

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**Julia Magalhães Brum Campos**

**Detecção e quantificação de fármacos e  
disruptores endócrinos na urina humana durante  
o processo de estocagem com vistas ao uso  
agrícola**

VITÓRIA  
2011

**Julia Magalhães Brum Campos**

**Detecção e quantificação de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana durante o processo de estocagem com vistas ao uso agrícola**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Ricardo Franci Gonçalves.

**JULIA MAGALHÃES BRUM CAMPOS**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS E  
DISRUPTORES ENDÓCRINOS NA URINA HUMANA  
DURANTE O PROCESSO DE ESTOCAGEM COM VISTAS  
AO USO AGRÍCOLA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

---

**Prof.º. Dr.º. Ricardo Franci Gonçalves**  
**Orientador – UFES**

---

**Prof.º. Dr.º. Renato Ribeiro Siman**  
**Examinador Interno – UFES**

---

**Prof.º. Dr.º. André Bezerra dos Santos**  
**Examinador Externo – Universidade Federal do Ceará**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C198d Campos, Julia Magalhães Brum, 1983-  
Detecção e quantificação de fármacos e disruptores  
endócrinos na urina humana durante o processo de estocagem  
com vistas ao uso agrícola / Julia Magalhães Brum Campos. -  
2011.  
107f.:il.

Orientador: Ricardo Franci Gonçalves.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Urina. 2. Adubos e fertilizantes. 3. Cromatografia líquida  
de alta eficiência. I. Gonçalves, Ricardo Franci. II. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

---

Aos meus pais, Antônio e Gilzane,  
razões da minha existência.

A minha avó Vivi, pessoa mais  
iluminada que já conheci nessa vida.  
A ela toda minha dedicação e  
saudades eternas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me sustentar em todos os momentos, permitindo que eu saísse vitoriosa dessa batalha;

Aos meus pais Antônio e Gilzane, que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para minha formação e educação. Agradeço a eles pelo apoio, confiança, carinho e amor incondicional e, a minha irmã Lara, pelo carinho e apoio;

A minha querida avó, que com toda sua sabedoria e carinho, sempre me apoiou, aconselhou nos momentos de dúvida e acalentou meu coração nos momentos de angústia;

A minha irmã do coração Daniela, que sempre acreditou em mim, me ouviu, me aconselhou, e trouxe luz e alegria para minha vida;

Ao meu amigo Ramon, pela amizade, paciência, dedicação e ensinamentos.

Ao meu primo Edinho, pelo apoio, carinho e confiança;

Ao Paulo, pela paciência, pelos ensinamentos e por ter sido meu braço direito em vários momentos;

A minha amiga Karolyna, pela amizade e carinho, incentivo, ajuda, paciência e por me ensinar tantas coisas;

À Priscilla, pelo suporte e pela dedicação e cooperação à pesquisa;

À Cecília e à Georgete, pelas orientações e ajuda;

A todos os primos, tios, amigos e colegas, por colaborarem com a coleta do xixi. Sem vocês não seria possível a realização desta pesquisa;

Aos meus amigos da ETE e LABSAN, pela amizade e carinho;

Ao professor Ricardo Franci, pela oportunidade;

Ao professor Sérgio Túlio pela oportunidade e por ceder as instalações laboratoriais para a realização da pesquisa;

À Banca Examinadora: Professor André Bezerra e Professor Renato Siman, pela disponibilidade em me avaliar;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e financiamento da pesquisa.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas.”

Luis Fernando Veríssimo

## RESUMO

A urina humana contém a maior parte dos nutrientes essenciais à agricultura. Porém, a urina é, também, via de excreção de fármacos inalterados e seus metabólitos e disruptores endócrinos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil cromatográfico do diclofenaco de sódio, prednisolona, progesterona e sulfametoxazol na urina humana durante o processo de tratamento de estocagem da urina humana com e sem acidificação, avaliar a influência da temperatura e variação de pH durante o processo de tratamento, quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) os compostos estudados na urina humana acidificada durante processo tratamento de estocagem e determinar o método de detecção. O método foi aplicado para as amostras de urina humana acidificada e não acidificada submetidas ao processo de estocagem durante ciclos de 30 dias sob diferentes temperaturas. Foi observado que a variação de temperatura empregada não alterou o perfil cromatográfico das amostras analisadas. A urina que não foi submetida ao processo de acidificação demonstrou alteração no seu perfil cromatográfico, provavelmente devido ao processo de hidrólise da uréia, não sendo, portanto, possível a quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos na mesma. O método para CLAE em fase reversa desenvolvido nesse estudo é sensível, seletivo e reprodutível para determinação dos 4 fármacos presentes na urina humana durante o período de estocagem. A fase móvel mais adequada para a eluição dos fármacos e disruptores endócrinos estudados (SULFA, PRED, DICLO E PRO) na urina humana, com menor dispersão do analito, foi a fase móvel 4 (FM4). Nessa fase móvel a eluição foi realizada por gradiente, fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e concentração de acetonitrila (ACN) variando entre 10 e 15%, permitindo que essa fase móvel apresentasse a força cromatográfica e a seletividade adequada para a separação dos fármacos e disruptores estudados. O método CLAE-DAD utilizado apresentou satisfatória linearidade ( $r > 0,99$  para todos os compostos analisados) e precisão ( $\text{CV} < 5\%$  para todos os compostos). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) apresentaram valores menores que aqueles utilizados no processo de estocagem, portanto adequado para as análises realizadas. Desse modo a quantificação dos compostos estudados foi realizada apenas na urina humana acidificada. Conclui-se que as condições de tratamento utilizadas no presente trabalho, ou seja, acidificação da urina e temperatura de estocagem, não foram suficientes para reduzir a concentração dos compostos estudados. A concentração adicionada inicialmente manteve-se até o final do experimento, não havendo diminuição da mesma.

Palavras Chaves: urina humana; fertilizante agrícola; estocagem; CLAE; validação.



## ABSTRACT

Human urine contains most of the essential nutrients in agriculture. However, urine is also the route of excretion of unchanged pharmaceuticals and metabolites and endocrine disruptors. This study aimed to evaluate the chromatographic profile of sodium diclofenac, prednisolone, progesterone and sulfamethoxazole in human urine during the storage treatment process of human urine with and without acidification, assess the influence of temperature and pH variation during the process of treatment, quantify by HPLC-DAD the analyzed compounds in acidified human urine during the storage treatment process and determine the method of detection. The method was applied to acidified and non acidified human urine samples, submitted to the storage process for 30 days cycles under different temperatures. It was observed that the employed temperature variation did not alter the chromatographic profile of the analyzed samples. The urine that was not submitted to the acidification process showed changes in its chromatographic profile, probably due to the process of urea hydrolysis, and not being, therefore, possible to quantify pharmaceuticals and endocrine disruptors in it. The method for reversed-phase HPLC developed in this study is sensitive, selective and reproducible for the determination of the four pharmaceuticals used in human urine during the storage period. The most appropriate mobile phase for the elution of pharmaceuticals and endocrine disruptors studied (SULFA, PRED, DICLE and PRO) in human urine, with less dispersion of the analyte, was the mobile phase 4 (FM4). At this mobile phase the elution was performed by gradient, 1.0 mL min<sup>-1</sup> flow and concentration of acetonitrile (ACN) ranging between 10 and 15%, allowing the mobile phase to produce adequate chromatographic strength and selectivity for the separation of the pharmaceuticals and disruptors studied. The HPLC-DAD method used showed satisfactory linearity ( $r > 0.99$  for all analyzed compounds) and precision (CV < 5% for all compounds). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) values were lower than those used in the process of storage, therefore suitable for the performed analysis. Thus, the quantification of these studied compounds was performed only in acidified human urine. We conclude that the treatment conditions used in this work, that is, urine acidification and storage temperature, were not sufficient to reduce the concentration of the studied compounds. The initially added concentration was maintained until the end of the experiment, with no decreases.

Keywords: human urine; agricultural fertilizer; storage; HPLC; validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos disruptores endócrinos. (a) Resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista.....	28
Figura 2: Esquema de um típico cromatógrafo líquido de alta eficiência .....	32
Figura 3: Cromatógrafo LABCROM-UFES.....	33
Figura 4: Esquema de uma típica válvula de injeção usado em CLAE: (a) Posição de carga; (b) Posição de injeção .....	33
Figura 5: Fluxograma das etapas do trabalho .....	45
Figura 6: Esquema dos reservatórios nos ensaios.....	46
Figura 7: Disposição dos reservatórios nos ensaios .....	49
Figura 8: Fluxograma de preparação das amostras.....	50
Figura 9: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 1 (FM1) .....	55
Figura 10: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 2 (FM2) .....	55
Figura 11: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 3 (FM3) .....	56
Figura 12: Estrutura da prednisolona .....	56
Figura 13: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 4 (FM4).....	57
Figura 14: Curva resposta relacionando a área do pico de Sulfametoxazol (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).....	58
Figura 15: Curva resposta relacionando a área do pico de Prednisolona (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).....	59
Figura 16: Curva resposta relacionando a área do pico de Diclofenaco de Sódio (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).....	60
Figura 17: Curva resposta relacionando a área do pico de Progesterona (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).....	61
Figura 18: Fluxograma simplificado da metodologia utilizada .....	68
Figura 19: Esquema dos reservatórios nos ensaios.....	69
Figura 20: Características da temperatura de alocação dos recipientes de estocagem .....	69
Figura 21: Variação de pH na urina humana e urina humana com disruptores endócrinos no 1º ciclo .....	70
Figura 22: Variação de pH na urina humana acidificada e urina humana acidificada e com disruptores endócrinos no 1º ciclo .....	71
Figura 23: Variação de pH na urina humana e urina humana com disruptores endócrinos no 2º ciclo .....	72
Figura 24: Variação de pH na urina humana acidificada e urina humana acidificada e com disruptores endócrinos no 2º ciclo .....	72
Figura 25: Perfil cromatográfico da urina humana acidificada no 1º e 2º ciclos de estocagem, sob diferentes temperaturas.....	73
Figura 26: Cromatogramas das amostras de urina humana do 1º ciclo.....	74
Figura 27: Cromatogramas das amostras de urina humana com fármacos e disruptores do 1º ciclo .....	75
Figura 28: Cromatogramas das amostras de urina humana do 2º ciclo.....	76
Figura 29: Cromatogramas das amostras de urina humana com fármacos e disruptores do 2º ciclo .....	77
Figura 30: Compostos quantificados nas amostras de urina acidificada.....	78
Figura 31: Cromatograma da urina humana acidificada com fármacos e disruptores do 1º ciclo.....	79
Figura 32: Cromatogramas da urina humana acidificada com fármacos e disruptores do 2º ciclo .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nutrientes na urina humana e a quantidade de fertilizante necessária para produzir 250Kg de grãos/ano. ....	23
Tabela 2: Propriedades das fases móveis mais comuns.....	39
Tabela 3: Padrões Cromatográficos, estruturas e nome IUPAC dos compostos analisados .....	47
Tabela 4: Dados farmacocinéticos e reações adversas .....	48
Tabela 5: Fase móvel 1 (FM1).....	52
Tabela 6: Fase móvel 2 (FM2).....	52
Tabela 7: Fase móvel 3 (FM3).....	52
Tabela 8: Fase móvel 4 (FM4).....	53
Tabela 9: Pontos da curva de calibração .....	53
Tabela 10: Concentrações de Sulfametoxazol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	58
Tabela 11: Concentrações de Prednisolona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	59
Tabela 12: Concentrações de Diclofenaco de Sódio ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	60
Tabela 13: Concentrações de Progesterona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	61
<b>Tabela 14:</b> Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ).....	62
Tabela 15: Precisão e recuperação da curva padrão de 4 drogas em amostras de urina humana .....	63
Tabela 16: Tempo médio de retenção dos compostos detectados na urina humana acidificada .....	78
Tabela 17: Quantificação sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona no 1º ciclo de estocagem .....	80
Tabela 18: Quantificação sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona no 2º ciclo de estocagem .....	82
Tabela 19: Fase móvel 1 (FM1).....	102
Tabela 20: Fase móvel 2 (FM2).....	102
Tabela 21: Fase móvel 3 (FM3).....	102
Tabela 22: Fase móvel 4 (FM4).....	102
Tabela 23: Pontos da curva de calibração .....	103
Tabela 24: Concentrações de Sulfametoxazol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	103
Tabela 25: Concentrações de Prednisolona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficientes de correlação ( $r$ ).....	103
Tabela 26: Concentrações de Diclofenaco de Sódio ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	104
Tabela 27: Concentrações de Progesterona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).....	104
Tabela 28: Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ).....	104
Tabela 29: Precisão e recuperação da curva padrão de 4 drogas em amostras de urina humana .....	105
Tabela 30: Tempo médio de retenção dos compostos detectados na urina humana acidificada .....	105
Tabela 31: Quantificação do sulfametoxazol, da prednisolona, do diclofenaco de sódio e da progesterona no 1º ciclo de estocagem .....	106
Tabela 32: Quantificação do sulfametoxazol, da prednisolona, do diclofenaco de sódio e da progesterona no 2º ciclo de estocagem .....	107

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
$\alpha$	alpha
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
ACN	Acetonitrila
Ca	Cálcio
$[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$	Uréia
DE	Disruptores endócrinos
DICLO	Diclofenaco de Sódio
FM	Fase móvel
h	Hora
$\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$ ou $\text{HPO}_4^{2-}$	Superfosfatos
K	Potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
max	Máximo
m	Metro
MetOH	Metanol
min	Mínimo
min	Minuto
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mL	Mililitro
n	Número de amostras
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
$\text{NH}_4^+$	Íon amônio
nm	Nanômetro
P	Fósforo
PRE	Prednisolona
PRO	Progesterona
rpm	Rotações por minuto
SULFA	Sulfametoxazol
TFA	Ácido trifluoroacético

## LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABIFARMA	Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRIC	Brasil, Rússia, Índia e China
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCTEA	Comitê Científico de Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente
CV	Desvio Padrão Relativo
DAD	Diode array detection
DP	Desvio Padrão
ECOSAN	Saneamento ecológico
ES	Espírito Santo
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
FENAFAR	Federação Nacional dos Farmacêuticos
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IMS	Intercontinental Marketing Services
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LABSAN	Laboratório de Saneamento da UFES
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NBR	Norma Brasileira
ONU	Organização das Nações Unidas
PDA	Photo Diode Array
pH	Potencial Hidrogeniônico
$r$	Coefficiente de Correlação
$r^2$	Coefficiente de Determinação
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1 SANEAMENTO ECOLÓGICO (ECOSAN) .....	22
3.2 CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DA URINA .....	22
3.3 FÁRMACOS.....	24
3.4 DISRUPTORES ENDÓCRINOS .....	26
<b>3.4.1 Definições</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.2 Sistema endócrino</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.3 Mecanismo de ação dos disruptores endócrinos</b> .....	<b>28</b>
3.5 PROCESSO DE ESTOCAGEM DA URINA .....	30
3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	31
<b>3.6.1 Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na análise de urina</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6.2 Características gerais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6.3 Fase móvel</b> .....	<b>34</b>
<b>4 ARTIGOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 ARTIGO 1</b> .....	<b>35</b>
4.1.1 INTRODUÇÃO .....	37
4.1.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS .....	38
4.1.2.1 FORÇA CROMATOGRÁFICA DA FASE MÓVEL .....	38
4.1.2.2 SELETIVIDADE DA FASE MÓVEL .....	38
4.1.2.3 ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	39
4.1.2.4 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO .....	39
<b>4.1.2.4.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.2.4.2 LINEARIDADE</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.2.4.3 PRECISÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1.2.4.4 LIMITE DE DETECÇÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.2.4.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.2.4.6 FATOR DE RECUPERAÇÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1.2.4.7 INTERVALO</b> .....	<b>44</b>
4.1.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
4.1.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	44
4.1.3.2 COLETA DE URINA .....	45
4.1.3.3 ESTOCAGEM.....	46
4.1.3.4 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS .....	49
4.1.3.5 REAGENTES E PADRÕES .....	51
4.1.3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	51
<b>4.1.3.6.1 ESCOLHA DA FASE MÓVEL</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1.3.6.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1.3.6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO</b> .....	<b>53</b>
4.1.3.7 ANÁLISE DE DADOS .....	54
4.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	54
4.1.4.1 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.....	54
4.1.4.2 LINEARIDADE.....	57
4.1.4.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	61
4.1.4.4 FATOR DE RECUPERAÇÃO .....	62
4.1.4.5 PRECISÃO .....	62
4.1.5 CONCLUSÃO .....	63

4.1.6 REFERÊNCIAS.....	64
<b>4.2 ARTIGO 2.....</b>	<b>70</b>
4.2.1 INTRODUÇÃO .....	67
4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
4.2.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	68
4.2.2.2 DADOS DE pH .....	68
4.2.2.3 CICLOS EM AMBIENTE CLIMATIZADO E TEMPERATURA AMBIENTE.....	69
4.2.2.4 PERFIL CROMTAGRÁFICO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM NA URINA ACIDIFICADA E NÃO ACIDIFICADA .....	69
4.2.2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDÓCRINOS NA URINA HUMANA ACIDIFICADA .....	70
4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
4.2.3.1 DADOS pH DO 1º CICLO .....	70
4.2.3.2 DADOS pH DO 2º CICLO .....	71
4.2.3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.....	73
4.2.3.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA URINA SEM ACIDIFICAÇÃO .....	74
<b>4.2.3.4.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DO 1º CICLO .....</b>	<b>74</b>
<b>4.2.3.4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DO 2º CICLO .....</b>	<b>76</b>
4.2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES ENCÓCRINOS ESTUDADOS .....	78
<b>4.2.3.5.1 QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL, PREDNISOLONA, DICLOFENACO DE SÓDIO E PROGESTERONA NA URINA HUMANA ACIDIFICADA AO LONGO DO 1º CICLO DE ESTOCAGEM.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2.3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL, PREDNISOLONA, DICLOFENACO DE SÓDIO E PROGESTERONA NA URINA HUMANA ACIDIFICADA AO LONGO DO 1º CICLO DE ESTOCAGEM.....</b>	<b>81</b>
4.2.4 CONCLUSÃO .....	83
4.2.5 REFERÊNCIAS.....	84
<b>5 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>7 RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>101</b>

# **1 INTRODUÇÃO**



Cerca de 2,4 bilhões de pessoas em áreas rural e urbana não têm acesso a serviços de saneamento adequado e, dentro de 20 anos, espera-se que um adicional de 2 bilhões viverá nas cidades, principalmente nos países em desenvolvimento. Cerca de 90% do esgoto em países em desenvolvimento é despejado sem tratamento, poluindo rios, lagos e áreas costeiras (LANGERGRABER; MUELLEGGER, 2004).

Por outro lado, os sistemas convencionais de saneamento, baseados na utilização de água para afastamento dos excretas nas bacias sanitárias, é uma tecnologia que desperdiça água, portanto, não é uma solução ecológica e econômica. Esse tipo de sistema de esgotamento sanitário foi concebido com base na premissa de que os excretas humanos não possuem valor significativo e devem ser descartados em um ambiente capaz de assimilá-los.

Alternativas aos sistemas convencionais estão se tornando cada vez mais indispensáveis por razões ecológicas, econômicas e sociais. Essas novas alternativas consideram o reúso da água, bem como a reciclagem dos nutrientes (SASSE, 2005), sendo o saneamento ecológico (ECOSAN) um caminho alternativo para evitar as desvantagens dos sistemas convencionais de saneamento. O ECOSAN prevê a separação das diferentes formas de águas residuárias nas suas próprias origens, com o objetivo de valorizá-las (OTTERPOHL, 2001).

As vantagens da separação de urina são consideráveis. A urina representa um fluxo pequeno, mas concentrado, e quando separada do efluente, a carga de nutrientes na estação de tratamento pode ser reduzido significativamente (LARSEN *et al.*, 1996).

Além disso, os nutrientes tornam-se disponíveis para recuperação e reutilização. Diferentes técnicas têm sido estudadas para remover e recuperar os nutrientes da urina, focando principalmente em nitrogênio e fósforo (MAURER *et al.*, 2006; UDERT *et al.*, 2003; PRONK *et al.*, 2006; WILSENACH *et al.*, 2006; ZANCHETA, 2007). Os principais processos de tratamento das águas amarelas, objetivando-se sua reciclagem na agricultura, são a estocagem em reservatórios fechados por períodos de tempo pré-determinados, a concentração para redução de volume e a precipitação de cristais (hidroxiapatita e estruvita). Dentre estes, a prática mais comum é a estocagem da urina, necessária para reduzir os riscos biológicos da sua utilização na agricultura.

No entanto, a urina contém também, substâncias que não são desejáveis na agricultura. Ela é uma importante via de excreção de muitos hormônios e fármacos, substâncias que podem funcionar como disruptores endócrinos.

Num ensaio de rastreamento de 212 produtos farmacêuticos uma média de 64% de cada composto foi excretada pela via urinária (LIENERT *et al.*, 2006). Por meio de produtos fertilizantes à base de urina, estas substâncias podem difundir-se no meio aquático ou sofrer acúmulo no solo e ter um efeito adverso sobre a saúde humana e o ambiente (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998).

Embora atualmente não existam valores limites específicos disponíveis para micropoluentes em fertilizantes, a introdução de substâncias potencialmente perigosas ao meio ambiente deve ser evitada (PRONK *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, para se utilizar a urina como fertilizante agrícola com total segurança é necessário saber se ela realmente não contém resíduos de fármacos e disruptores endócrinos em concentrações que poderiam afetar além do seres humanos, também a fauna e a flora, e até mesmo o sistema solo-planta.

Essa pesquisa busca o desenvolvimento e validação de um método em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com a finalidade de quantificar alguns fármacos e disruptores endócrinos na urina humana durante o processo de estocagem, com vistas ao uso agrícola.

A formatação desse trabalho foi realizada sob a forma de artigos, tratando o 1º artigo do desenvolvimento e validação do método de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio, da prednisolona, da progesterona e do sulfametoxazol por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) na urina humana, e o 2º artigo mostra a influência da temperatura e do pH na remoção dos disruptores endócrinos avaliados durante a operação de armazenagem, monitorado por CLAE-DAD.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia apropriada para quantificação de alguns fármacos e disruptores endócrinos uma urina humana, de forma a poder monitorar sistema de estocagem da urina humana para fins de tratamento e aplicação na agricultura.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método analítico laboratorial, baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a detecção e quantificação de diclofenaco de sódio, prednisolona, progesterona e sulfametoxazol na urina humana.
- Avaliar a influência da temperatura e variação de pH durante o processo de tratamento e estudar o comportamento dos disruptores endócrinos durante os processos de estocagem com e sem acidificação da urina humana.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3.1 SANEAMENTO ECOLÓGICO (ECOSAN)

Ecosan, um conceito proveniente dos países nórdicos, principalmente da Suécia, é uma alternativa aos sistemas de tratamento de esgoto convencionais com sustentabilidade econômica baseada na ciclagem de matérias.

Idealmente, os sistemas ecológicos do saneamento permitem a recuperação completa de todos os nutrientes das fezes, urina e águas cinza, beneficiando a agricultura e minimizando riscos de poluição e de saúde, bem como permitem o uso econômico da água e seu reúso máximo, particularmente com a finalidade da irrigação. O saneamento ecológico é frequentemente usado para se referir ao ciclo fechado, que inclui a reutilização dos nutrientes (MANILA, 2003).

As soluções oferecidas pelo saneamento convencional consideram que o meio ambiente pode processar infinitamente os resíduos, e ainda, transferem os problemas para as comunidades ribeirinhas, além de atuar apenas na transformação do estado da matéria e na transferência de um estágio bioquímico para outro. O saneamento ecológico, ao contrário, minimiza a necessidade de recursos externos e reduz a liberação de resíduos do sistema para o meio ambiente. O Ecosan pode contribuir para a segurança alimentar, reduzir a poluição e melhorar o gerenciamento das águas, dos solos e dos nutrientes (ESREY, 1998).

O saneamento ecológico é uma alternativa para evitar as desvantagens dos sistemas convencionais de esgoto. Os excretas humanos (fezes e urina) bem como as demais águas residuárias domésticas são reconhecidas como um recurso, que pode ser disponível para o reúso (LANGERGRABER e MUELLEGGER, 2005). O reúso da urina é parte integrante desse ciclo, pois promove a economia de água e reduz a poluição no meio ambiente.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DA URINA

A urina humana é uma solução complexa de água contendo concentrações de sais e nutrientes. O cloreto de sódio (NaCl) e a uréia [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] são os principais deles, mas também estão presentes o potássio (K), cálcio (Ca), os sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), e o fósforo (P). O fósforo é disponível como superfosfatos (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> ou HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e o potássio como um componente iônico (K<sup>+</sup>) (LIND et al, 2001). Em torno de 80% do nitrogênio total da urina está

na forma de uréia [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] e o restante está em forma de nitrogênio inorgânico, orgânico e amônia. Diariamente, um adulto saudável excreta, em média, 1000 a 2000 mL de urina, sendo que a excreção de uréia varia entre 11,8 e 23,8 g e a relação entre nitrogênio total e uréia é de aproximadamente 0,8 (FITTSCHEN E HAHN, 1998).

Dentre as fontes de nutrientes do esgoto, a urina é a fração que contém a maior parte desses nutrientes, aproximadamente 80% de nitrogênio, 55% de fósforo e 60% de potássio. Ao mesmo tempo, constitui menos de 1% do volume desse esgoto convencional (JOHANSSON, 2000).

O potencial de utilização da urina humana como fertilizante agrícola natural está expresso na Tabela 1, que evidencia a quantidade de nutrientes, em quilogramas, excretada na urina por um adulto no período de um ano. Nessa tabela encontram-se também, os percentuais de nutrientes encontrados nos biossólidos e a quantidade de fertilizante necessária para produzir 250 Kg de grãos, que é considerada quantidade suficiente para as necessidades calóricas e protéicas de uma pessoa adulta por ano (WOLGAST, 1993). Dos 7,5 Kg de fertilizante industrial necessário para o cultivo, apenas uma pessoa poderia contribuir com 6,8 Kg, ou seja, 91% da demanda (ZANCHETA, 2007).

**Tabela 1:** Nutrientes na urina humana e a quantidade de fertilizante necessária para produzir 250Kg de grãos/ano.

	Zancheta, 2007	Wolgast, 1993	Biossólidos após 40 dias de calagem <sup>1</sup> a 50% ST <sup>2</sup> (Pedroza, 2005)	Quantidade de fertilizante necessária
Nitrogênio	3,4 Kg	4,0 Kg	2,6 Kg	5,6 kg
Fósforo	0,4 Kg	0,4 Kg	1,5 Kg	0,7 Kg
Potássio	3,0 Kg	0,9 Kg	0,3 kg	1,2 Kg
N + P + K	6,8Kg	5,3Kg	4,4Kg	7,5Kg

Fonte: adaptado de ZANCHETA, 2007

<sup>1</sup> Etapa do preparo do solo para cultivo agrícola na qual se aplica calcário

<sup>2</sup> Sólidos totais

A urina é também, uma importante via de excreção de muitos hormônios e fármacos. Em relação aos estrogênios, já se tem estudos na literatura, onde 80% dos estrogênios naturais e 67% do hormônio artificial 17  $\alpha$ -etinilestradiol são excretados na urina (PRONK, 2006).

### 3.3 FÁRMACOS

A palavra fármaco tem sido utilizada tanto para sinônimo de droga quanto de medicamento (SOUSA; SANTANA, 2000). O consumo de medicamentos atinge níveis cada vez mais elevados em países desenvolvidos e também naqueles em desenvolvimento (SIMÕES; FARACHE, 1988), principalmente aqueles vendidos sem prescrição médica.

Segundo Garric *et al.* (2002), o desenvolvimento da indústria farmacêutica, que hoje disponibiliza para o mercado milhões de substâncias com propósito terapêutico, acarretou em um grave problema ambiental.

A consultoria IMS Health informou que o mercado global farmacêutico movimentou, em 2010, entre US\$ 820 bilhões e US\$ 830 bilhões, um crescimento de 4% a 6% em relação a 2009. Nos últimos cinco anos, as vendas globais das indústrias cresceram cerca de 40%. Os países do Bric (Brasil, Rússia, Índia e China) deverão ser o motor de expansão nos próximos anos (IMS HEALTH, 2010).

Em 2001, o mercado brasileiro movimentou US\$ 5,7 bilhões, colocando o Brasil entre os 10 países de maior faturamento no varejo (ABIFARMA, 2010).

A expectativa é que, até 2013, o mercado brasileiro cresça entre 8% e 11% e o chinês, entre 23% e 26%. As taxas são altas, se comparadas com a expectativa de expansão global, entre 4% e 7%, entre 2008 e 2013. Já nos chamados mercados maduros, que incluem os EUA, Japão, França, Alemanha, entre outros, o índice deverá ficar entre 2% e 5% (FENAFAR, 2010).

O Brasil deverá ficar em 8º nos próximos três anos, avançando uma posição no ranking comparado a 2003. A economia estável, o maior acesso a medicamentos e as políticas do governo na área de saúde, também colocam o país na rota de potencial investimento de grandes grupos (FENAFAR, 2010).

As políticas dos governos a favor dos produtos genéricos e a expiração de patentes de remédios de marca são alguns dos fatores responsáveis por esse avanço. No Brasil, as vendas totais de medicamentos, em 2009, somaram R\$ 30,2 bilhões, dos quais 15%, ou R\$ 4,5 bilhões foram de genéricos, segundo informou a Pró-Genéricos (Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos). De cada 100 unidades vendidas no país, 20 são de genéricos (FENAFAR, 2010).



Os fármacos geralmente são absorvidos pelo organismo e estão sujeitos a reações metabólicas, sendo transformados em um ou mais metabólitos. Uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos são excretados na urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico (BILA; DEZOTTI, 2003).

Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém, segundo Mulroy (2001), 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretada inalterada e persiste no meio ambiente.

De acordo com Richardson *et al.* (1985), nas ETEs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual:

- Pode ser biodegradado, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;
- Pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas;
- Pode ser persistente, como o diclofenaco.

Pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente. De acordo com Kümmerer (2003), alguns grupos de fármacos residuais merecem uma atenção especial, dentre eles estão os antibióticos. Os antibióticos têm sido amplamente discutidos na literatura, devido ao seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente e por serem usados em grandes quantidades, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária (crescimento do gado, na aquicultura e produção avícola e suína).

O diclofenaco é um dos antiinflamatórios mais prescritos no Brasil. Pode ser encontrado nas formas sódica e potássica. É bastante persistente em condições naturais e aos processos de tratamento de esgoto convencionais. Tem sido detectado em mais de 50 % dos efluentes municipais da Alemanha, em concentrações de aproximadamente 2,5 µg/L (RAVINA *et al.*, 2002; HEBERER, 2002).

### 3.4 DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Atualmente, existem cerca de 11 milhões de substâncias químicas registradas no CAS (*Chemical Abstracts Service*). Nos Estados Unidos e Japão, cerca de 100.000 compostos são produzidos deliberadamente e utilizados para diversos fins. No planeta, aproximadamente 3.000 compostos são produzidos em larga escala, atingindo quantidades superiores a 500.000 kg por ano. Destes, menos de 45% foi submetido a algum tipo de ensaio toxicológico básico e menos de 10% foi estudado quanto aos efeitos tóxicos sobre organismos em desenvolvimento (MELLO-DA-SILVA E FRUCHTENGARTEN, 2005).

Há uma discussão sobre os compostos classificados como contaminantes emergentes. Eles podem ser definidos como poluentes recém identificados ou que anteriormente não eram reconhecidos, mas a principal característica desse grupo é que não necessita persistir no meio ambiente para causar efeitos negativos, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas pela suas contínuas introduções no meio ambiente (PEDROSO, 2007). Dentre eles estão incluídos alguns fármacos de diferentes classes, como os analgésicos, antiinflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipêmicos, antibióticos, contrastes de raio X, hormônios e esteróides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal, inseticidas repelentes e anti-sépticos, bem como os surfactantes amplamente utilizados no consumo doméstico.

Destacam-se alguns compostos denominados disruptores endócrinos, que são substâncias que podem provocar alterações no sistema endócrino de animais e humanos. Eles constituem uma classe de substâncias definidas pelo seu efeito biológico e pela sua natureza química (RAIMUNDO, 2007).

#### 3.4.1 Definições

Diversas definições têm sido propostas para um disruptor endócrino. Entretanto, todas elas afirmam que se trata de uma substância química ou mistura química exógena, capaz de alterar funções do sistema endócrino, ou até sua estrutura, mesmo presentes em concentrações extremamente baixas. Por isso, tais substâncias são mundialmente denominadas *endocrine disruptors* (EDs) ou ainda *endocrine disrupting compounds or chemicals* (EDCs). (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Muitas destas substâncias, embora banidas, ainda permanecem e permanecerão por muito tempo na natureza devido a sua alta estabilidade e, mesmo em pequenas quantidades, seu efeito poderá ser biomagnificado através da ascensão na cadeia alimentar. Não existe um único mecanismo que explique a ação dos interferentes endócrinos, uma vez que eles pertencem a diferentes classes (LANDRIGAN, 2003).

### **3.4.2 Sistema endócrino**

O sistema endócrino consiste em diversas glândulas em diferentes áreas do corpo que produzem hormônios com diferentes funções (BIRKETT, 2003).

Em geral, o sistema hormonal está relacionado principalmente ao controle das diferentes funções metabólicas do organismo, como o controle da velocidade das reações químicas nas células ou o transporte de substâncias através das membranas celulares ou outros aspectos do metabolismo celular, como crescimento e secreção. Alguns efeitos hormonais ocorrem em questão de segundos, enquanto outros necessitam de vários dias para se manifestar, embora persistam por semanas, meses ou até mesmo anos. (GUYTON, 1996).

Após complexos processos bioquímicos em cadeia, o hipotálamo secreta hormônios que controlam a liberação de outros hormônios pela glândula pituitária. Estas glicoproteínas por sua vez, induzem a síntese e a atividade de hormônios de tecidos específicos presentes nas glândulas internas (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A ação de um determinado hormônio inicia-se através da sua ligação a um receptor específico, na membrana celular ou na superfície da mesma, no citoplasma ou no núcleo, gerando uma cascata de reações na célula. No caso dos hormônios esteróides e os hormônios tireóideos, o complexo resultante liga-se a regiões específicas do DNA presente no núcleo da célula ou os ativa, desencadeando a transcrição de genes específicos, resultando na síntese de proteínas nas células-alvo. A seguir, essas proteínas atuam como enzimas, como proteínas de transporte ou como proteínas estruturais que, por sua vez, ativam outras funções celulares (GUYTON, 1996).

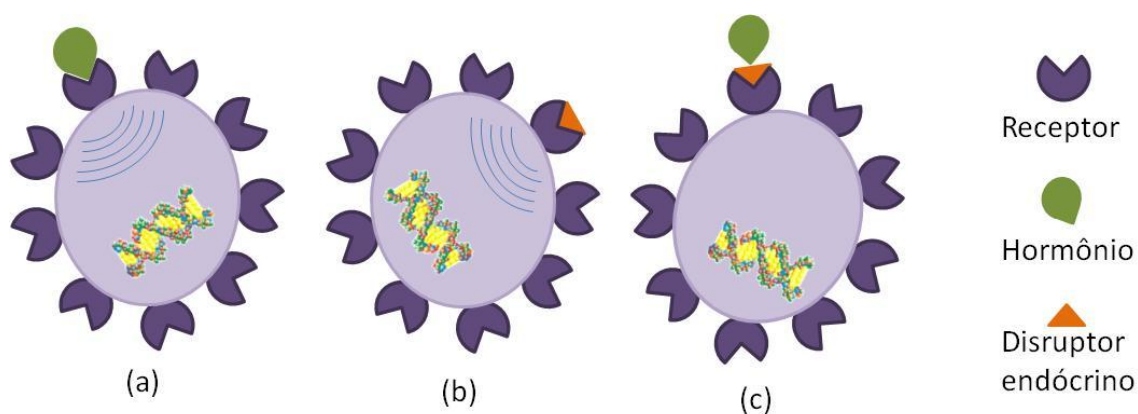
Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, produzido no organismo. Por isso, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram um efeito, produzindo uma resposta natural. Entretanto, estes receptores

hormonais também podem se ligar a outras substâncias químicas. Isso explica o porquê de determinados disruptores endócrinos presentes no organismo, mesmo em baixíssimas concentrações, serem capazes de gerar um efeito, provocando conseqüentemente uma resposta (GHISELLI; JARDIM, 2007).

### 3.4.3 Mecanismo de ação dos disruptores endócrinos

Em suma, os disruptores endócrinos podem interferir no funcionamento do sistema endócrino das seguintes formas:

- mimetizando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, desencadeando reações químicas semelhantes no corpo. Isso é definido como efeito agonista (Figura 1b);
- bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo assim, a ação dos hormônios naturais, que é chamado efeito antagonista (Figura 1c).



**Figura 1:** Mecanismo de ação dos disruptores endócrinos. (a) Resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista.

Os outros efeitos que podem ocorrer no sistema endócrino são alterações na síntese e na remoção dos hormônios de seus respectivos receptores, e ainda, interações com sistemas multi-hormonais (BIRKETT; LESTER, 2003).

Os diversos mecanismos de ação dos disruptores endócrinos estão descritos no Quadro 1.

Mecanismo de ação	Definição
Mimetizadores	Imitando um hormônio natural, um disruptor endócrino é capaz de se ligar de forma precisa ao receptor hormonal. Ocupando o sítio de ligação, mensagens podem ser enviadas aos genes. Mensagens podem ser enviadas em tempos diferentes, ou superprodução de mensagens causando efeitos adversos nas funções biológicas. A função biológica afetada depende do hormônio que está sendo mimetizado
Estimuladores	Alguns disruptores endócrinos são capazes de estimular a formação de mais receptores hormonais, causando sinais hormonais múltiplos. Esse efeito leva a uma amplificação dos hormônios naturais e externos
Bloqueadores	Ocupando o sítio receptor na célula, alguns disruptores endócrinos são capazes de bloquear a ação dos hormônios naturais. Isso pode causar um efeito aumentado ou diminuído no gene dependendo de onde o bloqueador é mais ou menos potente que o hormônio sendo bloqueado
Lavadores hormonais	Acelera a degradação e eliminação do corpo levando a uma depleção do hormônio
Lavadores enzimáticos	Disruptores endócrinos podem interferir nas enzimas que são requeridas para degradação dos hormônios. Desativando-as, mais hormônio é necessário para exercer a atividade. Sua presença continuada no corpo envia mais sinais que o normal ou sinais em tempo inadequado
Destruidores	Destruidores podem destruir o hormônio ou a capacidade hormonal de exercer sua função agindo direta ou indiretamente para alterar sua estrutura, impossibilitando que o hormônio se ligue ao sítio do seu receptor.

**Quadro 1:** Mecanismo de ação dos disruptores endócrinos

Fonte: BIRKET, 2003

Segundo o Comitê Científico de Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente – CCTEA, há associações envolvendo a presença destas substâncias no organismo humano e o surgimento de algumas doenças, como câncer de testículo, de mama e de próstata, a queda da taxa de espermatozoides, deformidades dos órgãos reprodutivos, disfunção da tireóide e alterações relacionadas com o sistema neurológico.

Muitos disruptores endócrinos competem com o estradiol (hormônio sexual feminino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de estrogênio. Outros competem com a diidrotestosterona (hormônio sexual masculino produzido naturalmente pelo organismo) pelos receptores de androgênio. Portanto, estas substâncias exercem efeitos de feminização ou masculinização sobre o sistema endócrino. Substâncias que produzem efeitos de feminização são conhecidas como estrogênicas, enquanto que as que produzem efeitos de masculinização são conhecidas como androgênicas (BIRKET, 2003).

### 3.5 PROCESSO DE ESTOCAGEM DA URINA

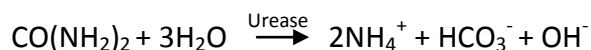
Os principais processos de tratamento urina, objetivando-se sua reciclagem na agricultura, são a estocagem, a concentração e a precipitação de cristais. Dentre estes, a prática mais comum é a estocagem da urina.

A urina humana é totalmente estéril na bexiga, mas quando é excretada, bactérias são arrastadas ao longo do trato urinário, contaminando-a. A estocagem oferece uma forma possível de reduzir os potenciais riscos à saúde por patógenos fecais. Três parâmetros de estocagem influenciam esse processo: tempo de estocagem, temperatura e pH (MAURER, 2006).

Na Suécia, a técnica usada tem sido armazenar a urina por um período de tempo para que não haja nenhum microorganismo, pois o período de sobrevivência desses microorganismos não é muito longo, principalmente em países tropicais onde a temperatura é mais elevada (MITSCHERLICH E MARTH, 1984 apud TANSKI, 2003).

Hoglund *et al.* (2002b) concluíram que, se armazenada a 20°C por pelo menos 6 meses, a urina pode se considerada segura com relação a organismos indicadores de contaminação bacteriana e viral para uso como fertilizante em qualquer cultura. Seus experimentos mostraram que a temperatura foi o parâmetro mais importante na influência das taxas de inativação.

Durante o processo de estocagem ocorre hidrólise da uréia, que é catalisada pela enzima urease, uma enzima contida em vários microorganismos (ALEXANDER, 1977). Durante o processo de hidrólise o pH aumenta, amônia e íons bicarbonato são produzidos:



Logo, a decomposição da uréia ocasiona uma diminuição da concentração do nitrogênio orgânico e um aumento do pH, existindo então o risco de perdas do nitrogênio pela evaporação da amônia livre,  $\text{NH}_3$ .

Caso algum fator externo atue sobre os ânions hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) formados na hidrólise da uréia, como por exemplo, a ação do ozônio ou radiação, haverá a formação de radicais hidroxila. Esses radicais hidroxila são capazes de atacar os produtos farmacêuticos. Porém, estes radicais reagem de forma bastante inespecífica com ligações C-H, que podem estar presentes na urina (GULYAS, 2007).

Hanæus *et al.* (1996) concluíram que a conversão de uréia a nitrogênio amoniacal durante o período de estocagem pode ser inibida pela adição de ácido sulfúrico e, segundo Hellström (1999), os resultados com testes utilizando ácido acético e ácido sulfúrico indicam que este é mais eficiente em comparação com o ácido acético.

### 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um tipo de cromatografia que utiliza uma fase estacionária, colunas recheadas com resinas específicas, e uma fase móvel, eluída sob pressão. Essa técnica possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, 2006).

#### 3.6.1 Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na análise de urina

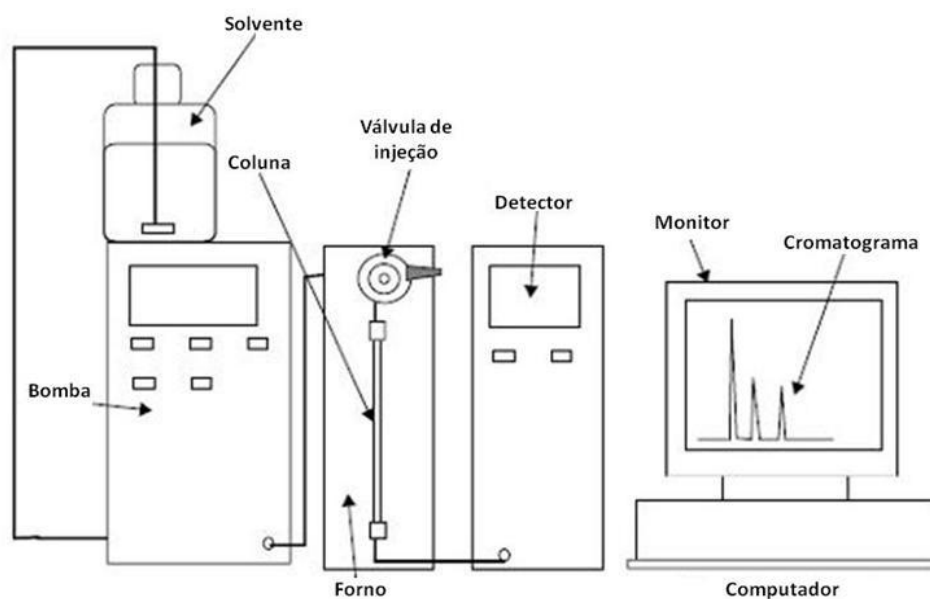
A aplicabilidade da CLAE é ampla, sendo utilizada para a análise de várias matrizes, inclusive a urina. Porém, a análise direta de fármacos, em baixos níveis de concentração, é praticamente inviável, seja pela complexidade da matriz, seja pelo limite de detecção das técnicas instrumentais disponíveis. (GAJUREL *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007). Por isso é necessário que se desenvolva um método analítico específico de acordo com os compostos que se deseja estudar.

Existem diversos métodos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para detecção de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana foram desenvolvidos e validados, como é o caso do método proposto por Baranowska *et al.* (2006), Antunes *et al.* (2010), *et al.*, Ferreirós (2007), Zhang (2008), dentre outros.

Os métodos desenvolvidos podem ser usados para determinada classe de fármacos, disruptores endócrinos e outras substâncias, ou podem ser usados para várias substâncias de diferentes classes simultaneamente, como é o caso do método desenvolvido por Baranowska *et al.* (2006), no qual se realizou a detecção simultânea de 11 drogas pertencentes a quatro diferentes grupos.

### 3.6.2 Características gerais

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência consiste basicamente de uma coluna, embalada com uma fase estacionária apropriada através da qual passa uma fase móvel. A coluna é normalmente localizada em um forno (DEAN, 2003). O esquema básico de um cromatógrafo está ilustrado nas Figura 2 e Figura 3.



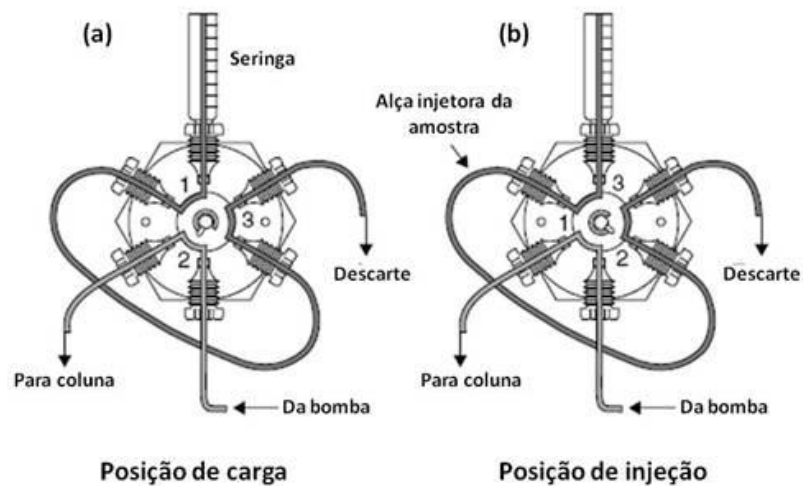
**Figura 2:** Esquema de um típico cromatógrafo líquido de alta eficiência  
Fonte: DEAN, 2003





**Figura 3:** Cromatógrafo LABCROM-UFES

As amostras são injetadas através de um circuito de volume fixo conectado a um válvula de injeção de seis portas (Figura 4) na coluna e, após a separação, detectadas (DEAN, 2003).



**Figura 4:** Esquema de uma típica válvula de injeção usado em CLAE: (a) Posição de carga; (b) Posição de injeção  
Fonte: DEAN, 2003

O detector é o responsável pela geração de um sinal diretamente proporcional à concentração do analito. Existem diversos tipos de detectores disponíveis, como ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), e espectrometria de massa (MS) (NICHOLSON e BURCH, 2001).

O sistema de CLAE pode ser operado no modo isocrático, ou seja, com a mesma composição da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, ou por eluição por gradiente, na qual a composição da fase móvel varia de acordo com o tempo de execução. A escolha do gradiente ou modo isocrático depende do número de analitos a serem separados e a velocidade com qual é necessária que a separação seja realizada (DEAN, 2003).

### **3.6.3 Fase móvel**

A fase móvel é um sistema de água-solvente orgânico que é bombeada através de um pistão ou bomba de pistão.

A fase móvel deve ter alta pureza permitindo realizar análises de alta sensibilidade, pois as impurezas da fase móvel podem absorver e diminuir a sensibilidade do detector para os componentes da amostra.

A amostra deve ser solúvel na fase móvel e não sofrer decomposição, para que possa ser transportada através da coluna sem que seus componentes se modifiquem. Quando possível, o solvente da amostra deve ser a própria fase móvel ou um dos seus componentes para que não haja precipitação no injetor ou na coluna, o que pode provocar queda de resolução na separação (COLLINS *et al.*, 1997).

**4 ARTIGOS**

## **4.1 Artigo 1**

---

**Desenvolvimento e validação de um método para a detecção e quantificação de diclofenaco de sódio, prednisolona, progesterona e sulfametoxazol na urina humana durante o processo de estocagem**

Julia Magalhães Brum Campos, Priscilla Garozi Zancheta, Ricardo Franci Gonçalves

#### 4.1.1 INTRODUÇÃO

Técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas tanto em amostras ambientais, quanto em farmacêuticas ou biológicas.

A fase móvel (FM) em CLAE desempenha um papel muito importante, pois sua composição quase sempre é fundamental no processo de separação. Portanto em CLAE, a FM exerce duas funções, ou seja, arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação. (COLLINS *et al.*, 2006 ).

Para garantir que método sensível, seletivo e reprodutível para a detecção e quantificação de disruptores endócrinos na urina humana armazenada, desenvolvido nesse trabalho, gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele foi submetido a uma validação do método.

A validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Assim, é possível demonstrar se os métodos de ensaio executados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (BRASIL, 2003b).

O processo de validação é contínuo, com início no planejamento da estratégia analítica, continuando ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI, 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2003a), e o Instituto Nacional de Metrologia, INMETRO (BRASIL, 2003b), disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA nº 899, de 2003 e o documento INMETRO DOQCGCRE-008, de 2003, os quais serão utilizados para o processo de validação do método desenvolvido nesse trabalho.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi a proposição de um método sensível, seletivo e reprodutível para a detecção e quantificação de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana armazenada.

## 4.1.2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS

### 4.1.2.1 FORÇA CROMATOGRÁFICA DA FASE MÓVEL

A força cromatográfica do solvente é atribuída em função da polaridade da fase estacionária. O solvente é considerado forte quando possui grau de polaridade semelhante ao da fase estacionária.

Em cromatografia líquida de fase reversa, na qual a fase estacionária é mais polar, os solventes fortes são os mais apolares. Logo, fases móveis que possuem maior proporção de solvente orgânico são consideradas fases móveis fortes em CLAE-FR.

Aumentando-se a proporção de água na fase móvel, diminui-se a força da mesma e aumenta-se a retenção. (COLLINS *et al.*, 2006).

### 4.1.2.2 SELETIVIDADE DA FASE MÓVEL

A seletividade da fase móvel relaciona-se à solubilidade relativa dos componentes da amostra em solventes de polaridade semelhantes (SKOOG *et al.*, 2001).

Na fase móvel, primeiro se ajusta a força e, se houver sobreposição de picos no cromatograma, a solução é alterar sua seletividade, até se obter um fator de separação suficiente para a separação desses picos.

Para tanto, deve-se alterar a proporção de pelo menos um solvente da fase móvel, com a finalidade de modificar sua seletividade, mantendo-se a polaridade dos solventes constante, obtendo-se assim, misturas isoeluotrópicas, ou seja, de mesma polaridade, porém com diferentes seletividades. (COLLINS *et al.*, 2006).

A Tabela 2 apresenta as propriedades das fases móveis utilizadas. Observa-se que o metanol e a acetonitrila possuem seletividades diferentes e a água é utilizada para ajustar a força da mistura.

**Tabela 2:** Propriedades das fases móveis mais comuns

Solvente	Índice de refração <sup>a</sup>	Viscosidade, cP <sup>b</sup>	Ponto de ebulição, °C	Índice de polaridade, P'	Força de eluição <sup>c</sup> , ε0
Fluoroalcanos <sup>d</sup>	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	< -2	-0,25
Ciclohexano	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
n-Hexano	1,372	0,30	69	0,1	0,01
Tolueno	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Clorofórmio	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanol	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Acetato de etila	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Dioxano	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanol	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrila	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Água	1,333	0,89	100	10,2	Grande

<sup>a</sup> A 25°C

<sup>b</sup> O centipoise é uma unidade típica de viscosidade; em unidades do SI, 1 cP = 1mN.s.m<sup>-2c</sup> Em Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Multiplicando-se por 0,8 se obtém o ε<sup>0</sup> para SiO<sub>2</sub>.

<sup>d</sup> As propriedades dependem da massa molecular. Dá-se um intervalo de dados.

Fonte: Adaptado de SKOOG *et al.*, 2001

#### 4.1.2.3 ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A maneira como se desenvolve a separação da amostra em CLAE chama-se eluição. Ela pode ser isocrática ou por gradiente.

Na eluição isocrática, a força cromatográfica permanece constante durante todo o processo de separação e, na eluição por gradiente, a composição da fase móvel varia durante a separação, de modo que a força cromatográfica aumenta gradativamente, obtendo-se maior simetria para os picos cromatográficos, maior resolução e detectabilidade e menor tempo de análise. (COLLINS *et al.*, 2006 ).

#### 4.1.2.4 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO MÉTODO

Os parâmetros a serem considerados no processo de validação de uma determinada metodologia são os seguintes: 1. Especificidade e seletividade; 2. Linearidade; 3. Precisão; 4. Limite de detecção (LD); 5. Limite de quantificação (LQ); 6. Exatidão; 7. Recuperação; 8. Robustez; 9. Incerteza de medição (BARANOWSKA, 2006).

Toda validação começa com uma condição analítica proveniente de um desenvolvimento prático associado à busca de referências na literatura científica. E para o início dos testes de validação, é necessário, portanto, a definição da melhor condição analítica. (LEITE, 2008).

#### **4.1.2.4.1 Especificidade e seletividade**

O parâmetro de especificidade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse, logo, um método que produz resposta pra uma única substância pode ser chamado de específico.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame, na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método.

Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse (RIBANI, 2004).

#### **4.1.2.4.2 Linearidade**

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

Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a elaboração de uma curva resposta que demonstre a relação “sinal detectado” *versus* concentração. É formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A Equação 1 relaciona as duas variáveis.



$$y = ax + b \quad (1)$$

Em que:

$y$  = resposta medida;

$x$  = concentração;

$a$  = inclinação da curva de calibração;

$b$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação ( $r$ ), intersecção com o eixo  $y$  ( $b$ ), coeficiente angular ( $a$ ), soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (CV) (BRASIL, 2003a).

#### 4.1.2.4.3 Precisão

Precisão é o grau de concordância entre resultados de medições independentes, em torno de um valor central, efetuadas várias vezes e uma amostra homogênea, sob condições experimentais pré-estabelecidas (ISO 5735-3, 1994).

A precisão é considerada, em geral, em dois níveis (LEITE, 2008; BRASIL, 2003b):

1º - Repetitividade: concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo local e mesmo procedimento. Pode ser verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, de acordo o intervalo linear do método, ou seja, triplicatas de 3 (três) concentrações, baixa, média e alta ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003a);

2º - Reprodutibilidade: É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição e executadas por laboratórios diferentes. A reprodutibilidade também é denominada de precisão inter-laboratorial. (BRASIL, 2003a).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas.

#### 4.1.2.4.4 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O Limite de detecção pode ser calculado das seguintes formas: método visual, método relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI, 2004).

No caso de métodos instrumentais, como a CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Nesse caso pode ser determinado pela Equação 2.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (2)$$

Em que:

$DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y (de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação). Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;

$IC$  = inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003b).

#### 4.1.2.4.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (BRASIL, 2003b).

Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos, podendo ser expresso pela Equação 3.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (3)$$

Em que:

$DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y (de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação). Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;

$IC$  = inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003b).

#### 4.1.2.4.6 Fator de recuperação

Toda amostra que recebe tratamento de análise (extração, concentração, etc) deve ter calculado, experimentalmente, o erro ou perda do analito. A porcentagem de erro ou perda da espécie em análise denomina-se recuperação, e o número atribuído à quantidade de massa passível de ser extraída de uma amostra contendo outros componentes designa-se fator de recuperação (LEITE, 2008).

Recuperação é a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. (BRASIL, 2003b)

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (BRASIL, 2003b) e, então, serem submetidas ao processo analítico (SPE e CLAE-DAD) com o objetivo de determinar o poder extrativo do método.

A recuperação pode ser determinada pela equação 4 (MARTINS, 2010).

$$Fator\ de\ Recuperação\ (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

$C_1$  = Concentração determinada na amostra adicionada

$C_2$  = Concentração determinada na amostra não adicionada

$C_3$  = Concentração adicionada

#### **4.1.2.4.7 Intervalo**

O intervalo, também denominado faixa linear de trabalho, é a faixa entre os limites de quantificação, superior e inferior, de um método analítico no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas (LANÇAS, 2004b).

A faixa linear de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. Sempre que possível, a concentração alvo deve se situar no centro da faixa de trabalho (BRASIL, 2003b).

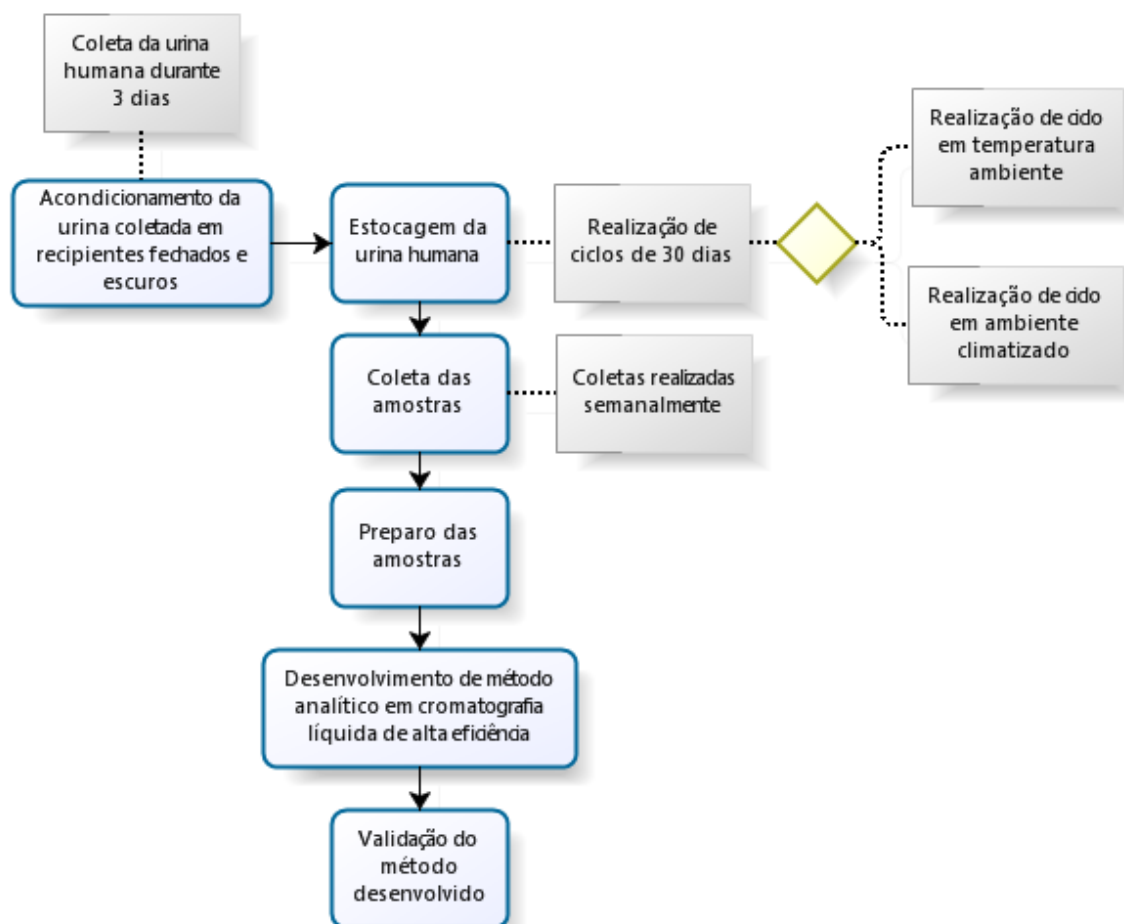
### **4.1.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Esta pesquisa foi desenvolvida no Parque Experimental do Núcleo Água da Universidade Federal do Espírito Santo (Sistema ETE-UFES), localizado no Campus Goiabeiras, Vitória-ES.

Todas as análises laboratoriais necessárias à realização desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Saneamento, LABSAN, da mesma instituição.

As etapas realizadas no trabalho estão resumidas no fluxograma apresentado na Figura 5.



**Figura 5:** Fluxograma das etapas do trabalho

#### 4.1.3.2 COLETA DE URINA

A urina foi coletada em recipientes previamente higienizados com água, detergente e álcool 70%. O procedimento de coleta foi realizado com a colaboração dos pesquisadores do grupo de pesquisa do laboratório de saneamento da UFES (LABSAN), em conjunto a outros colaboradores externos, sendo todos homens saudáveis, para que o nível hormonal seja o menor possível (WINKER *et al.*, 2008). Nenhum dos colaboradores estava fazendo uso de medicações.

A coleta foi realizada durante três dias e o volume coletado foi de aproximadamente 20 litros para cada ciclo de estocagem.

A urina coletada foi misturada, homogeneizada, dividida e acondicionada nos respectivos reservatórios.

#### 4.1.3.3 ESTOCAGEM

O procedimento de estocagem foi realizado em reservatórios escuros e fechados, com capacidade para 15 litros, sendo o volume acondicionado em cada reservatório de 5 litros. Para cada ciclo de estocagem foram usados 4 reservatórios.

Foram executados quatro ciclos de estocagem, adotando-se o período de 30 dias para cada ciclo. Os dois primeiros ciclos foram apenas para desenvolvimento do método analítico laboratorial, não sendo possível usá-los na quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos estudados. Portanto, para efeitos práticos desse trabalho, foram considerados apenas dois ciclos de estocagem, aqueles nos quais foi possível a quantificação dos compostos estudados.

Um ciclo foi realizado em ambiente climatizado, para que a temperatura se mantivesse próxima a 19°C durante todo o período de estocagem. Esses reservatórios foram alocados em uma sala climatizada localizada na ETE-UFES.

O outro ciclo foi realizado à temperatura ambiente, para se verificar a possível interferência da temperatura nos experimentos.

Cada ensaio contou com dois reservatórios com urina acidificada (Figura 6).

A acidificação foi realizada para evitar a hidrólise da uréia, utilizando-se ácido sulfúrico concentrado, pois segundo Hellström (1999), os resultados com testes utilizando dois tipos de ácidos indicam que o ácido sulfúrico é mais eficiente em comparação com o ácido acético. A quantidade de ácido utilizada foi cerca de 8 mL, para que o pH ficasse em torno de 2,5 a 3,0.

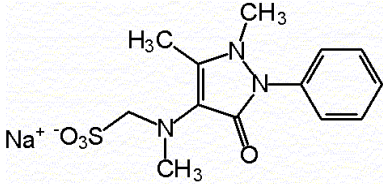
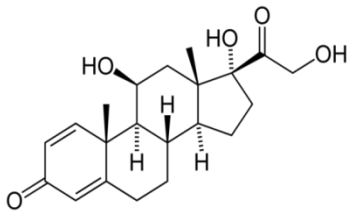
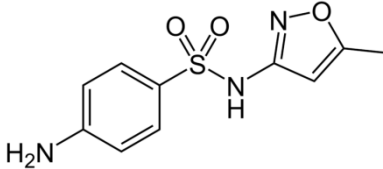
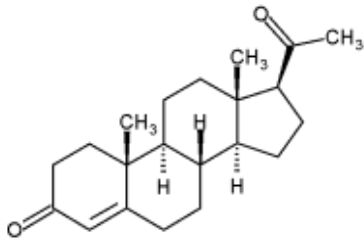


Figura 6: Esquema dos reservatórios nos ensaios

Em dois dos quatro reservatórios, sendo um acidificado e um não acidificado foram acrescentadas concentrações de diclofenaco de sódio (DICLO), prednisolona (PRE), progesterona (PRO) e sulfametoxazol (SULFA). Foram utilizados os padrões dos compostos.

As características, nomenclatura IUPAC e fórmulas estruturais dos padrões utilizados estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Padrões Cromatográficos, estruturas e nome IUPAC dos compostos analisados

Compostos	Marca	Pureza	Nome IUPAC	Fórmula Estrutural
<b>Fármacos</b>				
Diclofenaco de Sódio	Sigma	≥99%	ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenilacético	
Prednisolona	Sigma	≥99%	1,4-Pregnadiene-11β,17α,21-triol-3,20-dione, 1-Dehydrocortisol, 1-Dehydrohydrocortisone, 11β,17α,21-Trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione	
Sulfametoxazol	Sigma	≥99%	4-amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl)-benzenesulfonamide	
<b>Hormônios</b>				
Progesterona	Sigma	≥99%	17-acetyl-17-hydroxy-6,10,13-trimethyl-1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15, 16,17-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one	

Os dados farmacocinéticos, reações adversas dos fármacos e hormônio utilizados na estocagem estão apresentados na Tabela 4.

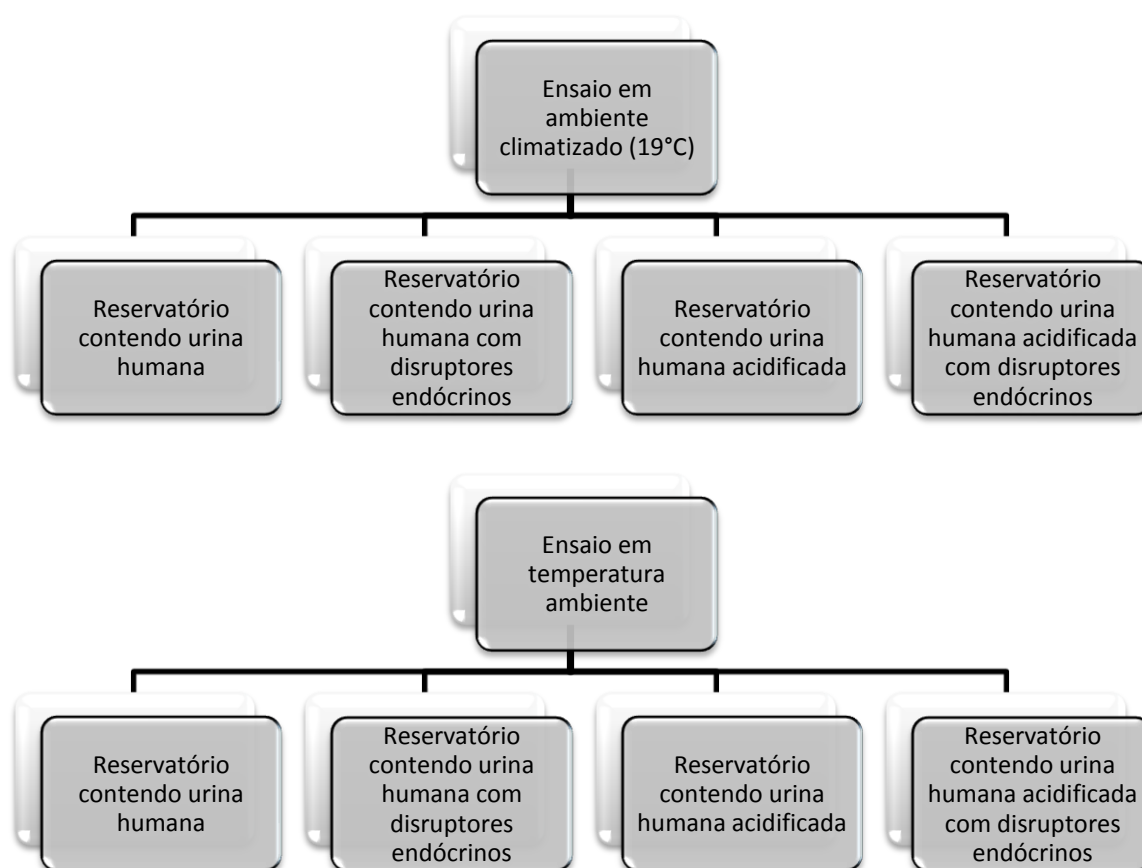
**Tabela 4:** Dados farmacocinéticos e reações adversas

Compostos	Excreção Urinária (%)	Meia-Vida (h)	Reações Adversas
<b>Fármacos</b>			
Diclofenaco de Sódio	65	1,1±0,2	Epigastralgia, distúrbios gastrointestinais, tais como náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, dispepsia, flatulência, anorexia, irritação local; cefaléia, tontura ou vertigem; reações de hipersensibilidade, tais como asma, reações sistêmicas anafiláticas, incluindo- se hipotensão.
Prednisolona	26±9	2,2±0,5	Anormalidades hidroeletrólíticas, hipertensão, hiperglicemia, aumento da suscetibilidade à infecções, osteoporose, miopatia, distúrbios do comportamento , cataratas, parada do crescimento e a compleição característica da dosagem excessiva de esteróides (redistribuição da gordura, estrias, acnes, hirsutismo).
Sulfametoxazol	14±2	10,1 ±2,6	Distúrbios do trato urinário; distúrbios do Sistema Hematopoiético; reações de Hipersensibilidade; anorexia, náuseas e vômitos, provavelmente de origem central
<b>Hormônio</b>			
Progesterona	95	34-55	Pode induzir ações depressoras e hipnóticas no SNC, pode reduzir a tolerância à glicose, aumento do depósito de gordura, distúrbio tromboembólico ou trombótico, cansaço; coceira; cor amarelada na pele ou nos olhos.

Fonte: GOODMAN, 2003

A Figura 7 apresenta a disposição da urina e dos disruptores endócrinos nos reservatórios nos ciclos de estocagem.





**Figura 7:** Disposição dos reservatórios nos ensaios

Com a finalidade de se obter algumas informações sobre o perfil cromatográfico de alguns fármacos e disruptores endócrinos na urina, e verificar a possibilidade de remoção dos mesmos por meio do processo de estocagem, nas piores condições, ou seja, em altas concentrações, a urina humana foi enriquecida com as quatro substâncias selecionadas, nas concentrações de 10 mg/L para cada composto estudado.

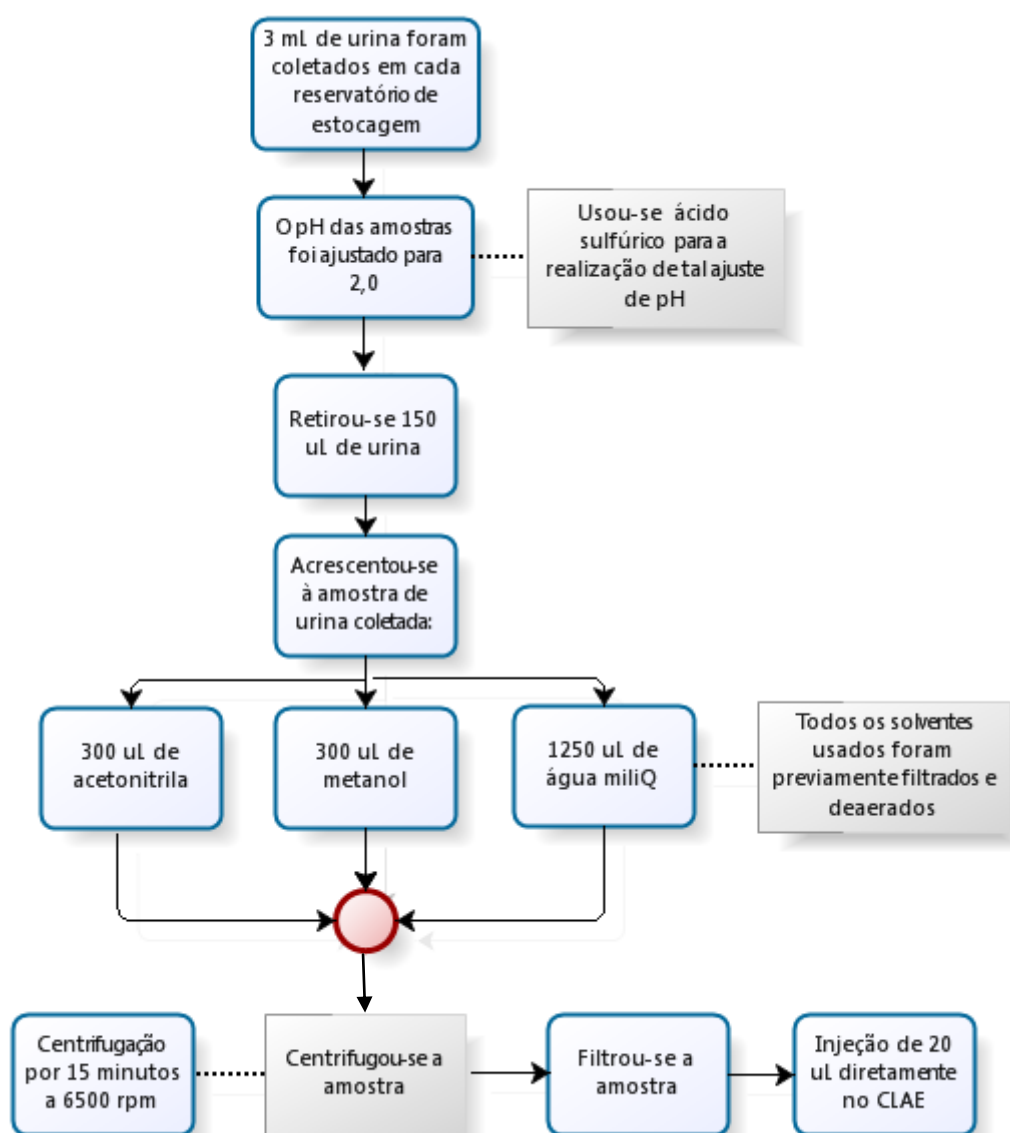
A urina estocada foi analisada semanalmente durante todo o período de estocagem.

#### 4.1.3.4 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras semanais, sendo uma de cada reservatório, do início ao fim do experimento.

Para a preparação da amostra, foram coletados de 3 mL de urina humana de cada reservatório, acidificados e não acidificados. A urina foi transferida para um recipiente e o pH foi ajustado com ácido sulfúrico para 2,0.

Depois, 150 µL dessa urina foram transferidos para um eppendorf. Acrescentou-se 300 µL de metanol, 300 µL de acetonitrila (ACN) e 1250 µL de água miliQ filtrada. Agitou-se por 1 minuto e a amostra foi levada para a centrifuga, na qual passou pelo processo de centrifugação por 15 minutos em 6500 rpm. A amostra final foi filtrada e 20 uL foram injetados diretamente no CLAE. O resumo desse procedimento de preparação das amostras está apresentado na Figura 8.



**Figura 8:** Fluxograma de preparação das amostras

Para a preparação da solução padrão para a validação do método, os padrões de SULFA, PRED, DICLO e PRO foram diluídos em metanol.

#### 4.1.3.5 REAGENTES E PADRÕES

Os solventes orgânicos utilizados foram adquiridos da *Tedia*<sup>®</sup> e *Carlos Erba Reagents* e o ácido trifluoroacético (TFA) da *Merck*, todos com grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência. A água ultrapura, utilizada na preparação das soluções, foi produzida com o sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>).

Os padrões sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona foram obtidos da *sigma-aldrich*<sup>tm</sup> company, com pureza maior ou igual a 99%.

#### 4.1.3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A separação cromatográfica foi realizada por CLAE em um aparelho Shimadzu, modelo UCLC 20AVP. Este estava equipado com uma coluna de guarda Securityguard Cartridges, marca Phenomenex, com a finalidade de proteger a coluna de separação, e uma coluna de separação Phenomenex, modelo LUNA C18 5 µm, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e 100 Å. Os solventes utilizados como fase móvel foram acetonitrila, TFA (ácido trifluoroacético), metanol e água. O detector empregado nas análises foi um detector na região do ultravioleta com arranjo de fotodiodos (DAD), modelo SPD-M10VP também da Shimadzu.

##### 4.1.3.6.1 Escolha da fase móvel

A fase móvel foi selecionada com base em estudos na literatura (CUNHA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2007; RAIMUNDO, 2007) e após testes preliminares, com os padrões. Após uma corrida inicial exploratória, constatou-se que o modo de eluição mais adequado foi por gradiente.

Foram testados 4 tipos de fases móveis (FM1, FM2, FM3 e FM4). A fase móvel testada inicialmente (FM1) está demonstrada na Tabela 5. O fluxo adotado na corrida foi de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.

**Tabela 5:** Fase móvel 1 (FM1)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	40	10	50	0,8
5,30	48	2	50	0,8
35	48	2	50	0,8

A fase móvel testada posteriormente (FM2) utilizava uma quantidade menor de acetonitrila, com a finalidade de se obter uma seletividade mais adequada para a eluição dos compostos estudados, e o tempo de corrida foi aumentado para 40 minutos. O fluxo foi mantido em 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Essa fase móvel está demonstrada na Tabela 6.

**Tabela 6:** Fase móvel 2 (FM2)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	50	10	40	0,8
30	43	2	55	0,8
31	50	10	40	0,8
40	50	10	40	0,8

A fase móvel 3 (FM3) utilizou uma quantidade ainda menor de acetonitrila, 45 minutos de corrida e fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> (Tabela 7).

**Tabela 7:** Fase móvel 3 (FM3)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	55	10	35	0,8
30	43	2	55	0,8
31	55	10	35	0,8
45	55	10	35	0,8

Na fase móvel 4 (FM4) o percentual de metanol foi aumentado e o de acetonitrila diminuído em comparação às fases móveis anteriormente estudadas, obtendo-se, desse modo, uma seletividade mais adequada para a separação cromatográfica dos compostos estudados (Tabela 8).

**Tabela 8:** Fase móvel 4 (FM4)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	55	35	10	1,0
1,5	55	35	10	1,0
8	48	40	12	1,0
20	35	50	15	1,0
30	35	50	15	1,0
31	55	35	10	1,0
40	55	35	10	1,0

Os fármacos e os hormônios foram diluídos em metanol. As separações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente, o fluxo de injeção foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura do forno foi ajustada para 30° C.

#### 4.1.3.6.2 Preparo das Soluções Padrão

Para o preparo das soluções padrão, dilui-se 1 mg de cada padrão em 10 mL de metanol, separadamente.

Todas as soluções foram agitadas no Vortex Mixer por 3 minutos.

#### 4.1.3.6.3 Validação do método cromatográfico

A partir da solução padrão diferentes soluções diluídas foram preparadas para se obter 8 níveis de concentração para a curva de calibração (Tabela 9). Para cada nível de calibração realizaram-se análises em triplicata.

**Tabela 9:** Pontos da curva de calibração

<b>Pontos</b>	<b>Diclofenaco de sódio</b>	<b>Prednisolona</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Sulfametoxazol</b>
	<b>Concentração (ug.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (ug.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (ug.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (ug.mL<sup>-1</sup>)</b>
1	2	2	2	2
2	5	5	5	5
3	7,5	7,5	7,5	7,5
4	10	10	10	10
5	12,5	12,5	12,5	12,5
6	15	15	15	15
7	20	20	20	20
8	22	22	22	22

Todas as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento e condições da análise cromatográfica utilizados durante o processo de estocagem.

As características de desempenho do método, ou parâmetros de validação, investigadas foram:

- Linearidade;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Intervalo;
- Fator de recuperação;
- Precisão.

#### 4.1.3.7 ANÁLISE DE DADOS

A manipulação dos dados foi realizada com auxílio dos programas Microsoft Excel® e Software LCSolution (LabSolution, Shimadzu). Os cromatogramas foram analisados e integrados em 254 nm.

A estatística descritiva utilizada para a análise dos resultados foi a média aritmética, como medida de tendência central para os dados em triplicata, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV), como medidas do grau de dispersão dos dados das médias. Para análise de linearidade foi calculado o coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

### 4.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1.4.1 SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

Observou-se que se utilizando a FM1 foi possível detectar apenas a prednisolona e o diclofenaco, sendo que a prednisolona não eluiu com boa resolução, sobrepondo-se aos picos dos compostos naturais da urina (Figura 9).

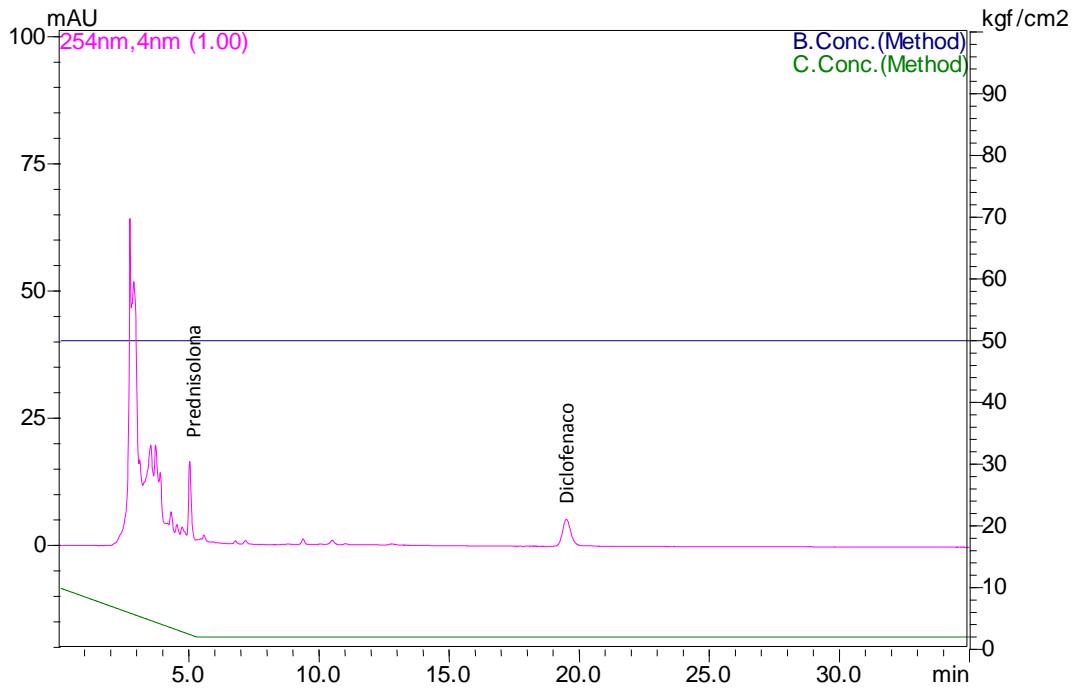


Figura 9: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 1 (FM1)

Na FM2 observa-se a formação de uma cauda no final do pico do sulfametoxazol e da prednisolona, o que prejudica a quantificação dos padrões na amostra Figura 10.

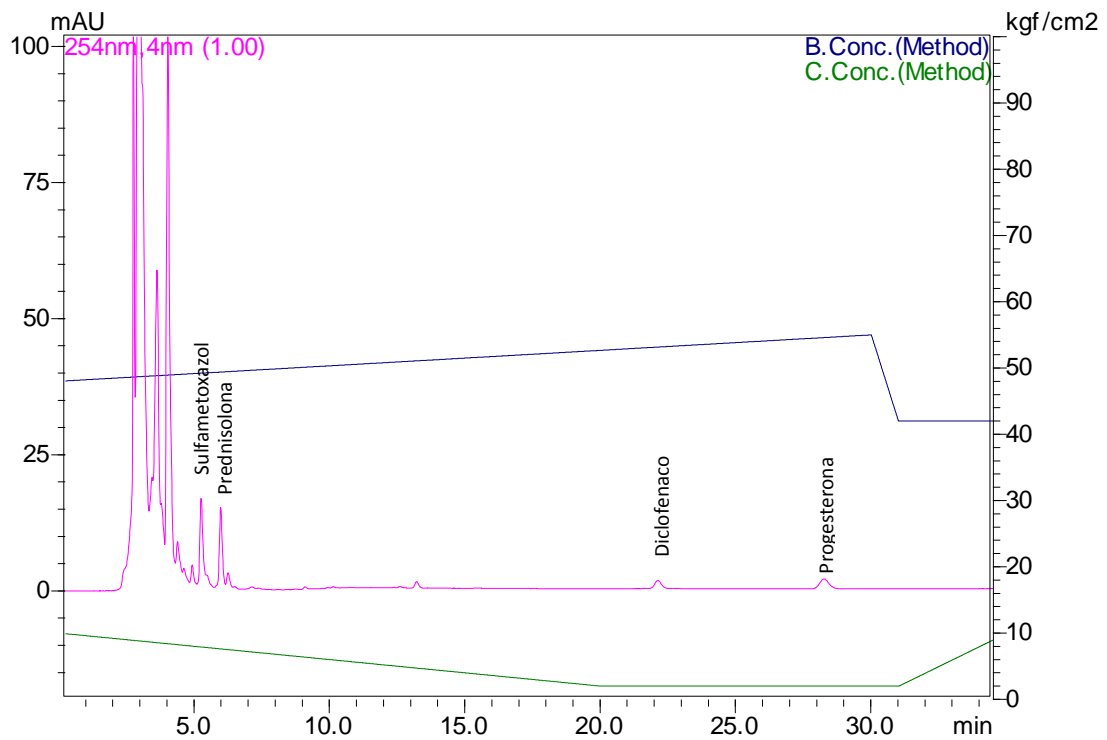


Figura 10: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 2 (FM2)

A diferença entre as FM2 e FM3 é o aumento do tempo de corrida, de 40 minutos para 45 minutos e a diminuição da concentração de ACN, alterando dessa forma, a seletividade da fase móvel com a finalidade de melhorar a resolução de picos sobrepostos.

Utilizando-se a FM3 o padrão foi eluído de forma mais eficiente do que na FM2, porém observou-se a separação deficiente de analitos com tempos de retenção bem próximos Figura 11.

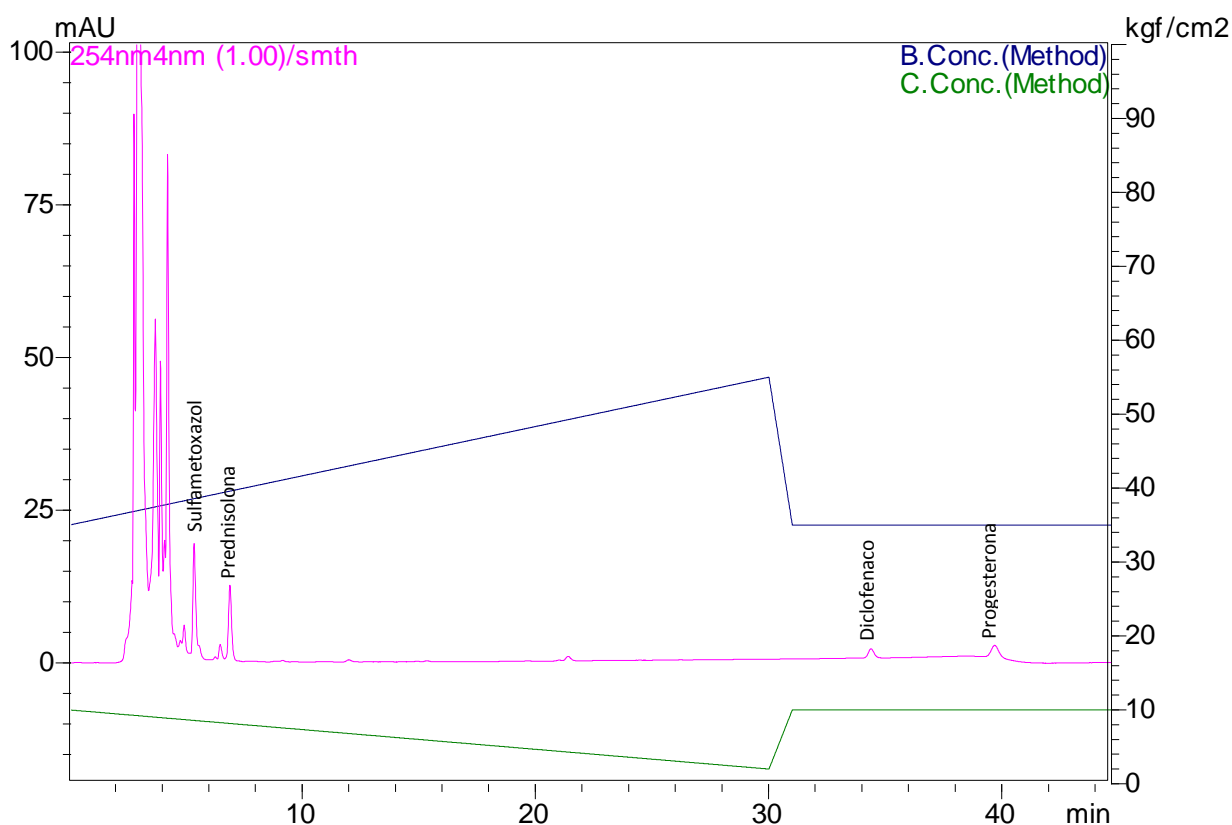


Figura 11: Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 3 (FM3)

Estruturalmente, a prednisolona apresenta grupos polares: cetona conjugada, na posição 3 (anel A), uma cadeia lateral hidroxicetônica, na posição 17 (anel D) e um grupo hidroxila, na posição 11 (anel C) (COELHO, 2004) (Figura 12).

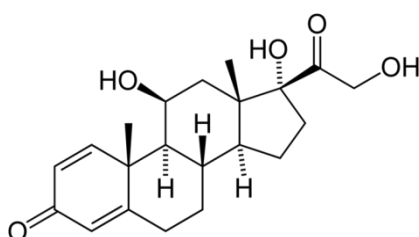
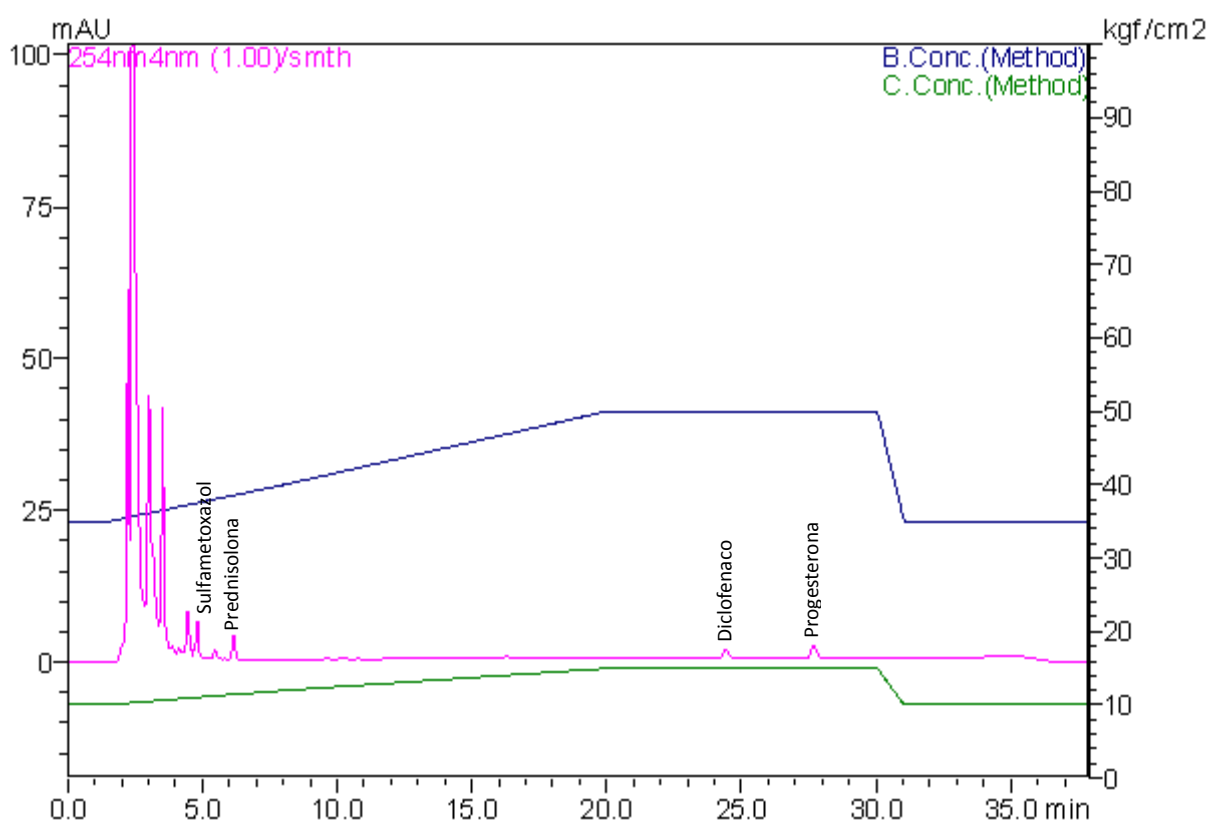


Figura 12: Estrutura da prednisolona



Mesmo após o ajuste da força cromatográfica, o cromatograma obtido apresentou sobreposição ao pico da prednisolona. Para realizar a separação dos picos sobrepostos, alterou-se a seletividade da fase móvel, procurando manter a polaridade da mesma. Tal ajuste foi realizado na FM4, na qual se diminuiu, de forma acentuada, o percentual de ACN e foi aumentando o percentual de metanol. O fluxo foi alterado de 0,8 para 1 mL/min. Com isso, foi possível obter um aumento da seletividade na fase móvel, permitindo uma eluição eficiente e separação da prednisolona (Figura 13).



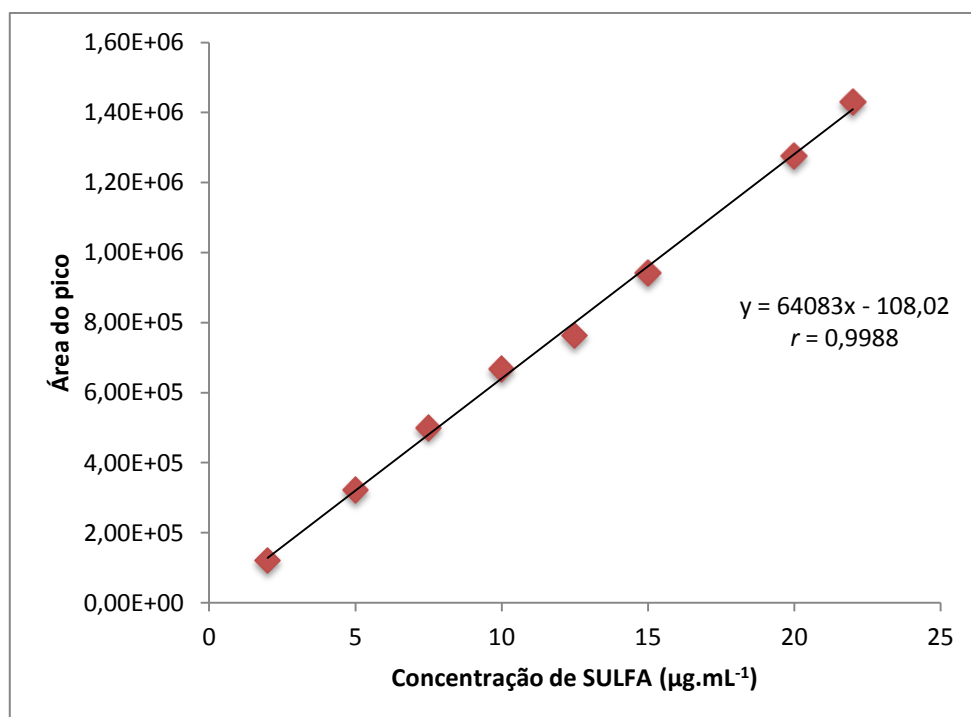
**Figura 13:** Cromatograma obtido utilizando-se a fase móvel 4 (FM4)

#### 4.1.4.2 LINEARIDADE

No estudo de linearidade confeccionou-se o gráfico de correlação entre a área do pico cromatográfico e as concentrações dos disruptores endócrinos (Figura 14, Figura 15, Figura 16 e Figura 17).

Para cada composto obteve-se a equação da reta e o respectivo coeficiente de correlação linear ( $r$ ) (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13).

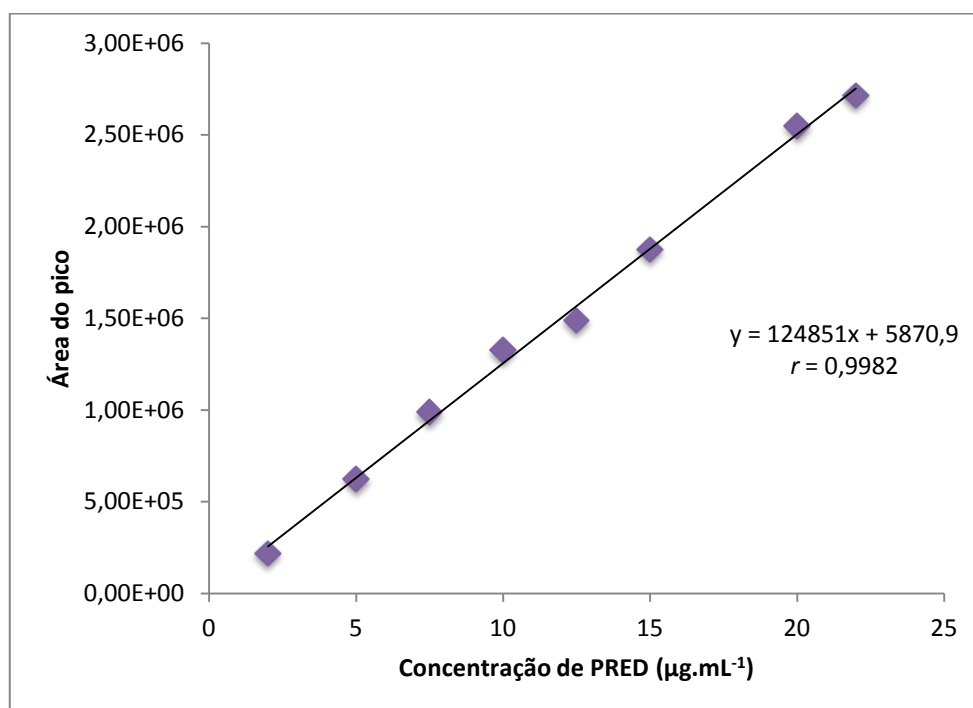
A análise desses dados permite inferir que os requisitos de linearidade exigidos pela ANVISA e INMETRO foram atendidos, já que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003a), e para todos os compostos estudados o coeficiente de correlação obtido foi superior a 0,99.



**Figura 14:** Curva resposta relacionando a área do pico de Sulfametoxazol (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).

**Tabela 10:** Concentrações de Sulfametoxazol (µg.mL<sup>-1</sup>) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).

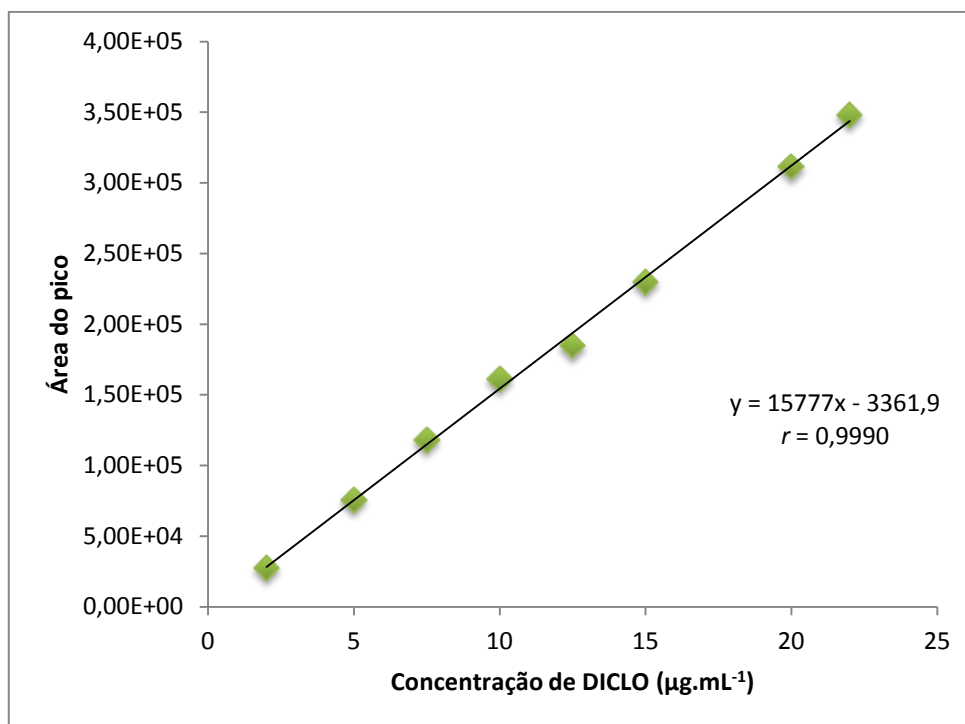
Concentração de SULFA (µg.mL <sup>-1</sup> )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação ( $r$ )
2	4,7903	$y = 64083x - 108,02$	$r = 0,9988$
5	4,7740		
7,5	4,7700		
10	4,7633		
12,5	4,7603		
15	4,7513		
20	4,7447		
22	4,7403		



**Figura 15:** Curva resposta relacionando a área do pico de Prednisolona (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).

**Tabela 11:** Concentrações de Prednisolona (µg.mL<sup>-1</sup>) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r).

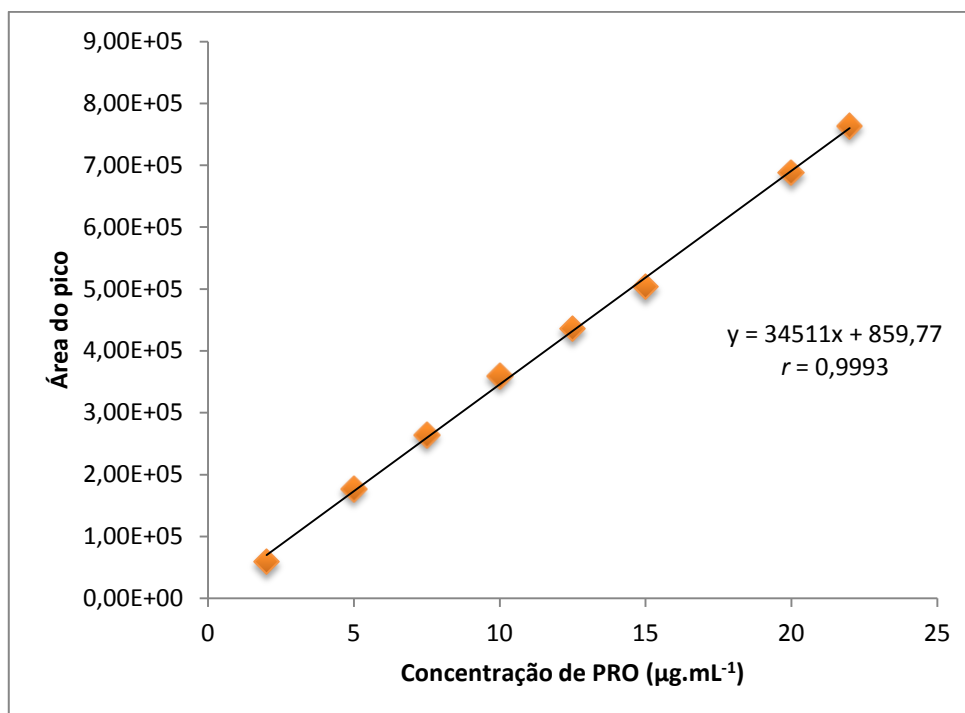
Concentração de PRED (µg.mL <sup>-1</sup> )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r)
2	218180,07	$y = 124851x + 5870,9$	$r = 0,9982$
5	622921,30		
7,5	988097,47		
10	1328199,00		
12,5	1487403,43		
15	1875826,40		
20	2548323,40		
22	2713998,20		



**Figura 16:** Curva resposta relacionando a área do pico de Diclofenaco de Sódio (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).

**Tabela 12:** Concentrações de Diclofenaco de Sódio ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).

Concentração de DICLO ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação ( $r$ )
2	27573,37	$y = 15777x - 3361,9$	$r = 0,9990$
5	75665,57		
7,5	117876,43		
10	161152,70		
12,5	184699,63		
15	229746,50		
20	311481,03		
22	347952,87		



**Figura 17:** Curva resposta relacionando a área do pico de Progesterona (eixo y) com as suas respectivas concentrações (eixo x).

**Tabela 13:** Concentrações de Progesterona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).

Concentração de PRO ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação ( $r$ )
2	59887,13	$y = 34511x + 859,77$	$r = 0,9993$
5	176369,70		
7,5	264164,90		
10	359157,57		
12,5	436070,27		
15	503717,67		
20	688036,97		
22	763512,67		

#### 4.1.4.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Foram determinados os limites de detecção e de quantificação para esse método, de modo a estabelecer o intervalo de trabalho ou quantificação do método.

Os limites de detecção e quantificação de todos os fármacos e disruptores endócrinos analisados são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14:** Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

COMPOSTO	LD ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
SULFA	<b>0,100</b>	<b>0,334</b>
PRED	<b>0,330</b>	<b>1,100</b>
DICLO	<b>0,333</b>	<b>1,110</b>
PRO	<b>0,257</b>	<b>0,857</b>

#### 4.1.4.4 FATOR DE RECUPERAÇÃO

A Tabela 15 apresenta a porcentagem de recuperação obtida em todas as concentrações analisadas, conforme a faixa de estudo.

#### 4.1.4.5 PRECISÃO

A precisão intermediária foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER apud RIBANI, 2004).

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003b).

Os valores encontrados para precisão intermediária estão demonstrados na Tabela 15.

Por meio da análise dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método desenvolvido atende aos requisitos de validação do método exigidos pela ANVISA quanto ao parâmetro precisão intermediária, já que os valores encontrados foram inferiores a 5%.

Tabela 15: Precisão e recuperação da curva padrão de 4 drogas em amostras de urina humana

Composto	Concentração adicionada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração encontrada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	D.P. <sup>1</sup>	C.V. (%)	Recuperação (%)	D.P. <sup>2</sup>
SULFA	2	1,884	0,043	2,30	94,19	2,166
	5	5,041	0,058	1,15	100,83	1,159
	7,5	7,808	0,028	0,36	104,10	0,374
	10	10,415	0,074	0,71	104,15	0,745
	12,5	11,922	0,192	1,61	95,38	1,533
	15	14,689	0,237	1,61	97,93	1,580
	20	19,917	0,285	1,43	99,58	1,427
	22	22,323	0,236	1,06	101,47	1,075
PRED	2	1,697	0,170	10,04	84,87	8,523
	5	4,939	0,155	3,14	98,78	3,097
	7,5	7,871	0,150	1,91	104,94	2,003
	10	10,597	0,243	2,29	105,97	2,432
	12,5	11,861	0,219	1,85	94,89	1,755
	15	14,982	0,188	1,26	99,88	1,255
	20	20,375	0,485	2,38	101,87	2,423
	22	21,678	0,566	2,61	98,54	2,574
DICLO	2	1,961	0,009	0,45	98,04	0,445
	5	5,009	0,039	0,79	100,18	0,790
	7,5	7,684	0,048	0,63	102,46	0,645
	10	10,427	0,055	0,52	104,27	0,546
	12,5	11,921	0,151	1,27	95,37	1,210
	15	14,775	0,067	0,45	98,50	0,447
	20	19,956	0,109	0,55	99,78	0,545
	22	22,267	0,131	0,59	101,22	0,597
PRO	2	1,711	0,180	10,50	85,56	8,982
	5	5,094	0,527	10,34	101,87	10,534
	7,5	7,631	0,161	2,11	101,75	2,152
	10	10,386	0,298	2,87	103,86	2,985
	12,5	12,582	1,880	14,94	100,66	15,042
	15	14,578	0,424	2,91	97,18	2,829
	20	19,915	0,433	2,18	99,58	2,167
	22	22,103	0,302	1,37	100,47	1,372

<sup>1</sup> Desvio-padrão das concentrações encontradas

<sup>2</sup> Desvio-padrão relativo dos valores encontrados na recuperação

#### 4.1.5 CONCLUSÃO

Conclui-se, que a fase móvel (FM) contendo menor concentração de acetonitrila (ACN) e fluxo de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , ou seja, a fase móvel 4 (FM4), proporcionou a melhor eluição, com o mínimo de dispersão do analito. Essa fase móvel apresentou a força cromatográfica e a seletividade adequadas para a separação dos fármacos e disruptores endócrinos estudados.

Pode-se concluir, também, que um método sensível, seletivo e reprodutível para CLAE em fase reversa foi desenvolvido para determinação desses fármacos de diferentes grupos na urina humana durante o período de estocagem.

As curvas de calibração apresentam resposta linear em toda faixa de concentração utilizada no estudo, ficando de acordo com as normas exigidas pela ANVISA e INMETRO.

Conclui-se que o método desenvolvido nesse estudo mostrou-se aceitável para a análise de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana, para os valores de pH entre 2 e 3.

#### 4.1.6 REFERÊNCIAS

BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. **Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method.** *Analytica Chimica Acta* 570 (2006) 46–58, 2006.

BRASIL (2003a). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL (2003b). INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008, orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** 36p.

COELHO, A. L. **Desenvolvimento de procedimento de derivatização fotoquímica para dois glicocorticóides sintéticos (prednisolona e triancinolona acetato) visando à análise espectrofluorimétrica de formulações farmacêuticas.** Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L.; BONATO, P. L. **Fundamentos da Cromatografia.** Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006.

CUNHA, L. C.; RAMALHO, P. I. S.; REZENDE, K. R.; MARINHO, H. C.; OLIVEIRA, E. C.; SILVA, N. A. **Validação analítica em clae-uv para monitoração plasmática da metilprednisolona e do succinato de metilprednisolona.** *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol 1 (1), 23-34, 2004.

GOODMAN, Alfred. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

HELLSTRÖM, D.; JOHANSSON, E.; GRENNBERG, K. **Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea.** *Ecological Engineering* 12 (1999) 253–269, 1999.

ISO - International Organization for Standardization. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.** Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. ISO 5735-3, 1994.

LANÇAS, F. M.. (2004b). **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos, SP: RiMa, 2004. 46 p.



- LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas: SP, 2008. Átomo, 357 p.
- MARTINS, C. F. **Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.
- RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner, **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, SP, 2007.
- RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Quím. Nova. vol. 27, n.5, p. 771-780, 2004.
- SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.; CUNHA, A. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC**. Revista de ciências ambientais, v.1, n.2, p.19 a 34. Canoas, RS, 2007.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de Análisis Instrumental**. 5.ed. España: Concepción Fernandez Madrid, 2001.
- WINKER, M.; GULYAS, H.; OTTERPOHL, R. **Fertilization of rye grass with carbamazepine, ibuprofen, and 17 $\alpha$ - ethinylestradiol spiked urine – a greenhouse experiment**. 3rd SWITCH Scientific Meeting, Brasil, 2008.

## 4.2 Artigo 2

---

**Comportamento dos fármacos e dos disruptores endócrinos durante a estocagem com e sem acidificação da urina humana: influência da temperatura, do pH da solução e perfil da concentração dos mesmos durante o tratamento**

Julia Magalhães Brum Campos, Priscilla Garozi Zancheta, Ricardo Franci Gonçalves

### 4.2.1 INTRODUÇÃO

A urina é a fração que contém a maior parte de nutrientes do esgoto sanitário, aproximadamente 80% de nitrogênio, 55% de fósforo e 60% de potássio. Esses nutrientes podem se tornar disponíveis para recuperação e reutilização. Diferentes técnicas têm sido estudadas para remover e recuperar os nutrientes da urina, focando principalmente em nitrogênio e fósforo (MAURER *et al.*, 2006; UDERT *et al.*, 2003; PRONK *et al.*, 2006; WILSENACH E LOOSDRECHT, 2006). Os principais processos de tratamento da urina, objetivando-se sua reciclagem na agricultura, são a estocagem, a concentração e a precipitação de cristais. Dentre estes, a prática mais comum é a estocagem da urina, necessária para reduzir os riscos biológicos da sua utilização na agricultura.

A estocagem é um processo convencional de armazenamento da urina para torná-la estéril e estabilizada físico-química e biologicamente, além de possibilitar a precipitação de cristais. No entanto, é necessário um período mínimo de seis meses de estocagem em reservatórios escuros e fechados, com o intuito de que a urina humana possa ser utilizada com segurança, minimizando assim, o risco de transmissão de doenças infecciosas (ZANCHETA, 2007).

Durante o processo de estocagem ocorre hidrólise da uréia, que é catalisada pela enzima urease (ALEXANDER, 1977), sendo que nesse processo de hidrólise o pH aumenta, amônia e íons bicarbonato são produzidos.

A urina contém também, substâncias que não são desejáveis na agricultura. Ela é uma importante via de excreção de muitos hormônios e fármacos, substâncias que podem funcionar como disruptores endócrinos. Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas necessárias para servir a um propósito terapêutico. Porém, segundo Mulroy (2001), 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretada inalterada e persistindo no meio ambiente e pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio ambiente.

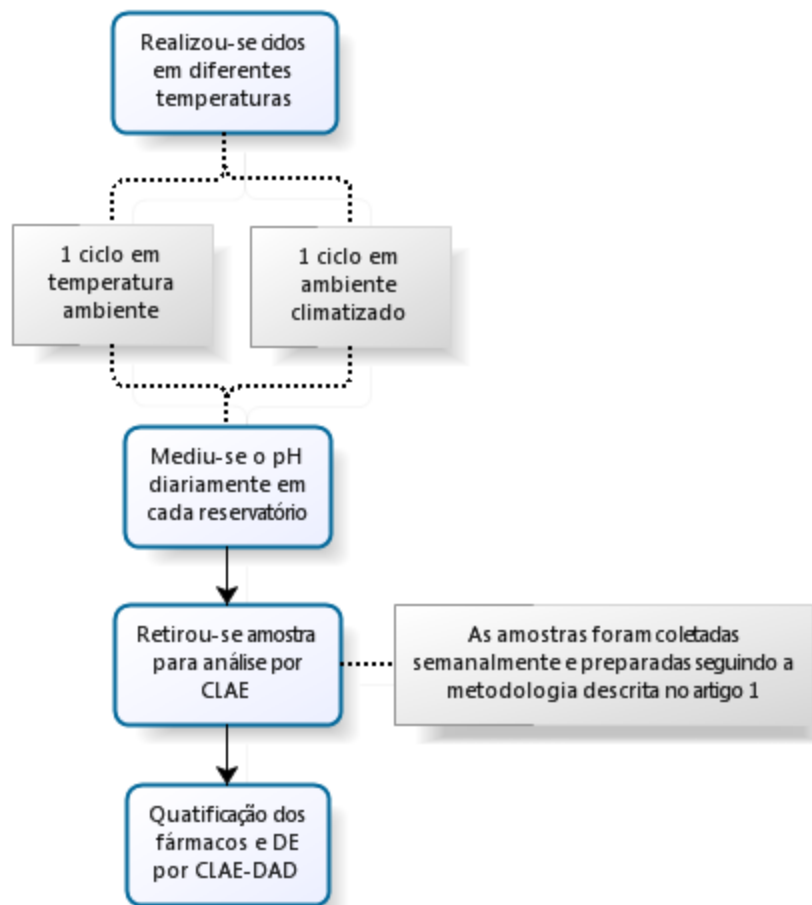
Para tanto, é necessário a verificação das possíveis interferências na concentração de fármacos e disruptores endócrinos durante o processo de estocagem, realizando-se a quantificação dos mesmos, com vistas ao uso da urina humana como fertilizante agrícola com maior segurança.

## 4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Todas as análises laboratoriais necessárias à realização desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Saneamento, LABSAN, da Universidade Federal do Espírito Santo.

A Figura 18 apresenta, de maneira resumida, os procedimentos adotados na metodologia desse trabalho.



**Figura 18:** Fluxograma simplificado da metodologia utilizada

### 4.2.2.2 DADOS DE pH

O pH foi medido diariamente em cada reservatório (Figura 19).

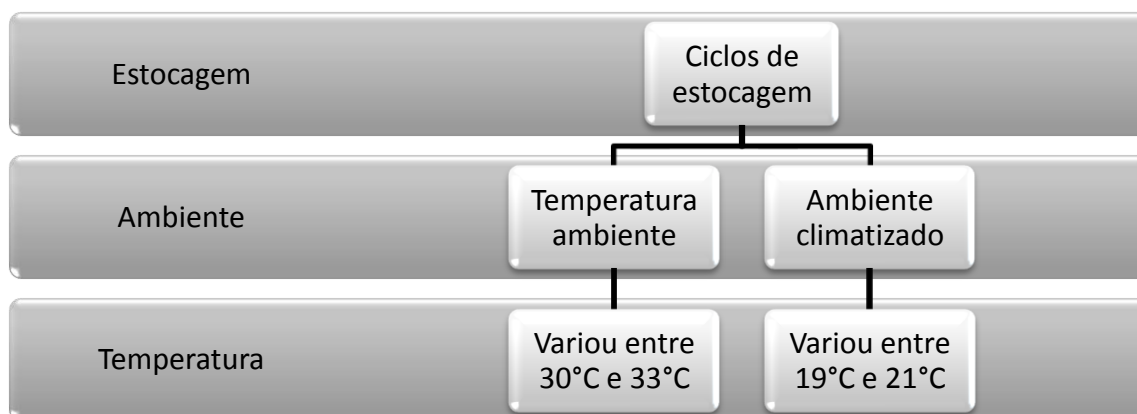
Utilizou-se um medidor de pH portátil, calibrado diariamente, para a realização das análises. A finalidade foi verificar a variação de pH durante todo o período de estocagem da urina humana, já que o valor de pH interfere diretamente na hidrólise da uréia presente na urina.



**Figura 19:** Esquema dos reservatórios nos ensaios

#### 4.2.2.3 CICLOS EM AMBIENTE CLIMATIZADO E TEMPERATURA AMBIENTE

Os ciclos foram realizados, alternadamente, em temperatura ambiente, aproximadamente 30°C, e em ambiente climatizado, cuja temperatura variou entre 19°C e 21°C (Figura 20).



**Figura 20:** Características da temperatura de alocação dos recipientes de estocagem

Para cada ciclo o procedimento experimental utilizado foi o mesmo, como descrito anteriormente, variando apenas a temperatura do ambiente. Isso foi realizado com a finalidade de se verificar a possível influência dessa variação de temperatura no perfil cromatográfico dos fármacos e disruptores endócrinos utilizados durante o período de estocagem da urina humana.

#### 4.2.2.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM NA URINA ACIDIFICADA E NÃO ACIDIFICADA

O perfil cromatográfico dos fármacos e disruptores endócrinos durante o período de estocagem foi monitorado por análises em CLAE-DAD em fase reversa, realizadas semanalmente durante todo o ciclo, segundo a metodologia descrita no artigo 1.

#### 4.2.2.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDÓCRINOS NA URINA HUMANA ACIDIFICADA

A quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos foi realizada nos experimentos acidificados durante dois ciclos de estocagem.

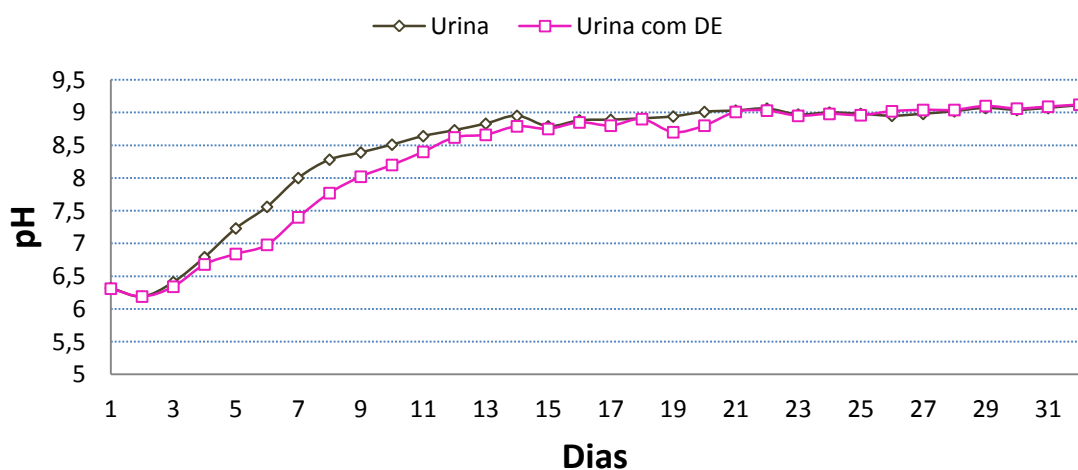
As amostras foram coletadas semanalmente e utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação dos compostos estudados.

A preparação das amostras e a metodologia utilizada nas análises cromatográficas estão descritas detalhadamente no artigo 1.

### 4.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

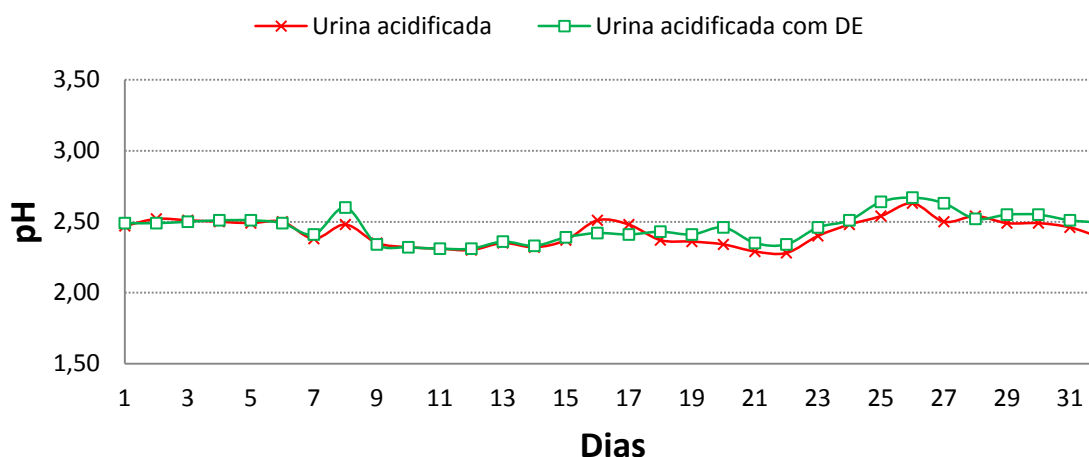
#### 4.2.3.1 DADOS pH DO 1º CICLO

A variação de pH obtida na urina humana e urina humana com fármacos e disruptores endócrinos está apresentada na Figura 21.



**Figura 21:** Variação de pH na urina humana e urina humana com disruptores endócrinos no 1º ciclo

A Figura 22 apresenta o pH obtido nas análises diárias das amostras de urina humana acidificada e urina humana acidificada acrescida de fármacos e disruptores endócrinos.



**Figura 22:** Variação de pH na urina humana acidificada e urina humana acidificada e com disruptores endócrinos no 1º ciclo

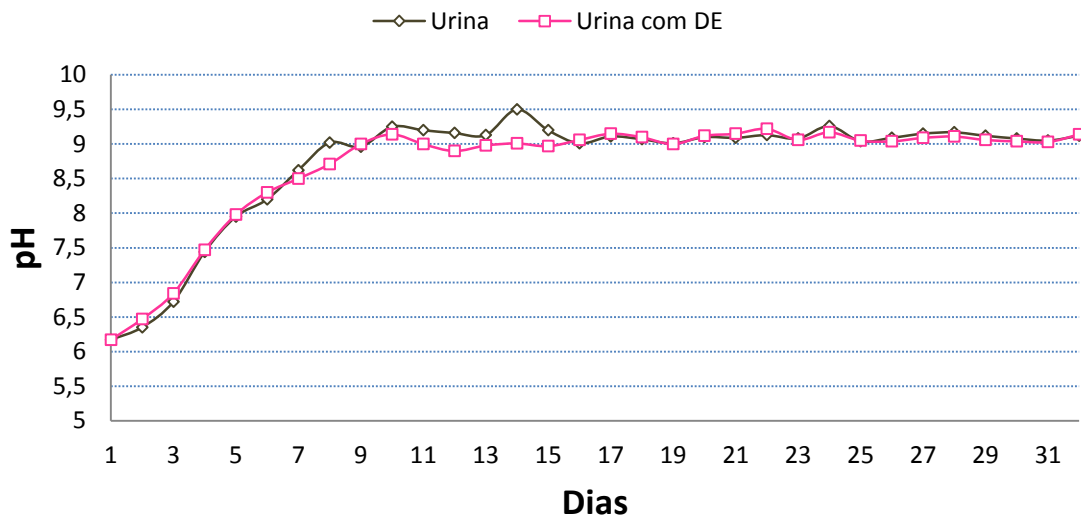
Nos reservatórios nos quais não foi realizada a acidificação, o pH manteve-se numa faixa entre 6,0 e 9,0. Esse aumento no valor do pH dos reservatórios sem acidificação deve-se, provavelmente, à hidrólise de uréia, já que essa reação de decomposição da uréia proporciona um aumento na concentração de nitrogênio amoniacal e conseqüente aumento de pH (HELLSTRÖM, 1999).

Já nos reservatórios com urina acidificada o pH foi mantido estável durante todo o período de estocagem, não havendo variação significativa de pH do início ao fim do ciclo, mantendo-se em valores entre 2,3 e 2,5.

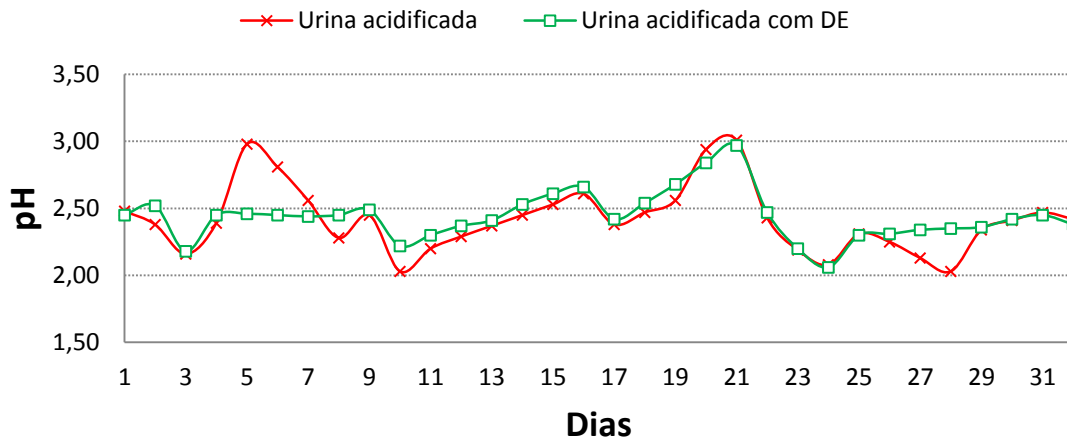
Esse valor inicial de pH foi obtido pela adição de aproximadamente 8 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada reservatório, o que demonstra que esse volume de ácido utilizado é suficiente para manter o valor de pH estável para o volume de urina armazenado durante o período de estocagem adotado.

#### 4.2.3.2 DADOS pH DO 2º CICLO

Os valores diários de pH do 2º ciclo de estocagem, verificados nos quatro reservatórios utilizados no experimento estão apresentados nas Figura 23 e Figura 24. A Figura 23 mostra os valores de pH na urina sem acidificação e a Figura 24 os valores de pH encontrados para a urina acidificada.



**Figura 23:** Variação de pH na urina humana e urina humana com disruptores endócrinos no 2º ciclo



**Figura 24:** Variação de pH na urina humana acidificada e urina humana acidificada e com disruptores endócrinos no 2º ciclo

Nos reservatórios com urina humana não acidificada o pH elevou-se de 6,0 para 9,0 durante o período de tratamento.

Já nos reservatórios com urina acidificada o pH manteve-se entre 2,3 e 3,0 durante todo o período de estocagem. Isso sugere que esse pH é suficiente para inativar ou impedir a atividade da enzima urease durante o período de tratamento e condições de estocagem adotados para o experimento, evitando assim, a hidrólise da uréia.

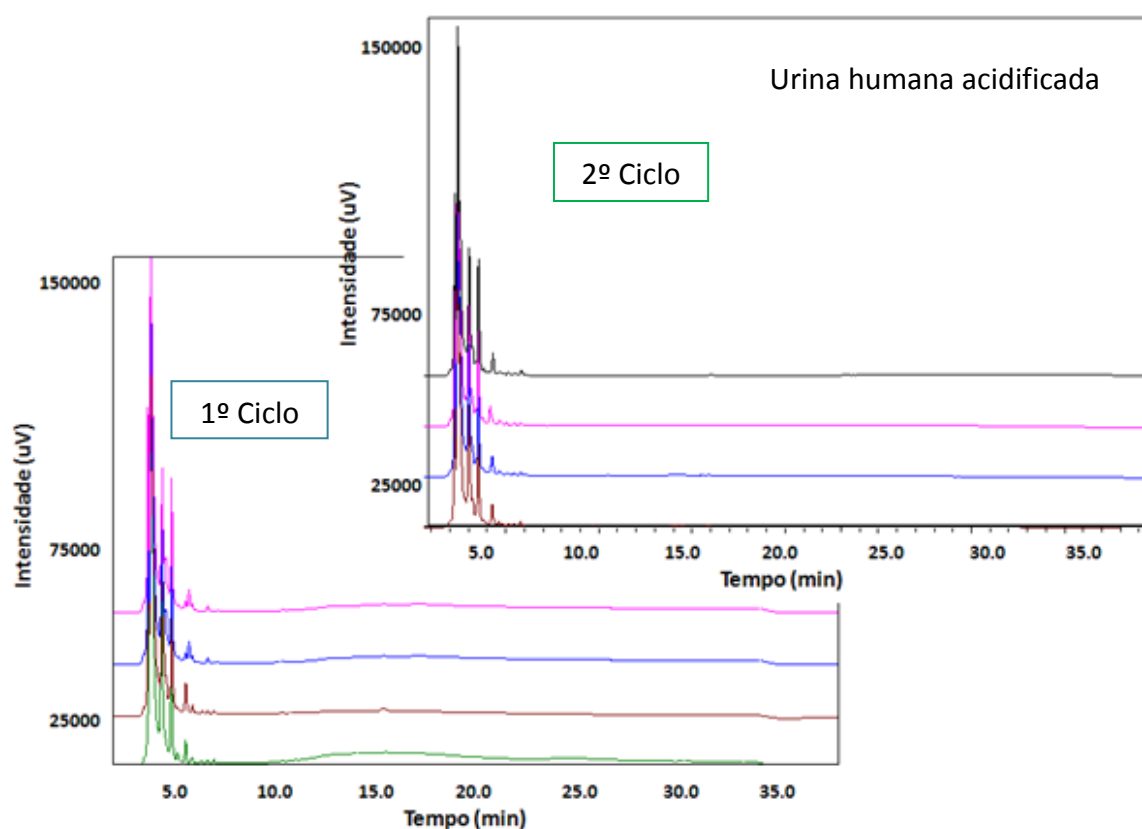
Em ambos os ciclos o comportamento do pH nos reservatórios com urina acidificada foi semelhante, não havendo variações significativas, podendo-se afirmar que o volume utilizado de ácido sulfúrico concentrado, cerca de 8 mL, é suficiente para que o pH mantenha-se dentro da faixa desejável, evitando-se a hidrólise de uréia.



#### 4.2.3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Para a variação de temperatura utilizada, 19° a 21°C (no ambiente climatizado) e 30° a 33°C (temperatura ambiente), não houve diferenças significativas no perfil cromatográfico dos fármacos e disruptores endócrinos durante o período de estocagem, sendo que o perfil cromatográfico em ambas as temperaturas foi muito semelhante.

A Figura 25 mostra a similaridade dos cromatogramas obtidos nas análises das amostras de urina humana acidificada, estocadas sob diferentes temperaturas. O 1º ciclo (demonstrado na parte inferior da Figura 25) foi realizado em temperatura ambiente. Já o 2º ciclo (apresentado na parte superior da Figura 25) foi realizado em ambiente climatizado. Cada cor refere-se ao cromatograma obtido para cada semana do ciclo. A semelhança verificada nos cromatogramas comprova que essa variação de temperatura não foi suficiente para causar alteração no perfil cromatográfico das amostras analisadas.



**Figura 25:** Perfil cromatográfico da urina humana acidificada no 1º e 2º ciclos de estocagem, sob diferentes temperaturas

#### 4.2.3.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA URINA SEM ACIDIFICAÇÃO

##### 4.2.3.4.1 Perfil cromatográfico das amostras do 1º Ciclo

Os cromatogramas obtidos nas análises das amostras de urina humana e urina humana com fármacos e disruptores endócrinos, coletadas durante o 1º ciclo de estocagem, estão demonstrados nas Figura 26 e Figura 27. Na Figura 26 têm-se os cromatogramas das amostras de urina humana e a Figura 27 apresenta os cromatogramas das amostras de urina humana com fármacos e disruptores endócrinos.

As partes em destaque nas figuras exibem a mudança ocorrida, ao longo do tratamento, nos cromatogramas das amostras de urina não acidificada, apresentando as variações no tempo de retenção de substâncias detectadas na 1ª semana, surgimento de novos picos ou desaparecimento de picos registrados inicialmente.

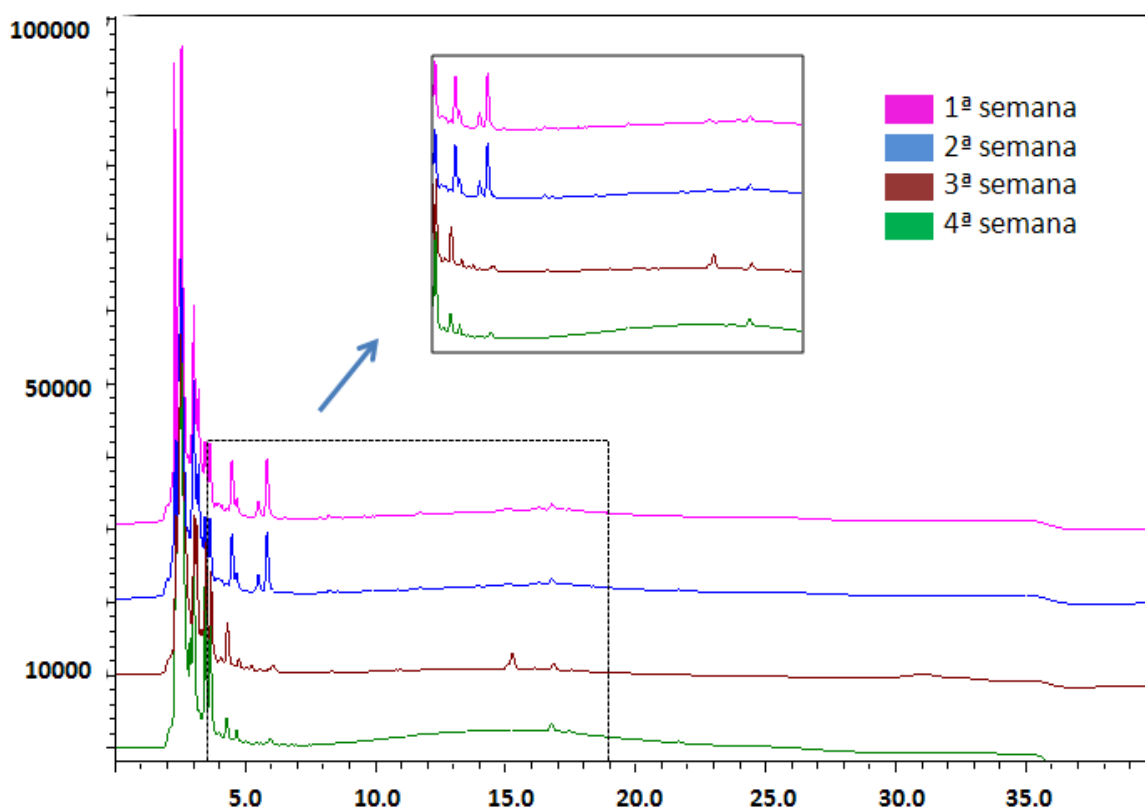
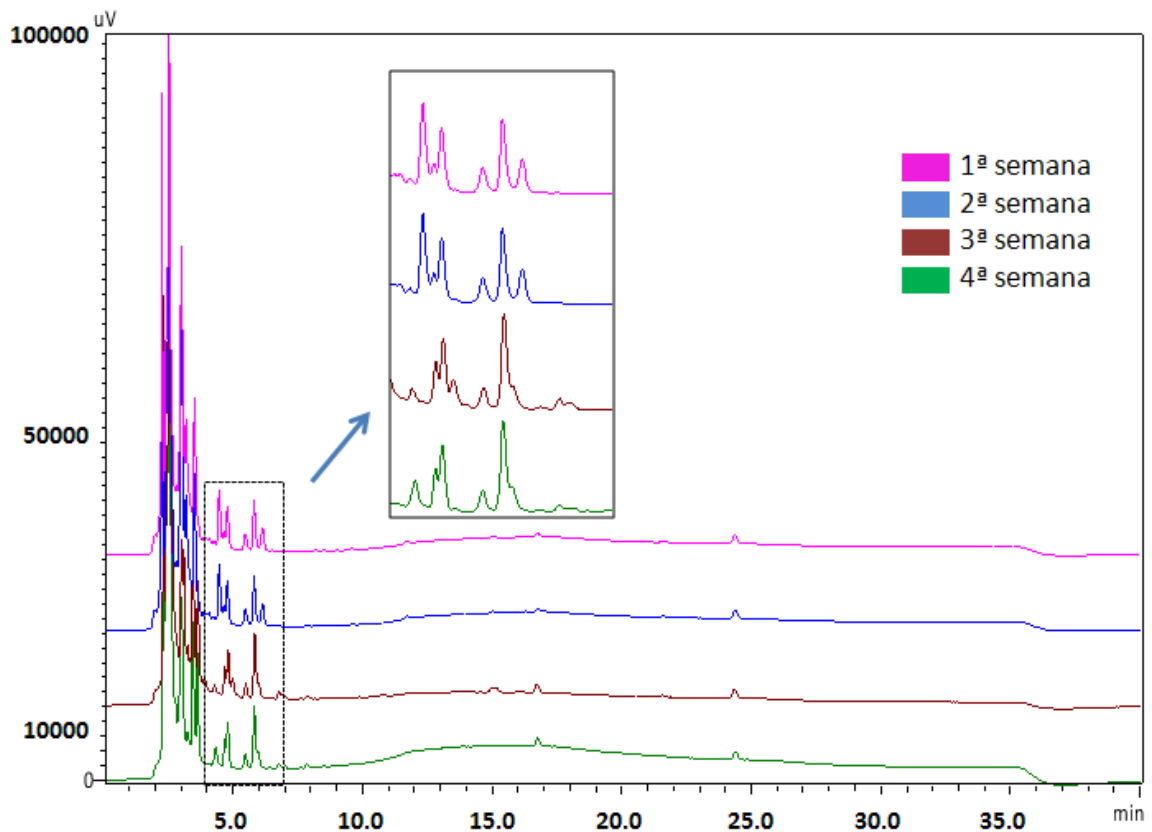


Figura 26: Cromatogramas das amostras de urina humana do 1º ciclo



**Figura 27:** Cromatogramas das amostras de urina humana com fármacos e disruptores do 1º ciclo

Por meio da análise desses cromatogramas, observou-se que houve alterações no perfil cromatográfico das amostras de urina humana não acidificada analisadas durante a estocagem e, com a observância dessas alterações, não foi possível a identificação dos compostos estudados durante todo período de estocagem e, conseqüentemente, a quantificação dos mesmos.

Essas alterações devem-se, provavelmente, à seletividade da fase móvel e à variação do pH da urina durante o ciclo, pois sabe-se que o ajuste de pH pode ser utilizado para controle de seletividade e, uma significativa alteração no mesmo, pode resultar em cromatogramas drasticamente diferentes.

Logo, o aumento do pH ocorrido durante o ciclo pode ter gerado efeitos sobre a seletividade, fator de capacidade (fator de retenção), a forma do pico, resolução e reprodutibilidade.

Desse modo não foi possível a quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos na urina humana sem acidificação, já que o perfil cromatográfico das amostras variou durante o período de estocagem.

#### 4.2.3.4.2 Perfil cromatográfico das amostras do 2º Ciclo

As Figura 28 e Figura 29 mostram os cromatogramas obtidos das análises das amostras de urina humana e urina humana com fármacos e disruptores endócrinos respectivamente, coletadas durante o 2º ciclo de estocagem.

As partes em destaque nas figuras mostram a mudança ocorrida nos cromatogramas das amostras analisadas.

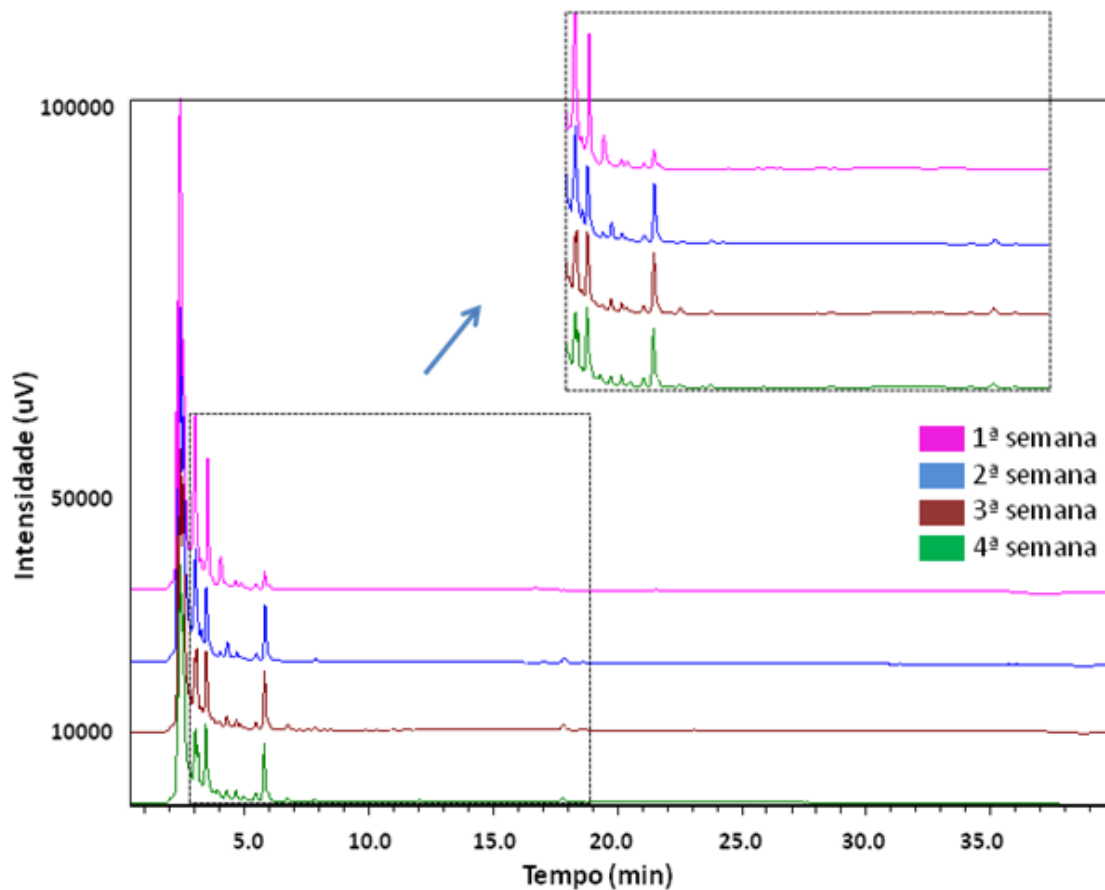
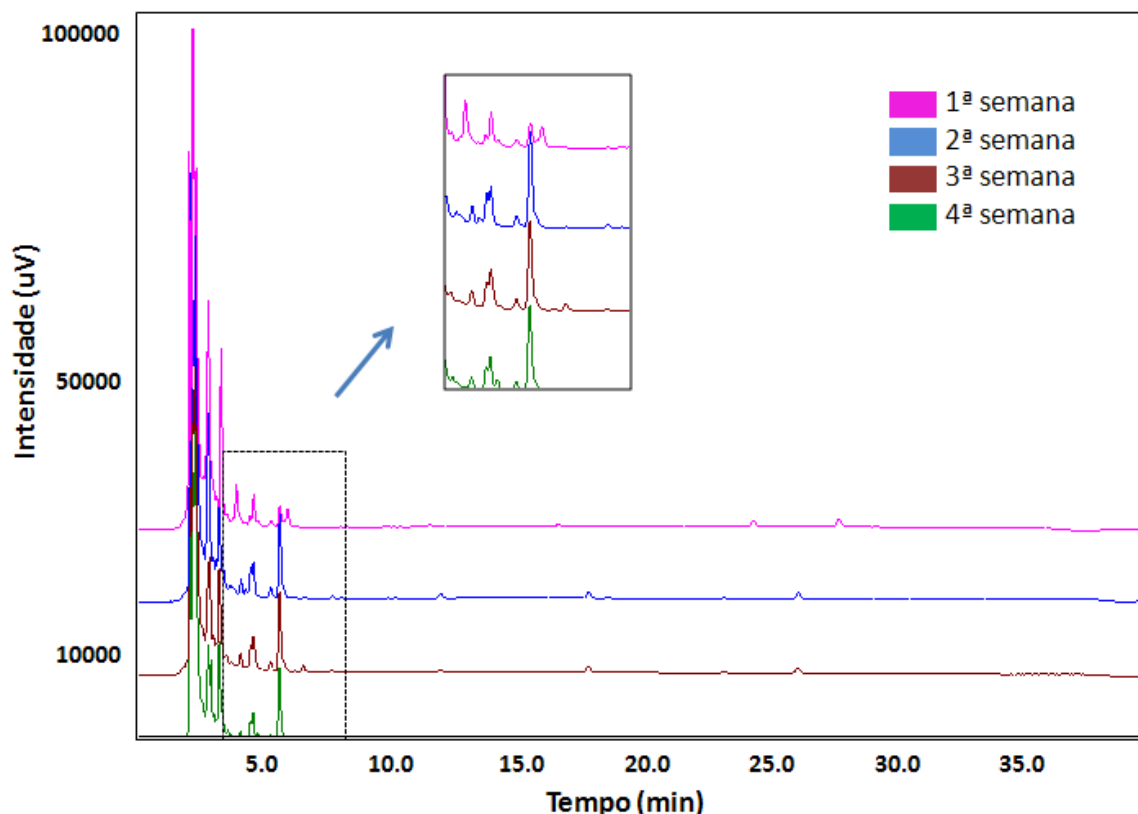


Figura 28: Cromatogramas das amostras de urina humana do 2º ciclo



**Figura 29:** Cromatogramas das amostras de urina humana com fármacos e disruptores do 2º ciclo

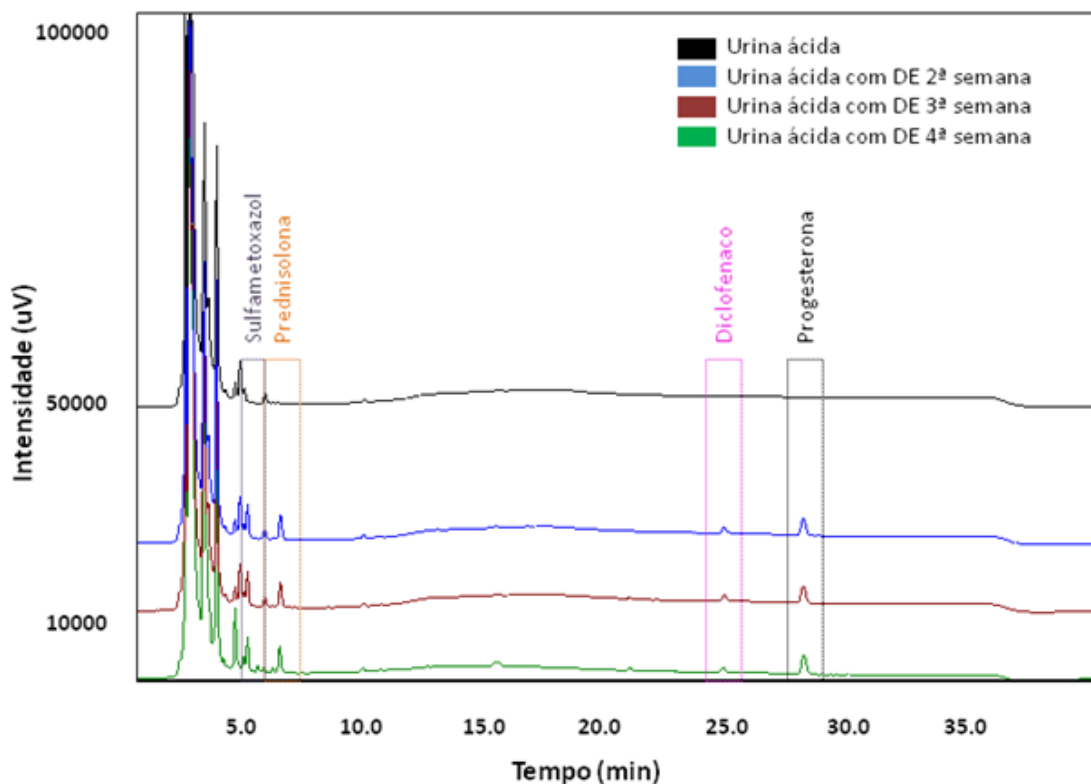
Por meio da análise desses cromatogramas, observou-se que houve alterações nos cromatogramas das amostras de urina humana não acidificada analisadas durante a estocagem, assim como foi verificado no 1º ciclo de estocagem.

Como discutido anteriormente, a variação no perfil cromatográfico apresentada nas Figura 28 e Figura 29 deve-se, provavelmente, à seletividade da fase móvel e variação do pH da urina, já que uma significativa alteração no pH pode resultar em cromatogramas drasticamente diferentes. Logo, o aumento do pH ocorrido durante o ciclo pode ter causado tal variação sobre o perfil cromatográfico, por meio de efeitos sobre a seletividade, fator de capacidade (fator de retenção), a forma do pico, resolução e reprodutibilidade.

Portanto, com essas alterações nos tempos de retenção não foi possível a identificação, nos cromatogramas, dos compostos estudados e, por conseguinte, não se realizou a quantificação dos mesmos nas semanas analisadas.

#### 4.2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS E DISRUPTORES ENDOCRINOS ESTUDADOS

Os compostos quantificados e seus respectivos perfis cromatográficos estão em destaque na Figura 30.



**Figura 30:** Compostos quantificados nas amostras de urina acidificada

A Figura 30 mostra os compostos detectados na urina humana acidificada, sendo a ordem de eluição a seguinte: sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona.

Os tempos médios de retenção de cada composto detectado encontram-se dispostos na Tabela 16.

**Tabela 16:** Tempo médio de retenção dos compostos detectados na urina humana acidificada

	Sulfametoxazol	Prednisolona	Diclofenaco de Sódio	Progesterona
Tempo de retenção (min)	4,770	6,093	24,218	27,497

#### 4.2.3.5.1 Quantificação de sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona na urina humana acidificada ao longo do 1º ciclo de estocagem

Os cromatogramas obtidos ao longo do 1º ciclo de estocagem, provenientes da análise da urina humana acidificada, com os perfis cromatográficos dos compostos estudados e seus respectivos tempos de retenção, estão apresentados na Figura 31.

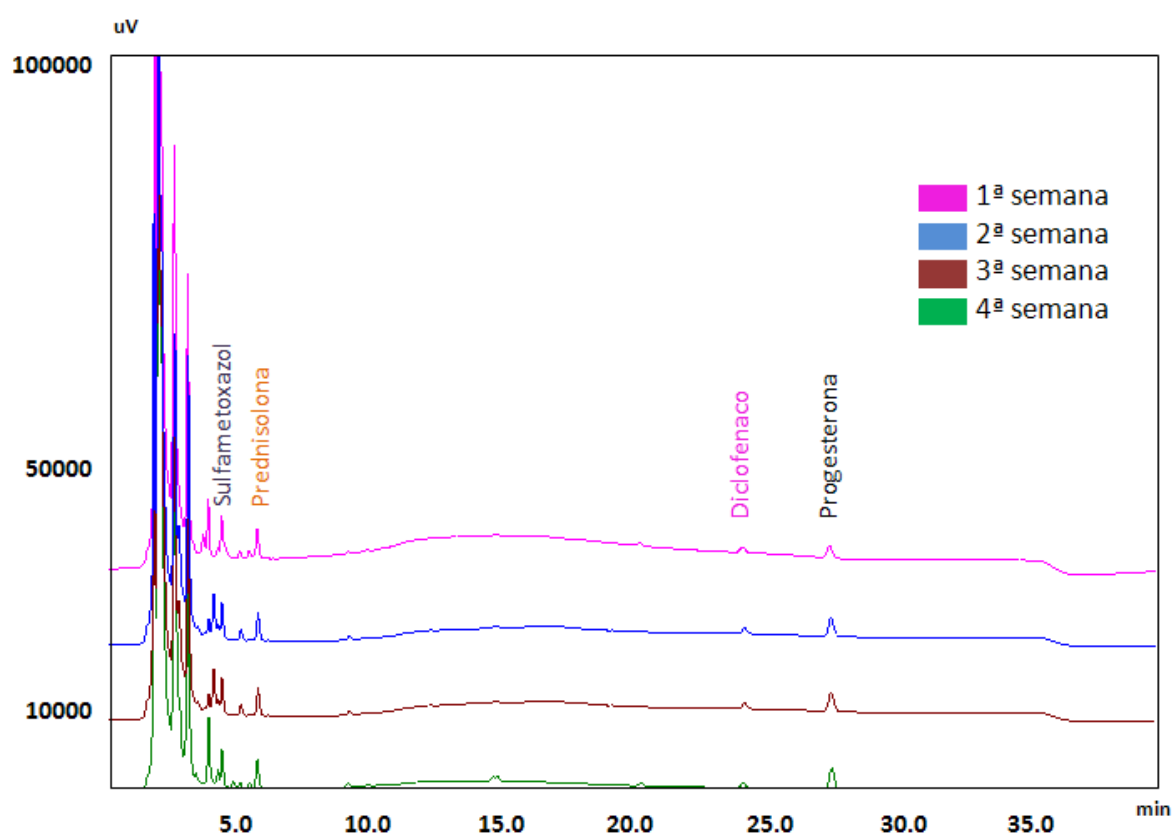


Figura 31: Cromatograma da urina humana acidificada com fármacos e disruptores do 1º ciclo

Os dados obtidos na quantificação dos compostos analisados nessa pesquisa, incluindo-se o tempo de retenção, área, peso e concentração, para cada semana analisada, estão demonstrados na Tabela 17.

**Tabela 17:** Quantificação sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona no 1º ciclo de estocagem

<b>SULFA</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	4,755	22621	4180	3,55E-01
	2ª Semana	4,778	24524	4532	3,85E-01
	3ª Semana	4,783	23256	4381	3,65E-01
	4ª Semana	4,783	23575	4441	3,70E-01
<b>Média</b>		4,77	23494	4383	3,69E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,280	3,375	3,401	3,374
<b>D.P.</b>		0,013	792,920	149,078	0,012
<b>PRED</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	6,039	30435	3872	1,97E-01
	2ª Semana	6,098	30763	3914	1,99E-01
	3ª Semana	6,103	31105	3914	2,02E-01
	4ª Semana	6,131	30688	3816	1,99E-01
<b>Média</b>		6,093	30747,750	3878,932	1,99E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,635	0,899	1,195	1,032
<b>D.P.</b>		0,039	276,431	46,365	0,002
<b>DICLO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	24,102	7474	682	6,87E-01
	2ª Semana	24,249	7683	701	7,06E-01
	3ª Semana	24,268	8228	741	7,35E-01
	4ª Semana	24,254	7022	628	6,58E-01
<b>Média</b>		24,218	7601,750	688,018	6,97E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,322	6,583	6,825	4,651
<b>D.P.</b>		0,078	500,407	46,960	0,032
<b>PRO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	27,2650	19576	1482	5,42E-01
	2ª Semana	27,5780	22765	1723	6,30E-01
	3ª Semana	27,6040	24135	1762	6,74E-01
	4ª Semana	27,5420	23918	1738	6,68E-01
<b>Média</b>		27,497	22598,500	1676,356	27,497
<b>C.V. (%)</b>		0,571	9,305	7,787	9,684
<b>D.P.</b>		0,157	2.102,787	130,543	0,061

Os dados resultantes da quantificação da SULFA, PRED, DICLO e PRO, adicionados aos reservatórios de estocagem, demonstram que não houve diminuição na concentração dos



mesmos durante o processo de tratamento da urina humana.

Isso sugere que, sob tais condições de estocagem, no período de 30 dias, os fármacos e disruptores analisados mantiveram-se estáveis, mantendo-se inalterados durante o experimento.

Os dados encontrados são semelhantes aos encontrados por Gajurel *et al.* (2007), que afirmou que usando-se altas concentrações (10 mg/L), os quatro medicamentos investigados (carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, ácido clofíbrico) não são reduzidos durante o armazenamento da urina humana em pH 4, 7 ou 10, independente da temperatura de armazenamento.

#### 4.2.3.5.2 Quantificação de sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona na urina humana acidificada ao longo do 2º ciclo de estocagem

Os cromatogramas obtidos nas análises da urina humana acidificada por CLAE ao longo do 2º ciclo de estocagem, os perfis cromatográficos dos compostos estudados e seus respectivos tempos de retenção estão apresentados na Figura 32.

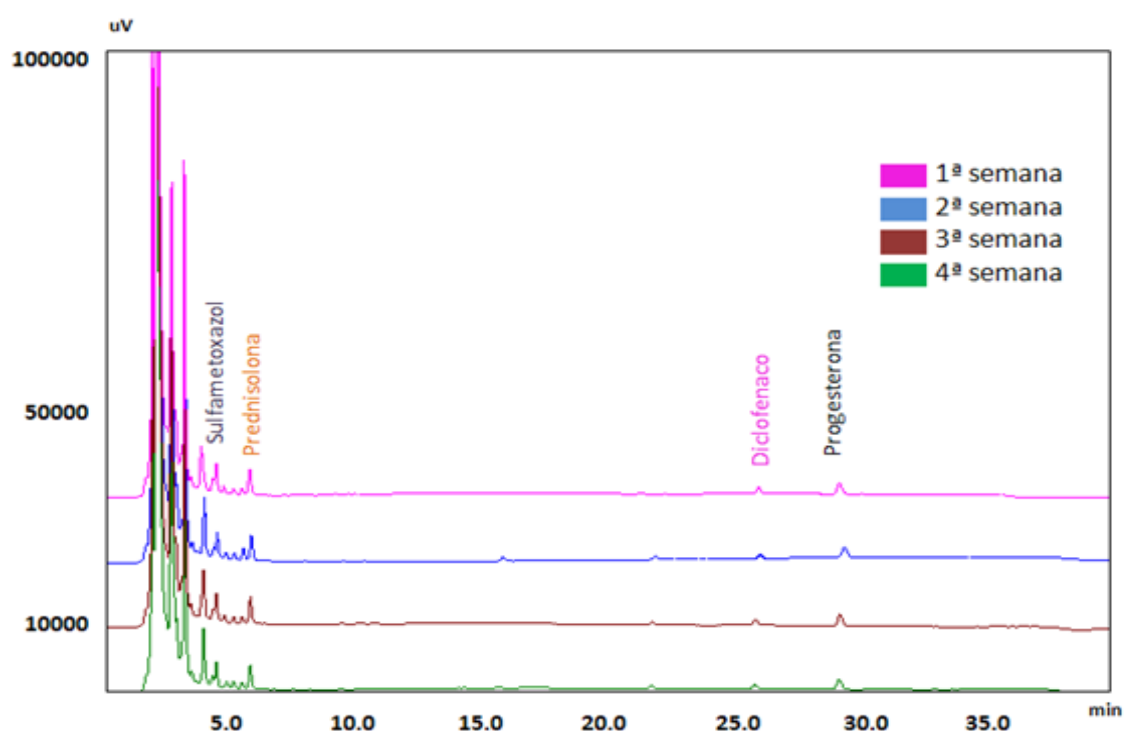


Figura 32: Cromatogramas da urina humana acidificada com fármacos e disruptores do 2º ciclo

A Tabela 18 apresenta os dados obtidos nas análises de quantificação de sulfametoxazol (SULFA), prednisolona (PRED), diclofenaco de sódio (DICLO) e progesterona (PRO), incluindo-se o tempo de retenção, área, peso e concentração, para cada semana analisada durante o 2º ciclo de estocagem.

**Tabela 18:** Quantificação sulfametoxazol, prednisolona, diclofenaco de sódio e progesterona no 2º ciclo de estocagem

<b>SULFA</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	4,759	18919	3628	2,97E-01
	2ª Semana	4,758	19429	3766	3,05E-01
	3ª Semana	4,759	17117	3355	2,69E-01
	4ª Semana	4,761	18451	3536	2,90E-01
<b>Média</b>		4,759	18479,000	3571,250	2,90E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,026	5,368	4,827	5,318
<b>D.P.</b>		0,001	991,956	172,390	0,015
<b>PRED</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	6,077	29699	3880	1,91E-01
	2ª Semana	6,126	29952	3989	1,93E-01
	3ª Semana	6,099	29812	3926	1,92E-01
	4ª Semana	6,112	29162	3963	1,87E-01
<b>Média</b>		6,104	29656,250	3939,500	1,91E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,341	1,165	1,202	1,379
<b>D.P.</b>		0,021	345,368	47,346	0,003
<b>DICLO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	24,114	10603,0	958,0	8,85E-01
	2ª Semana	25,973	10128,7	890,7	8,55E-01
	3ª Semana	25,937	10043,1	889,0	8,50E-01
	4ª Semana	25,970	10043	889	8,50E-01
<b>Média</b>		25,499	10204,450	906,675	8,60E-01
<b>C.V. (%)</b>		3,620	2,634	3,775	1,973
<b>D.P.</b>		0,923	268,750	34,226	0,017
<b>PRO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
	1ª Semana	27,430	22040	1628	6,14E-01
	2ª Semana	29,301	24551	1806	6,86E-01
	3ª Semana	29,262	24164	1799	6,75E-01
	4ª Semana	29,296	23019	1692	6,42E-01
<b>Média</b>		28,822	23443,425	1731,300	6,54E-01
<b>C.V. (%)</b>		3,221	4,861	4,995	5,046
<b>D.P.</b>		0,928	1139,504	86,474	0,033

Analisando-se os dados encontrados em relação à quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos adicionados à urina acidificada, constatou-se que não houve diminuição na concentração dos mesmos durante o processo de tratamento da urina humana por estocagem, como observado também, no 1º ciclo.

Tais resultados sugerem que, sob as condições de estocagem às quais a urina foi submetida, por um período de 30 dias, o sulfametoxazol, a prednisolona, o diclofenaco de sódio e a progesterona mantiveram-se estáveis, permanecendo inalterados durante o experimento.

Os resultados obtidos nessa pesquisa são semelhantes aos resultados obtidos por Gajurel et al. (2007), que afirmaram que, usando-se altas concentrações (10 mg/L), os medicamentos investigados (carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, ácido clofíbrico) não são reduzidos durante o armazenamento da urina humana em pH 4, 7 ou 10, independentemente da temperatura de armazenamento.

Porém, Butzen et al. (2005) encontraram uma eficiente remoção do diclofenaco na urina humana estocada, durante 6 meses, em pH 2, resultados que entram em contradição com os encontrados nessa pesquisa e com os resultados obtidos por Gajurel *et al.* (2007). Isso pode estar relacionado ao tempo de estocagem utilizado pelos mesmos, que foi maior que o tempo de estocagem utilizado nessa pesquisa.

Além disso, erros de análise não podem ser excluídos no estudo de Butzen *et al.* (2005), já que a concentração inicial de diclofenaco de sódio utilizada pelos mesmos (0,1 mg/L) é bem menor que a utilizada nesse trabalho (10 mg/L), ou seja, 0,1 mg/L contra 10 mg/L.

Embora nem todos os fármacos e disruptores endócrinos sejam eliminados com o processo de tratamento por estocagem, como demonstrado pelo presente trabalho, um estudo realizado por Zaitso (2008) mostra que, dentre os vários tipos de drogas e metabólitos excretados na urina, aqueles compostos em cuja composição encontram-se moléculas nitro aromáticas, moléculas com éster, ou metabólitos amino-benzodiazepínicos, foram facilmente decompostos, especialmente as amostras com elevada contaminação bacteriana.

#### **4.2.4 CONCLUSÃO**

Conclui-se que a variação de pH na urina humana submetida ao processo de estocagem,

quando acidificada com ácido sulfúrico concentrado em quantidade suficiente para se obter pH inicial de aproximadamente 2,5 (cerca de 8 mL de ácido para 5L de urina), é pequena ou pouco significativa durante todo o período de tratamento, sugerindo que esse pH é suficiente para inibir a atividade da urease durante o período de 30 dias, o que possivelmente, evita a hidrólise da uréia.

Pode-se concluir também, que a variação de temperatura utilizada nessa pesquisa, aplicada aos reservatórios de estocagem, não é suficiente para causar alteração no perfil cromatográfico dos compostos estudados ou variações no pH da urina acidificada.

Com relação ao perfil cromatográfico da urina não acidificada, concluiu-se que o mesmo varia durante o período de estocagem, devido, provavelmente, à seletividade da fase móvel e à variação do pH da urina, o que não permitiu que os fármacos e disruptores endócrinos estudados fossem quantificados na urina sem acidificação.

Conclui-se que as condições às quais o sulfametoxazol, a prednisolona, o diclofenaco de sódio e a progesterona foram submetidos não foram suficientes para reduzir a concentração utilizada no experimento (10 mg/L). A concentração adicionada inicialmente manteve-se até o final do experimento, não havendo remoção dos compostos estudados.

#### 4.2.5 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. **Introduction of soil microbiology**. 2.ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1977.
- BUTZEN, A., WERRES, F., BALSAA, P. **Establishment and application of a problem-oriented analytical procedure aiming to monitor selected pharmaceuticals in soils and urine (in German)**. Final Report Naehrstofftrennung und -Verwertung in der Abwassertechnik am Beispiel der "Lambertsmuehle", Bonner Agrikulturchemische Reihe, v. 21, pp. 25-51, 2005.
- GAJUREL, D. R.; GULYAS, H.; REICH, M.; OTTERPOHL, R. **Behavior of four selected pharmaceuticals during long-time storage of yellow water**. International Conference on Sustainable Sanitation: "Food and Water Security for Latin America". Brasil, 2007.
- HANÆUS, A., HELLSTRÖM, D., JOHANSSON, E. **Conversion of urea during storage of human urine**. *Vatten* 96 (4), 263–270, 1996.
- HELLSTRÖM, D.; JOHANSSON, E.; GRENNBERG, K. **Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea**. *Ecological Engineering* 12 (1999) 253–269, 1999.
- MAURER, M.; PRONK, M. LARSEN, T.A. **Treatment processes for source-separated urine**. *Water Research*. 2006.

MULROY, A. **Water Environ. Technol.** 2001.

PRONK, W., BIEBOW, M., BOLLER, M. **Treatment of source separated urine by a combination of bipolar electro dialysis and a gas transfer membrane.** *Water Science & Technology*. 53: 139–146, 2006.

UDERT, K. M.; LARSEN, T. A.; GUJER, W. Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. **Water Research**. v. 37, p. 2667–2677, 2003.

WILSENACH, J., VAN LOOSDRECHT, M. **Impact of separate urine collection on wastewater treatment systems.** *Water Sci. Technol.* 48 (1), 103–110, 2003.

ZAITSU, K.; MIKI, A.; KATAGI, M.; TSUCHIHASHI, H. **Long-term stability of various drugs and metabolites in urine, and preventive measures against their decomposition with special attention to filtration sterilization.** *Forensic Science International* 174 (2008) 189–196, 2007.

ZANCHETA, P. G. **Recuperação e tratamento da urina humana para uso agrícola** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

## **5 DISCUSSÃO GERAL**

Para o desenvolvimento de um método analítico laboratorial em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) para a detecção e quantificação na urina humana estocada, do sulfametoxazol (SULFA), da prednisolona (PRED), do diclofenaco de sódio (DICLO) e da progesterona (PRO) foram realizados uma série de testes para a seleção da fase móvel. Foram testadas 4 fases móveis (FM1, FM2, FM3 e FM4), sendo que a FM4 foi a que eluiu com melhor resolução os compostos estudados.

Observou-se que, utilizando-se a FM1, foi possível detectar apenas a prednisolona e o diclofenaco, sendo que a prednisolona não eluiu com boa resolução, sobrepondo-se aos picos dos compostos naturais da urina. Então, Inicialmente, ajustou-se a força cromatográfica da fase móvel e o tempo de corrida das amostras.

Mesmo após o ajuste da força cromatográfica da fase móvel, o cromatograma obtido apresentou sobreposição ao pico da prednisolona. Para realizar a separação dos picos sobrepostos, alterou-se a seletividade da fase móvel, procurando-se manter a polaridade da mesma. Tal ajuste foi realizado na FM4, na qual se diminui, de forma acentuada, o percentual de ACN e foi aumentando o percentual de metanol. O fluxo foi alterado de 0,8 para 1 mL/min. Com isso, foi possível obter um aumento da seletividade na fase móvel, permitindo uma eluição eficiente e separação da prednisolona e dos demais compostos.

A seleção das fases móveis estudadas foi baseada nos métodos desenvolvidos por Baranowska *et al.* (2006), Raimundo (2007), Santos *et al.* (2007), Cunha *et al.* (2004), Clark *et al.* (2007), Huang *et al.* (2008).

Após a escolha da fase móvel mais apropriada, realizou-se a validação do método, para verificação da adequação do mesmo às normas exigidas pelos órgãos de regulamentação.

No estudo de linearidade confeccionou-se o gráfico de correlação entre a área do pico cromatográfico e as concentrações dos disruptores endócrinos e para cada composto obteve-se a equação da reta, coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o respectivo coeficiente de correlação linear ( $r$ ), sendo que a análise desses dados permite inferir que os requisitos de linearidade exigidos pela ANVISA e INMETRO foram atendidos, já que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003a, b) e para todas as substâncias analisadas nesse trabalho o coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido no estudo da linearidade foi maior que 0,99.

Os limites de detecção e quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos analisados foram calculados de modo a estabelecer o intervalo de trabalho ou quantificação do método (BRASIL, 2003a, b). Observou-se que o método tem capacidade de indicar a presença de SULFA, PRED, DICLO e PRO a partir das concentrações de  $0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;  $0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, e o valor mínimo de quantificação é de  $0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a SULFA;  $1,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a PRED;  $1,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o DICLO e  $0,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a PRO. Logo, o método é capaz de quantificar tais compostos na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor de cada fármaco e disruptor endócrino adicionado na urina humana no início da realização do tratamento de estocagem.

Desse modo, por meio do processo de validação do método escolhido, verificou-se que o mesmo atendeu todos os requisitos necessários exigidos pela ANVISA e INMETRO.

Durante o processo de estocagem o pH foi mantido estável nos reservatórios acidificados durante todo o período, não havendo variação significativa do início ao fim dos ciclos, mantendo-se entre 2,3 e 3,0. Isso sugere que esse pH é suficiente para inativar ou impedir a atividade da enzima urease durante esse período de tratamento e sob essas condições de estocagem, impedindo, assim, a hidrólise da uréia (HELLSTRÖM, 1999). Nos reservatórios nos quais não foi realizada a acidificação, o pH manteve-se numa faixa entre 6,0 e 9,0.

Para a variação de temperatura utilizada,  $19$  a  $21^\circ\text{C}$  (no ambiente climatizado) e  $30^\circ$  a  $33^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente), não houve diferenças significativas no perfil cromatográfico dos fármacos e disruptores endócrinos durante o período de estocagem. Portanto, pode-se afirmar que essa variação de temperatura não foi capaz de influenciar na remoção dos fármacos e disruptores endócrinos estudados nesse trabalho.

Não foi possível a quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos na urina humana sem acidificação, pois o perfil cromatográfico das amostras variou durante o período de estocagem, que se deve, provavelmente, à seletividade da fase móvel e à variação do pH da urina, à medida que o pH da urina se eleva, geram-se efeitos sobre a seletividade, fator de retenção, a forma do pico e resolução dos cromatogramas ao longo do período de estocagem, variando-se o perfil cromatográfico ao longo do ciclo, o que influencia na detecção e quantificação fármacos e disruptores endócrinos na urina humana sem acidificação durante a estocagem.



Com relação à quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos na urina acidificada, observou-se que não houve diminuição na concentração dos mesmos durante o processo de tratamento da urina humana, tanto no 1º quanto no 2º ciclos. Isso sugere que sob tais condições de estocagem, no período de 30 dias, os fármacos e disruptores analisados mantiveram-se estáveis, mantendo-se inalterados durante o experimento. Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados por Gajurel *et al.* (2007), que verificou que os quatro fármacos adicionados à urina humana na mesma concentração que a estudada nesse trabalho, ou seja, 10 mg/L, não são reduzidos durante o armazenamento da urina em diferentes valores de pH e temperatura.

Embora nem todos os fármacos e disruptores endócrinos sejam eliminados com o processo de tratamento por estocagem, como demonstrado pelo presente trabalho, sabe-se que, não há uma possível avaliação dos efeitos tóxicos potenciais dos medicamentos ingeridos por seres humanos na agricultura até o momento.

Com relação aos hormônios no solo, em condições naturais, as taxas de degradação e sorção dos estrogênios apresentavam maior probabilidade de resultar em pouca mobilidade e pouca persistência (CASEY *et al.*, 2005), contrastando com o trabalho de Lucas e Jones (2006), que relataram que a meia-vida dos estrogênios é de 5 a 25 dias, podendo levar à contaminação significativa das águas.

Já segundo Lucas *et al.* (2009), é provável que o pH alcalino e altas concentrações dos sais e compostos orgânicos na urina afetem a sorção e potencial de lixiviação dos hormônios no solo, seja por um bloqueio dos sítios de sorção ou alteração de cargas superficiais em ambos os colóides orgânicos e inorgânicos. Além disso, a alta concentração de carbono e nitrogênio também pode suprimir a transformação microbiana dos hormônios, assim, indiretamente, facilitando a sua movimentação no solo (LUCAS e JONES, 2006).

Winker *et al.* (2008) afirmaram que a exposição de azevém (gramínea anual, cespitosa, que possui folhas finas e tenras, cujo porte chega a atingir 1,2 metros de altura), aos fármacos contidos na urina em um nível considerado "natural", ou seja, nível real excretado em consequências do uso de medicações, bem como em concentrações mais elevadas, não afeta a produção de matéria fresca e seca durante o período de crescimento de três meses, nem para fármacos isolados, nem para a combinação de carbamazepina, ibuprofeno e etinilestradiol. Somente a carbamazepina mostrou estar presente nas raízes e parte aérea de

plantas de azevém, concluindo que apenas os fármacos que são persistentes no solo e não biodegradados podem ser transferidos para as plantas em altas concentrações. Winker *et al.* (2008) afirmam, também, que não há uma possível avaliação dos efeitos tóxicos potenciais dos medicamentos ingeridos por seres humanos na agricultura até o momento.

## **6 CONCLUSÕES**

Quanto ao desenvolvimento do método:

- Quanto ao desenvolvimento do método para detecção e quantificação do sulfametoxazol (SULFA), da prednisolona (PRED), do diclofenaco de sódio (DICLO) e da progesterona (PRO) na urina humana durante o processo de estocagem, chegou-se à conclusão, por meio do estudo de fases móveis com diferentes forças cromatográficas e seletividades, que a fase móvel mais adequada para a eluição dos fármacos e disruptores endócrinos estudados (SULFA, PRED, DICLO E PRO), com menor dispersão do analito, foi a fase móvel 4 (FM4). Nessa fase móvel a eluição foi realizada por gradiente, fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e concentração de acetonitrila (ACN) variando entre 10 e 15%, o que permitiu que essa fase móvel apresentasse a força cromatográfica e a seletividade adequadas para a separação dos fármacos e disruptores estudados.

Quanto à validação do método desenvolvido:

- O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa desenvolvido nesse estudo é sensível, seletivo e reprodutível para detecção e quantificação desses quatro compostos de diferentes grupos, mostrando-se aceitável para a análise de fármacos e disruptores endócrinos na urina humana.
- O método apresentou satisfatória linearidade ( $r$  maior que 0,99 para todos os compostos estudados) e precisão (CV inferior a 5%).
- Os limites de detecção e quantificação apresentaram valores menores que aqueles utilizados no processo de estocagem, portanto adequado para as análises realizadas.

Quanto à variação de pH e influência da temperatura nos experimentos:

- Com relação aos valores de pH da urina utilizados no tratamento de estocagem, concluiu-se que, utilizando-se um pH inicial 2,3 e 3,0, o mesmo não varia significativamente durante o processo de estocagem, o que sugere que esse valor de pH é suficiente para evitar a hidrólise da uréia.
- Em se tratando das temperaturas utilizadas no tratamento, concluiu-se que a variação de temperatura aplicada aos reservatórios de estocagem não foi suficiente para causar alteração no perfil cromatográfico dos compostos estudados, ou variações no pH da urina acidificada.

Quanto à quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos:

- Concluiu-se que, nas condições às quais o sulfametoxazol, a prednisolona, o diclofenaco de sódio e a progesterona foram submetidos, não foram suficientes para reduzir a concentração utilizada no experimento.
- O tratamento de estocagem da urina humana, nas condições estabelecidas nesse trabalho, não foi suficiente para a remoção dos fármacos e disruptores endócrinos estudados, durante o processo de estocagem.

## **7 RECOMENDAÇÕES**

Estudar o comportamento dos fármacos e disruptores endócrinos na urina humana durante um período maior de estocagem;

Avaliar a interferência de outros valores de pH e temperatura no comportamento dos fármacos e disruptores endócrinos durante o processo de tratamento da urina humana pelo processo de estocagem;

Estudar o comportamento dos fármacos e disruptores endócrinos na urina humana em diferentes tratamentos;

Avaliar o comportamento e as possíveis alterações dos fármacos e disruptores endócrinos contidos na urina utilizada como fertilizante no sistema solo-planta;

Avaliar os possíveis riscos à saúde humana associados ao uso da urina humana como fertilizante agrícola.

Estudar métodos simples e de fácil aplicabilidade na remoção de fármacos e disruptores endócrinos contidos na urina humana, antes de seu uso como fertilizante agrícola.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ABIFARMA – Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica. Disponível em: <<http://www.abifarma.com.br/>>. Acesso em: 15 março 2010.

ALEXANDER, M. **Introduction of soil microbiology**. 2.ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1977.

ANTUNES, M. V.; FELTRACO, L. L.; MORISSO, F. D. P.; LINDEN, R. **Determinação de 2,5-hexanodiona em urina empregando cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina**. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5, 200, 2010.

BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. **Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method**. *Analytica Chimica Acta* 570 (2006) 46–58, 2006.

BERTOLDI, A. D. et al. **Utilização de medicamentos em adultos: prevalência e determinantes individuais**. *Rev. Saúde Pública, Pelotas*, v. 38, n. 2, p. 228-238, 2004.

BILA, D. M., DEZOTTI, M. **Fármacos no Meio Ambiente**. COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão. Rio de Janeiro, 2003.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N.; **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**. 1.ed. IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2003.

BRASIL (2003a). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL (2003b). INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008, orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. 36p.

CASEY, F.X.M.; SIMUNEK, J.; LEE, J.; LARSEN, G.L.; HAKK, H. **Sorption, mobility and transformation of estrogenic hormones in natural soil**. *Journal of Environmental Quality* 34, 1372–1379, 2005.

CLARK, S.; FRANCIS, P. S.; CONLAN, X. A.; BARNETT, N. W. **Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after Automated derivatisation with xanthidrol** *Journal of Chromatography A*, 1161 (2007) 207–213, 2007.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L.; BONATO, P. L. **Fundamentos da Cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 279p.

DEAN, J. R. **Methods for Environmental Trace Analysis**. Northumbria University, England: John Wiley & Sons Ltd, 2003.

ESREY, S. et al. **Ecological sanitation**. Sida, Stockholm, 1998. Disponível em: <<http://www.ecosanres.org/PDF%20files/Ecological%20Sanitation.pdf>> Acesso em: setembro de 2009.

FENAFAR – Federação Nacional dos Farmacêuticos. **Mercado Farmacêutico deve movimentar em 2010 US\$ 830 bi**. Disponível em: <[http://www.fenafar.org.br/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=425:m](http://www.fenafar.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=425:m)>

ercado-farmacéutico-deve-movimentar-em-2010-us-830-bi&catid=67:geral&Itemid=146>. Acesso em: 3 de outubro 2010.

FERREIRÓS, N.; IRIARTE, G.; ALONSO, R.M.; JIMENEZ, R. M. **Development of a solid phase extraction procedure for HPLC–DAD determination of several angiotensin II receptor antagonists in human urine using mixture design.** *Talanta* 73 (2007) 748–756, 2007.

FITTSCHEN, I.; HAHN, H. H. **Characterization of the municipal wastewater parameters human urine and preliminary comparison with liquid cattle excretion.** *Water science technology, Alemanha*, v. 38, n. 6, p. 9-16, 1998.

GAJUREL, D. R.; GULYAS, H.; REICH, M.; OTTERPOHL, R. **Behavior of four selected pharmaceuticals during long-time storage of yellow water.** International Conference on Sustainable Sanitation: “Food and Water Security for Latin America”. Brasil, 2007.

GARRIC J.; FERRARI B.; PAXE N.; GIUDICE R.; POLLIO A. **Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002.

GHISELLI, G., JARDIM, W.F. **Interferentes Endócrinos no Ambiente.** Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13081-970 Campinas - SP, Brasil. 2007.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de fisiologia médica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GULYAS, H., GAJUREL, D. R., WINKER, M., KUCHAREK, K., SKWIOT, R., FURMANSKA, M., OTTERPOHL, R. **Elimination of human pharmaceuticals by yellow water Ozonation.** International Conference on Sustainable Sanitation: “Food and Water Security for Latin America”. Brasil, 2007.

HALLING-SORENSEN B., NIELSEN S. N., LANZKY P.F., INGERSLEV F., Holten LIITZHOF H. C. H., JORGENSEN S.E. **Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review.** *Chemosphere*, Vol. 36, No.2, pp. 357-393, 1998.

HANÆUS, A., HELLSTRÖM, D., JOHANSSON, E. **Conversion of urea during storage of human urine.** *Vatten* 96 (4), 263–270, 1996.

HEBERER, T. **Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.** *Toxicol Lett*, 131:5–17, 2002.

HELLSTRÖM, D.; JOHANSSON, E.; GRENNBERG, K. **Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea.** *Ecological Engineering* 12 (1999) 253–269, 1999.

HÖGLUND, C. **Evaluation of microbial health risks associated with the reuse of source-separated human urine.** Ph.D. thesis, KTH, Stockholm, Sweden, 2001.

HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. **Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection.** *Talanta* 75 (2008) 172–177, 2008.

IMS Health – Intercontinental Marketing Services. Disponível em: <<http://www.imshealth.com>>. Acesso em: 10 fev.2010.

JOHANSSON, M.; et al. **Urine separation – closing the nutrient cycle.** Verna Ecology. Stockholm, 2001.

KÜMMERER, K.; **Significance of antibiotics in the environment.** *Chemosphere*, 2001.

- LANDRIGAN P, GARG A, DROLLER DBJ. **Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study**. Environ Health Perspect, 2003.
- LANGERGRABER, G., MÜLLEGGER, E. **Ecological sanitation - A way to solve global sanitation problems?** Environment International. Austria, 2005.
- LARSEN, T. A.; GUJER, W. **Separate management of anthropogenic solutions (human urine)**. Water Sci. Technol. 34 (3-4), 87–94, 1996.
- LIENERT J., LARSEN T. A. **Managing Diffuse Sources: Alternative Concepts for Urban Water Infrastructure**. Eawag, Switzerland, 2006.
- LIND, B.; BAN, Z.; BYDÉN, S. Volume **reduction and concentration of nutrients in human urine**. Ecological Engineering, Suécia, v. 16, n. 4, p. 561-566, 2001.
- LUCAS, S.D.; JONES, D.L. **Biodegradation of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in grassland soils amended with animal wastes**. Soil Biology & Biochemistry 38, 2803–2815, 2006.
- LUCAS, S.D.; JONES, D.L. **Urine enhances the leaching and persistence of estrogens in soils**. Soil Biology & Biochemistry 41 (2009) 236–242, 2009.
- MANILA, C. F. **Ecological Sanitation – An Introduction to the Philippines**. Philippines, 2003.
- MAURER, M.; PRONK, M. LARSEN, T.A. **Treatment processes for source-separated urine**. Water Research. 2006.
- MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. **Riscos químicos ambientais à saúde da criança**. J. Pediatr. 81(5):205-211, 2005.
- MULROY, A. **Water Environ. Technol.** 2001.
- NICHOLSOM, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of analytical methods for detection e quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. Cooperative Research. Australia: Commonwealth of Australia, 2001.
- OTTERPOHL, R. **Black, brown, yellow, grey – The new colors of sanitation**. Water 21. p. 37-41, out. 2001.
- PEDROSO, R. C. R. **Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e polímeros como sistema de pré-concentração**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PRONK, W., BIEBOW, M., BOLLER, M. **Treatment of source separated urine by a combination of bipolar electro dialysis and a gas transfer membrane**. Water Science & Technology. 53: 139–146, 2006.
- RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner, **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, SP, 2007.
- RAVINA, M.; CAMPANELLA, L.; KIWI, J. **Accelerated mineralization of the drug diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor**. Wat Res 36:3553–3560, 2002.
- RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. **J. Pharm. Pharmacol.**, 1985.

- SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.; CUNHA, A. C. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de fármacos em meio aquático por extração em fase sólida e HPLC**. Revista de ciências ambientais, v.1, n.2, p.19 a 34. Canoas, RS, 2007.
- SASSE, A. **Sanitation Concepts for Separate Treatment of Urine, Faeces and Greywater**. Task 8, Fertilizer usage. Berlim ,2005.
- SIMÕES MJ, FARACHE Filho A. **Consumo de medicamentos em região do Estado de São Paulo (Brasil)**, 1985. Rev Saúde Públ. 1988;22:494-9.
- SOUSA, R. V., SANTANA, M. A. **Farmacologia Geral**. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” Especialização: Farmacologia – Atualização e Novas Perspectivas. Lavras: UFLA/FAEPE. 2000.
- TANSKI, H. H.; WIJK-SIJBESMA, C. Van. **Human excreta for plant production**. Bioresource Technology, 2003.
- UDERT, K. M.; LARSEN, T. A.; GUJER, W. Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. **Water Research**. v. 37, p. 2667–2677, 2003.
- ZANCHETA, P. G. **Recuperação e tratamento da urina humana para uso agrícola** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.
- ZHANG, Z.; ZHANG, C.; SU, X.; MA, M.; CHEN, B.; YAO, S. **Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine**. *analytica chimica acta* 621 (2008) 185–192, 2008.
- WILSENACH, J., VAN LOOSDRECHT, M. **Impact of separate urine collection on wastewater treatment systems**. *Water Sci. Technol.* 48 (1), 103–110, 2003.
- WINKER, M.; GULYAS, H.; OTTERPOHL, R. **Fertilization of rye grass with carbamazepine, ibuprofen, and 17 $\alpha$ - ethinylestradiol spiked urine – a greenhouse experiment**. 3rd SWITCH Scientific Meeting, Brasil, 2008.
- WOLGAST, M. *Rena vatten. Om tankar i kretslopp* (Clean Waters.Thoughts about recirculation). 186 p. Uppsala, Creamon, 1993.

# APÊNDICE

## Apêndice A – Características das fases móveis testadas

**Tabela 19:** Fase móvel 1 (FM1)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	40	10	50	0,8
5,30	48	2	50	0,8
35	48	2	50	0,8

**Tabela 20:** Fase móvel 2 (FM2)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	50	10	40	0,8
30	43	2	55	0,8
31	50	10	40	0,8
40	50	10	40	0,8

**Tabela 21:** Fase móvel 3 (FM3)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	55	10	35	0,8
30	43	2	55	0,8
31	55	10	35	0,8
45	55	10	35	0,8

**Tabela 22:** Fase móvel 4 (FM4)

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente</i>			<i>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</i>
	H <sub>2</sub> O (TFA 0,05) (%)	MetOH (%)	ACN (%)	
0	55	35	10	1,0
1,5	55	35	10	1,0
8	48	40	12	1,0
20	35	50	15	1,0
30	35	50	15	1,0
31	55	35	10	1,0
40	55	35	10	1,0

## Apêndice B – Resultados das análises do processo de validação do método desenvolvido

**Tabela 23:** Pontos da curva de calibração

	Diclofenaco de sódio	Prednisolona	Progesterona	Sulfametoxazol
Pontos	Concentração (ug.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (ug.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (ug.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (ug.mL <sup>-1</sup> )
1	2	2	2	2
2	5	5	5	5
3	7,5	7,5	7,5	7,5
4	10	10	10	10
5	12,5	12,5	12,5	12,5
6	15	15	15	15
7	20	20	20	20
8	22	22	22	22

**Tabela 24:** Concentrações de Sulfametoxazol (µg.mL<sup>-1</sup>) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação (r).

Concentração de SULFA (µg.mL <sup>-1</sup> )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r)
2	4,7903	$y = 64083x - 108,02$	$r = 0,9988$
5	4,7740		
7,5	4,7700		
10	4,7633		
12,5	4,7603		
15	4,7513		
20	4,7447		
22	4,7403		

**Tabela 25:** Concentrações de Prednisolona (µg.mL<sup>-1</sup>) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficientes de correlação (r).

Concentração de PRED (µg.mL <sup>-1</sup> )	Área média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r)
2	218180,07	$y = 124851x + 5870,9$	$r = 0,9982$
5	622921,30		
7,5	988097,47		
10	1328199,00		
12,5	1487403,43		
15	1875826,40		
20	2548323,40		
22	2713998,20		

**Tabela 26:** Concentrações de Diclofenaco de Sódio ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).

Concentração de DICLO ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média	Equação de regressão	Coeficiente de correlação ( $r$ )
2	27573,37	$y = 15777x - 3361,9$	$r = 0,9990$
5	75665,57		
7,5	117876,43		
10	161152,70		
12,5	184699,63		
15	229746,50		
20	311481,03		
22	347952,87		

**Tabela 27:** Concentrações de Progesterona ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) empregadas no ensaio de linearidade, respectivas áreas médias dos picos cromatográficos, equação de regressão linear e coeficiente de correlação ( $r$ ).

Concentração de PRO ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média	Equação de regressão	Coeficiente de correlação ( $r$ )
2	59887,13	$y = 34511x + 859,77$	$r = 0,9993$
5	176369,70		
7,5	264164,90		
10	359157,57		
12,5	436070,27		
15	503717,67		
20	688036,97		
22	763512,67		

**Tabela 28:** Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

COMPOSTO	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
SULFA	0,100	0,334
PRED	0,330	1,100
DICLO	0,333	1,110
PRO	0,257	0,857



**Tabela 29:** Precisão e recuperação da curva padrão de 4 drogas em amostras de urina humana

Composto	Concentração adicionada	Concentração encontrada	D.P. <sup>1</sup>	C.V. (%)	Recuperação (%)	D.P. <sup>2</sup>
SULFA	2	1,884	0,043	2,30	94,19	2,166
	5	5,041	0,058	1,15	100,83	1,159
	7,5	7,808	0,028	0,36	104,10	0,374
	10	10,415	0,074	0,71	104,15	0,745
	12,5	11,922	0,192	1,61	95,38	1,533
	15	14,689	0,237	1,61	97,93	1,580
	20	19,917	0,285	1,43	99,58	1,427
	22	22,323	0,236	1,06	101,47	1,075
PRED	2	1,697	0,170	10,04	84,87	8,523
	5	4,939	0,155	3,14	98,78	3,097
	7,5	7,871	0,150	1,91	104,94	2,003
	10	10,597	0,243	2,29	105,97	2,432
	12,5	11,861	0,219	1,85	94,89	1,755
	15	14,982	0,188	1,26	99,88	1,255
	20	20,375	0,485	2,38	101,87	2,423
	22	21,678	0,566	2,61	98,54	2,574
DICLO	2	1,961	0,009	0,45	98,04	0,445
	5	5,009	0,039	0,79	100,18	0,790
	7,5	7,684	0,048	0,63	102,46	0,645
	10	10,427	0,055	0,52	104,27	0,546
	12,5	11,921	0,151	1,27	95,37	1,210
	15	14,775	0,067	0,45	98,50	0,447
	20	19,956	0,109	0,55	99,78	0,545
	22	22,267	0,131	0,59	101,22	0,597
PRO	2	1,711	0,180	10,50	85,56	8,982
	5	5,094	0,527	10,34	101,87	10,534
	7,5	7,631	0,161	2,11	101,75	2,152
	10	10,386	0,298	2,87	103,86	2,985
	12,5	12,582	1,880	14,94	100,66	15,042
	15	14,578	0,424	2,91	97,18	2,829
	20	19,915	0,433	2,18	99,58	2,167
	22	22,103	0,302	1,37	100,47	1,372

### Apêndice C – Resultados das análises de quantificação dos fármacos e disruptores endócrinos durante o período de estocagem

**Tabela 30:** Tempo médio de retenção dos compostos detectados na urina humana acidificada

	Sulfametoxazol	Prednisolona	Diclofenaco de Sódio	Progesterona
Tempo de retenção (min)	4,770	6,093	24,218	27,497

**Tabela 31:** Quantificação do sulfametoxazol, da prednisolona, do diclofenaco de sódio e da progesterona no 1º ciclo de estocagem

<b>SULFA</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	4,755	22621	4180	3,55E-01
	2ª Semana	4,778	24524	4532	3,85E-01
	3ª Semana	4,783	23256	4381	3,65E-01
	4ª Semana	4,783	23575	4441	3,70E-01
<b>Média</b>		4,77	23494	4383	3,69E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,280	3,375	3,401	3,374
<b>D.P.</b>		0,013	792,920	149,078	0,012
<b>PRED</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	6,039	30435	3872	1,97E-01
	2ª Semana	6,098	30763	3914	1,99E-01
	3ª Semana	6,103	31105	3914	2,02E-01
	4ª Semana	6,131	30688	3816	1,99E-01
<b>Média</b>		6,093	30747,750	3878,932	1,99E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,635	0,899	1,195	1,032
<b>D.P.</b>		0,039	276,431	46,365	0,002
<b>DICLO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	24,102	7474	682	6,87E-01
	2ª Semana	24,249	7683	701	7,06E-01
	3ª Semana	24,268	8228	741	7,35E-01
	4ª Semana	24,254	7022	628	6,58E-01
<b>Média</b>		24,218	7601,750	688,018	6,97E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,322	6,583	6,825	4,651
<b>D.P.</b>		0,078	500,407	46,960	0,032
<b>PRO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	27,2650	19576	1482	5,42E-01
	2ª Semana	27,5780	22765	1723	6,30E-01
	3ª Semana	27,6040	24135	1762	6,74E-01
	4ª Semana	27,5420	23918	1738	6,68E-01
<b>Média</b>		27,497	22598,500	1676,356	27,497
<b>C.V. (%)</b>		0,571	9,305	7,787	9,684
<b>D.P.</b>		0,157	2.102,787	130,543	0,061

**Tabela 32:** Quantificação do sulfametoxazol, da prednisolona, do diclofenaco de sódio e da progesterona no 2º ciclo de estocagem

<b>SULFA</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	4,759	18919	3628	2,97E-01
	2ª Semana	4,758	19429	3766	3,05E-01
	3ª Semana	4,759	17117	3355	2,69E-01
	4ª Semana	4,761	18451	3536	2,90E-01
<b>Média</b>		4,759	18479,000	3571,250	2,90E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,026	5,368	4,827	5,318
<b>D.P.</b>		0,001	991,956	172,390	0,015
<b>PRED</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	6,077	29699	3880	1,91E-01
	2ª Semana	6,126	29952	3989	1,93E-01
	3ª Semana	6,099	29812	3926	1,92E-01
	4ª Semana	6,112	29162	3963	1,87E-01
<b>Média</b>		6,104	29656,250	3939,500	1,91E-01
<b>C.V. (%)</b>		0,341	1,165	1,202	1,379
<b>D.P.</b>		0,021	345,368	47,346	0,003
<b>DICLO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	24,114	10603,0	958,0	8,85E-01
	2ª Semana	25,973	10128,7	890,7	8,55E-01
	3ª Semana	25,937	10043,1	889,0	8,50E-01
	4ª Semana	25,970	10043	889	8,50E-01
<b>Média</b>		25,499	10204,450	906,675	8,60E-01
<b>C.V. (%)</b>		3,620	2,634	3,775	1,973
<b>D.P.</b>		0,923	268,750	34,226	0,017
<b>PRO</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Área</b>	<b>Peso</b>	<b>Concentração</b>
	1ª Semana	27,430	22040	1628	6,14E-01
	2ª Semana	29,301	24551	1806	6,86E-01
	3ª Semana	29,262	24164	1799	6,75E-01
	4ª Semana	29,296	23019	1692	6,42E-01
<b>Média</b>		28,822	23443,425	1731,300	6,54E-01
<b>C.V. (%)</b>		3,221	4,861	4,995	5,046
<b>D.P.</b>		0,928	1139,504	86,474	0,033