | 47 | 47 | 293 | 91 | 27 | 70 | 55 | 69 |
| | Ponto 5 | 50 | 47 | 301 | 120 | 31 | 86 | 73 | 78 |
| | Ponto 6 | 48 | 57 | 153 | 125 | 27 | 73 | <LOQ | 69 |
| Dez/17 | Ponto 1 | 43 | 35 | 211 | 46 | 24 | <LOQ | <LOQ | 70 |
| | Ponto 2 | 49 | 51 | 142 | 91 | 25 | <LOQ | <LOQ | 66 |
| | Ponto 3 | 42 | 40 | 155 | 93 | 25 | 81 | <LOQ | 88 |
| | Ponto 4 | 50 | 43 | 123 | 128 | 30 | 72 | <LOQ | 72 |
| | Ponto 5 | 43 | 37 | <LOQ | 135 | 26 | 50 | <LOQ | 79 |
| | Ponto 6 | 45 | 35 | <LOQ | 82 | 26 | 58 | <LOQ | 77 |
| Mar/18 | Ponto 1 | 43 | 47 | 163 | 121 | 26 | <LOQ | <LOQ | <LOQ |

| | | | | | | | | | |
|--------|---------|-----|------|------|-----|----|-----|------|------|
| | Ponto 2 | 53 | 48 | 200 | 99 | 28 | 59 | <LOQ | <LOQ |
| | Ponto 3 | 64 | 59 | 329 | 153 | 36 | 125 | 57 | 112 |
| | Ponto 4 | 56 | 44 | 318 | 171 | 33 | 111 | 49 | 79 |
| | Ponto 5 | 70 | 63 | 344 | 292 | 42 | 112 | 58 | 90 |
| | Ponto 6 | 55 | 54 | 159 | 75 | 35 | 87 | 49 | 88 |
| Jun/18 | Ponto 1 | 49 | <LOQ | <LOQ | 154 | 26 | 76 | 53 | 73 |
| | Ponto 2 | 48 | <LOQ | 217 | 166 | 28 | 87 | <LOQ | <LOQ |
| | Ponto 3 | 54 | <LOQ | 293 | 82 | 36 | 139 | 60 | 134 |
| | Ponto 4 | 50 | <LOQ | 279 | 88 | 30 | 136 | 60 | 86 |
| | Ponto 5 | 52 | <LOQ | 313 | 91 | 35 | 179 | 57 | 94 |
| | Ponto 6 | 53 | <LOQ | 226 | 86 | 33 | 117 | 60 | 95 |
| Set/18 | Ponto 1 | 46 | 120 | 65 | 29 | 20 | 34 | 64 | 52 |
| | Ponto 2 | 51 | 55 | 66 | 49 | 27 | 57 | 66 | 53 |
| | Ponto 3 | 97 | 113 | 57 | 38 | 40 | 54 | 75 | 62 |
| | Ponto 4 | 97 | 45 | 53 | 33 | 34 | 73 | 91 | 59 |
| | Ponto 5 | 184 | 86 | 118 | 49 | 84 | 95 | 158 | 91 |
| | Ponto 6 | 138 | 99 | 119 | 35 | 49 | 41 | 88 | 61 |

SMA = sulfametoxazol; SDZ = sulfadiazina; CIPRO = ciprofloxacino; NOR = norfloxacino; TMP = trimetoprim; CFX = cefalexina; AZT = azitromicina; CLN = clindamicina.

Fonte: a autora.

ANEXO II



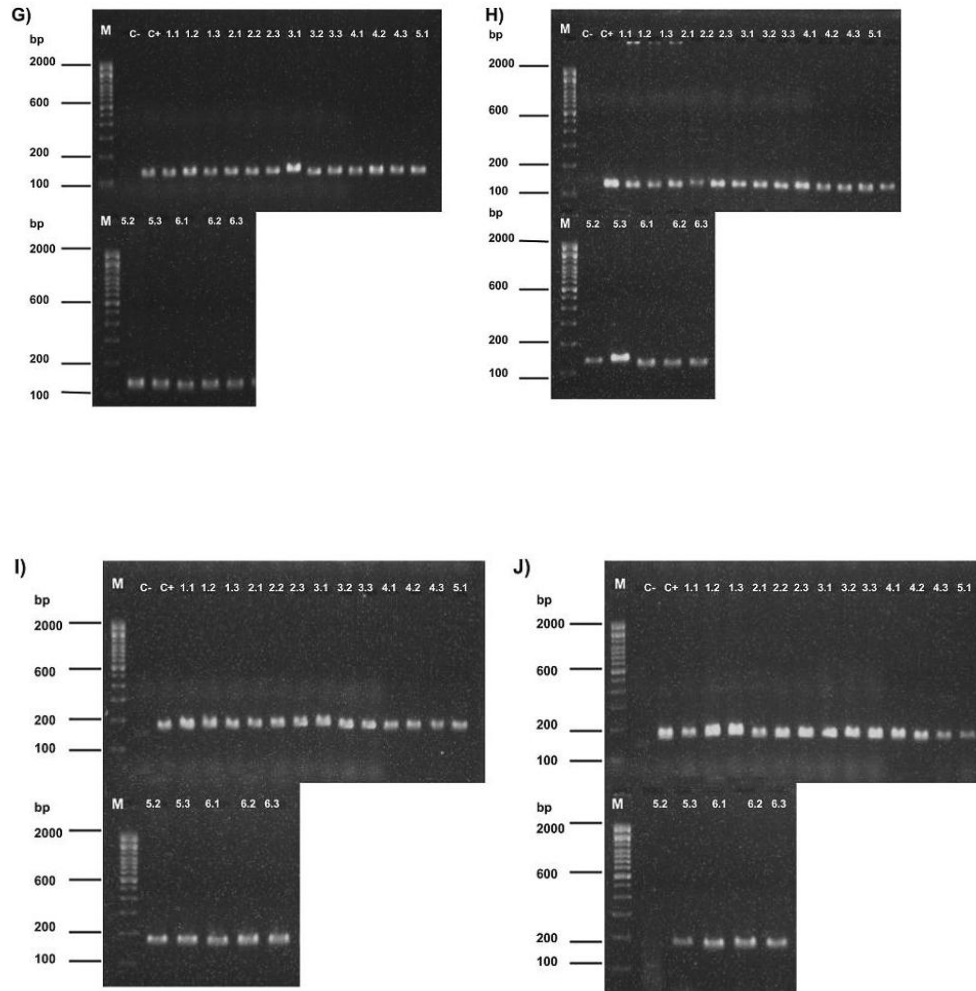


Figura I. Produtos de amplificação por PCR analisados por electroforese em gel de agarose a 2%. (A) de junho de 2018 e (B) de setembro de 2018 produtos de amplificação 16S rRNA (C) de junho de 2018 e (D) setembro de 2018 produtos de amplificação blaTEM. (E) junho de 2018 e (F) de setembro de 2018 produtos de amplificação ermB. (G) junho de 2018 e (H) setembro de 2018 produtos de amplificação qnrS. (I) Junho de 2018 e (J) Setembro de 2018 produtos de amplificação de sul1 M: 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), C⁺: plasmídeo pIDTSmart contendo fragmentos blaTEM, ermB, qnrS e sul1 e .1, .2, .3 representam as triplicatas dos pontos de amostragem de 1 a 6.

Fonte: a autora.