UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AUDITORIA AMBIENTAL
MESTRADO EM AUDITORIA AMBIENTAL

ÉRICO BARZAN DE MATTOS AMARAL

OCORRÊNCIA DE CAFEÍNA NA BAÍA DE SANTOS (SP) E ESTIMATIVA DO QUOCIENTE DE PERIGO A ORGANISMOS MARINHOS

Santos/SP
2019

ÉRICO BARZAN DE MATTOS AMARAL

OCORRÊNCIA DE CAFEÍNA NA BAÍA DE SANTOS (SP) E ESTIMATIVA DO QUOCIENTE DE PERIGO A ORGANISMOS MARINHOS

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Auditoria Ambiental, sob as orientações de Alessandra Aloise de Seabra e coorientação de Camilo Dias Seabra Pereira.

Santos/SP

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

363.7394 Amaral, Érico Barzan de Mattos.

A513c. Ocorrência de cafeína na baía de Santos (SP)e estimativa do quociente de perigo a organismos marinhos.
Érico Barzan de Mattos Amaral. – 2019
n.páginas 49 p.

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Aloise de Seabra

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Auditoria Ambiental, Santos, SP, 2019.

1. Cafeína. 2. Contaminantes emergentes. 3. Poluição marinha. 4. Perigo ambiental. 5. Zonas Costeiras.

I. Seabra, Alessandra Aloise. II. Pereira, Camilo Dias Seabra. III. Título Ocorrência de cafeína na baía de Santos (SP)e estimativa do quociente de perigo a organismos marinhos.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha família, aos orientadores, professores, funcionários e colegas pela oportunidade, apoio, experiência e conhecimentos obtidos durante o programa de Mestrado.

RESUMO

A poluição marinha é uma preocupação mundial. Estudos têm demonstrado a influência humana na degradação ambiental através do descarte inadequado de fármacos e drogas ilícitas em corpos d'água após a descarga de efluentes tratados e não tratados. A cafeína é classificada como um contaminante emergente e está presente em vários fármacos, bebidas e alimentos. Após o consumo, a cafeína é introduzida pelo esgoto no mar através dos emissários submarinos. Vários estudos mostraram que a cafeína é um indicador de contaminação antrópica, pois, quando encontrada, pode acompanhar patogênicos para a biodiversidade marinha e até para a saúde dos banhistas. Os objetivos deste estudo foram: (i) detectar e quantificar as concentrações de cafeína em águas superficiais marinhas da Baía de Santos, SP; (ii) verificar se as concentrações encontradas na Baía de Santos são capazes de causar efeito tóxico aos organismos marinhos de acordo com estudos pretéritos; (iii) analisar o perigo ambiental (HQ) com as concentrações de cafeína encontradas; (iv) verificar a relação entre a contaminação por cafeína e a balneabilidade em zonas costeiras; (v) propor cafeína como marcador químico de contaminação de efluentes domésticos na Baía de Santos, SP; (vi) propor alternativas para tratamento de esgoto. Para a determinação da cafeína foram coletadas amostras em 14 pontos da Baía de Santos. As amostras de água foram submetidas à extração em fase sólida. Em seguida, as análises foram realizadas por Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massa. Uma revisão da literatura foi realizada sobre os efeitos crônicos e agudos em organismos aquáticos após a exposição à cafeína. Os resultados de classificação das praias foram verificados de acordo com os critérios de monitoramento das Agências Ambientais de cada localidade. Durante a análise, verificou-se que a maior concentração encontrada na área amostral foi 1322 $ng.L^{-1}$, a menor concentração encontrada foi de 260 $ng.L^{-1}$. Foi observado quociente de perigo ambiental (HQ>10) para organismos marinhos com as concentrações encontradas na baía de Santos. Foi constatada a balneabilidade própria das praias estudadas, apesar das concentrações de cafeína presentes. Finalmente, foi constatado que existem alternativas para o tratamento de esgoto mais eficientes para contaminantes emergentes como a cafeína, além daqueles atualmente utilizados. Demonstrou-se, portanto, que há uma real urgência de investimentos públicos para melhorar o tratamento de esgoto, a fim de eliminar ou reduzir a ocorrência e os efeitos desse contaminante no meio aquático.

Palavras chave: Cafeína. Contaminantes emergentes. Poluição marinha. Risco ambiental. Zonas costeiras.

ABSTRACT

Marine pollution is a worldwide concern. Studies have demonstrated the human influence on environmental degradation through the inappropriate disposal of drugs in water bodies after the discharge of treated and untreated effluents. Caffeine is classified as an emerging contaminant, being present in various pharmaceuticals, beverages, foods and medicines. After consumption, the caffeine is released into the sea through submarine sewage outfalls. Several studies have shown that caffeine is an indicator of anthropogenic contamination, because when found, it may indicate presence of pathogens to marine biodiversity and human health. The objectives of this study were: (i) to detect and quantify the concentrations of caffeine in marine surface water of the Bay of Santos, SP; (ii) to verify if the concentrations found in the Santos Bay are able of triggered toxic effects to marine organisms according to previous studies; (iii) to analyze the environmental hazard (HQ) employing local caffeine concentrations; (iv) to verify the relationship between caffeine contamination and bathing quality in coastal zones; (v) to propose caffeine as a chemical marker for wastewater contamination in Santos Bay, SP; (vi) to propose alternatives for sewage treatment. For the determination of caffeine, samples were collected at 14 points in the Santos Bay. The water samples were extracted by to solid phase extraction. After that, analyzes were performed by Liquid Chromatography coupled to the Mass Spectrometer. A literature review was performed on chronic and acute effects of caffeine for aquatic organisms. The results of bathing classification were verified according to the criteria of the Environmental Agencies from each location. It was verified that the highest concentration found among the sampling area was 1322 $ng.L^{-1}$, the lowest concentration found was 260 $ng.L^{-1}$. It was observed that there are environmental hazard to marine organisms (HQ>10) for the concentrations found. It was verified the proper bathing of the studied beaches, despite the high caffeine concentrations. Finally, it was seen that there are some alternatives for a more efficient treatment of emerging contaminants as caffeine beyond those currently used. It has therefore been shown that there is a real urgency for public investments to improve sewage treatment in order to eliminate or reduce the occurrence and effects of these contaminants in aquatic environments.

Key words: Caffeine. Emerging contaminants. Marine pollution. Environmental hazard. Coastal zones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da cafeína.....13
Figura 2. Pontos de coleta de água na Baía de Santos, SP.....18
Figura 3. Esquema de extração em fase sólida (EFS).....18
Figura 4: Resultados das análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS) em nanograma por litro dos 14 pontos de coleta.....23
Figura 5: Concentrações (ng/L) nos pontos de coleta.....24
Figura 6: Diagrama de Dispersão (ng/L) nos pontos de coleta.....25
Figura 7: Comparação entre as concentrações máximas (ng/L) encontradas em Santos e outras zonas costerias (Mar).....28
Figura 8: Comparação entre as concentrações máximas (ng/L) encontradas em Santos com águas doces (Rio).....29
Figura 9: Percentual de balneabilidade das praias de Santos durante o mês da coleta - setembro de 2018 (CETESB, 2018).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas e químicas da cafeína.....13
Tabela 2. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.....19
Tabela 3: Resultados das concentrações em cada ponto de coleta.....23
Tabela 4: Comparação entre quantidade de cafeína (ng/l) x quantidade de *enterococos* (UFC/100ml) x classificação de balneabilidade (CETESB) nos pontos de praia.....30
Tabela 5: Concentrações de efeito não observado (CENO) e respostas em organismos bioindicadores após exposição à cafeína.....37
Tabela 6: Mensuração do HQ da cafeína em cada ponto de coleta.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE – Energia de colisão
CENO – Concentração de efeito não observado
CETESB – Companhia ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CXP – Potencial de Saída de Colisão
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DP – Potencial de desagregação
Endpoint – Efeitos respostas
EFS – Extração por fase sólida
EPC – Estação de pré-condicionamento de esgoto
ESI – Ionização por “electrospray”
EROD – Enzima etoxresorufina-O-deetilase
GPX – Glutationa peroxidase
GR – Glutationa redutase
GST – Glândula Digestiva
HCl – Ácido clorídrico
HPLC – High performance liquid chromatography
HQ – Quociente de Risco
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LMS – Membrana lisossomal de hemócitos
LOD – Limites de detecção
LOQ – Limites de quantificação
MEC – Concentração ambiental medida
µM – Micrômetro
Mg – Miligrama
Ml – Mililitro
mm – Milímetro
MRM – Monitoramento de Reação Múltipla
NEA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
Ng L^{-1} – Nanograma por litro
Ph – Potencial Hidrogeniônico
PNEC – Concentração sem efeitos previstos

Q1 – Primeiro quadrupolo

Q3 – Último quadrupolo

RT – Tempo de retenção

TºC – Temperatura

UFC – Unidade de formação de colônias

US EPA – Departamento de Meio Ambiente dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....23
4. CONCLUSÃO.....40
5. TRABALHO SUBMETIDO.....41
6. REFERÊNCIAS.....42

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Ortega *et al*. (2018), os contaminantes emergentes são substâncias que podem causar danos a organismos não-alvo, representando uma lacuna na legislação e nos programas de monitoramento ambiental. Estes contaminantes estão sendo identificados em diversos países (Alygizakis *et al*., 2016) e podem ser reconhecidos majoritariamente como produtos farmacêuticos, de cuidados pessoais, drogas ilícitas, pesticidas e herbicidas, retardantes de chamas e aditivos industriais (DANESHVAR *et al*., 2012, ÁRIAS 2013, MONTAGNER *et al*., 2017).

Conforme relata Aguirre *et al*. (2014), existe uma preocupação quanto aos efeitos adversos destes contaminantes na biota marinha. A presença, em águas receptoras e fontes de água potável, destes contaminantes emergentes é uma preocupação internacional (DANESHVAR *et al*., 2012).

Devido ao hiato de conhecimento existente em relação aos efeitos ambientais da maioria destes compostos emergentes, não existem padrões de qualidade ambiental (NÖDLER *et al*., 2016). Devido a esta lacuna de conhecimento sobre os efeitos destes contaminantes na biota, não há legislação específica que determina a correta forma de tratamento, pois, devido à complexidade destes compostos necessitaria de investimentos em sistemas de tratamento secundário e terciário para detectá-los e tratá-los.

As principais fontes destes contaminantes são os pesticidas, fármacos, hormônios, nanomateriais, produtos de higiene pessoal, plastificantes, entre outros (CANELA *et al*. 2014). O aumento do consumo destes produtos pela população mundial resultou na ocorrência dessas substâncias no ambiente aquático. Estas substâncias são encontradas no ambiente marinho devido às atividades antrópicas, onde, após o consumo destes produtos os mesmos são descartados ou excretados e assim, levados até o mar através dos sistemas de esgoto doméstico, os quais não recebem o tratamento adequado para identificar e eliminar tais contaminantes.

De acordo com Árias (2013) os principais contaminantes emergentes são: antibióticos de uso humano e veterinário; analgésicos e antiinflamatórios, reguladores lipídicos, beta bloqueadores, agentes de contraste de raios X, drogas ilegais, fragrâncias, agentes de proteção solar, repelentes de insetos,

antissépticos, retardantes de chamas, surfactantes e metabolitos, aditivos industriais, hormônios esteroides e pesticidas.

A presença de fármacos no ambiente é principalmente atribuída à descarga de águas residuais de ETAR's (Estação de Tratamento de Águas Residuais), as quais não são projetadas para remover esses compostos, resultando na descarga em águas superficiais, incluindo rios, lagos e águas costeiras (PETRIE *et al*., 2015). No Brasil a falta de saneamento básico faz com que em diversas localidades do país o esgoto doméstico é lançado diretamente em corpos d'água ocasionando a contaminação no bioma aquático. De acordo com Canela (2014) o saneamento básico no Brasil, com o lançamento de esgoto sanitário in natura na biota aquática, por décadas tornaram nossos mananciais vulneráveis e contaminados.

Cafeína

De acordo com Oliveira (2018), a cafeína é um alcaloide natural pertencente ao grupo de compostos químicos conhecidos como metilxantinas, que atuam como diuréticos e estimulantes do sistema nervoso central. Suas características físicas e químicas estão expostas na figura 01 e tabela 01.

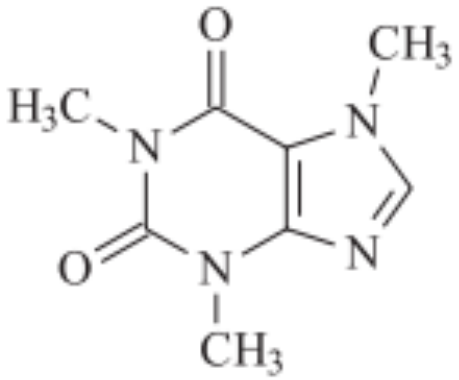


Figura 1. Estrutura química da cafeína (Brenelli, 2003).

Tabela 1. Características físicas e químicas da cafeína. (WHO, 98)

Fórmula Molecular	$C_8H_{10}N_4O_2$
Massa Molar	194,194 $g.mol^{-1}$
Ponto de Fusão 1 atm (ºC)	235
Solubilidade em água a 25 ºC	2,17 $g.100\ mL^{-1}$
log Kow	-0,07
pKa	- 0,13 a 1,22
DL_{50}	192 mg.kg (rato,oral)

A cafeína é considerada uma substância biologicamente ativa, podendo contaminar ecossistemas continentais e marinhos (DEL REY *et al*., 2012). Classificada como contaminante emergente, sua presença em corpos d'água pode trazer informações valiosas sobre a saúde ambiental. Quando presente nas águas naturais pode causar efeitos adversos tanto em microrganismos quanto em peixes e anfíbios (CANELA *et al*. 2014).

A cafeína pode ser encontrada em alimentos contendo cacau, guaraná ou chocolate; bebidas como cafés e chás; condimentos; tabacos; e produtos farmacêuticos, como medicamentos analgésicos, antigripais e inibidores de apetite (OLIVEIRA, 2018). Estas fontes de cafeína podem ser variadas conforme os hábitos de consumo (SAUVÉ *et al*., 2012).

Grandes quantidades de alimentos tais como chá e café, podem ser descartadas, fazendo com que concentrações significativas da substância apareçam no esgoto sanitário bruto (CANELA *et al*. 2014).

Conforme Gokulakrishnan *et al.* (2005), o consumo médio diário de cafeína por pessoa no mundo varia entre 80 a 400 mg por dia, o que resulta em uma grande quantidade de descarte desta substância como esgoto doméstico.

A presença destas substâncias bioativas no meio marinho enfatiza a necessidade de se avaliar seus perigos e impactos na saúde do ecossistema (YOU *et al*., 2015), por exemplo, conforme estudo realizado por Aguirre *et al*. (2015) a toxicidade da cafeína pode causar danos ao DNA da amêijoa *Corbicula fluminea*, após 21 dias de exposição em uma concentração de 100 ng L^{-1}. Enquanto que, em outro estudo realizado por Aguirre *et al*. (2015) foram observados efeitos crônicos ao *Paracentrotus lividus* expostos às concentrações de cafeína variando entre 10 a 15.000 ng/L^{-1}. Assim como, Interferências no mecanismo de biotransformação do *Prochilodus lineatus* quando expostos a concentrações de cafeína entre 300 a 30.000 ng/L^{-1}, conforme Santos-Silva (2018), impactando assim um organismo de interesse comercial no Brasil.

No sentido de avaliar os perigos ambientais, o Departamento de Meio Ambiente dos Estados Unidos por meio da Agência de Proteção Ambiental (US EPA) elaborou um critério de classificação de perigo ambiental por meio da exposição de contaminação de determinadas substâncias tóxicas a organismos bioindicadores, calculando o fator *Hazard Quotient* – HQ (Dafouz, 2018).

De acordo com Canela (2014) além da cafeína, fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios naturais e sintéticos também têm sido detectado em sistemas de esgotamento sanitário. Entretanto, muitos desses contaminantes apresentam um padrão de consumo menor em comparação ao da cafeína. Além disso, a cafeína tem elevada solubilidade em água e é recalcitrante aos processos normalmente usados nas estações de tratamento de efluentes (ETE's), o que torna essa substância um indicador de contaminação antrópica. Conforme o estudo realizado por Cantwell *et al* (2016), realizado em Boston, USA, foi demonstrada a eficácia da utilização da cafeína como um indicador de contaminação de águas residuais sanitárias em estuários urbanos. A utilização da cafeína como um indicador de contaminação antrópica por efluente doméstico está sendo amplamente utilizado pelo mundo pelo fato de que a cafeína tem uma meia-vida de aproximadamente 30 dias em ambientes naturais, fazendo com que a sua detecção seja facilitada mesmo alguns dias após a contaminação, sendo assim, seu comportamento é mais estável e conservado do que outros indicadores mais usuais como o nitrogênio (GONÇALVES *et al*., 2017). Sendo assim, a cafeína já vem sendo utilizada como um indicador de contaminação humana em águas residuais pelo mundo (NÖDLER *et al*., 2016), podendo, inclusive, ser utilizada como um marcador de recente contaminação fecal, conforme Daneshvar *et al.* (2012).

A presença da cafeína já foi detectada em estudos anteriores na Baía de Santos, onde PEREIRA *et al*. (2016) observou concentrações entre 84,4 a 648,9 ng L^{-1}.

Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Detectar a ocorrência e quantificar as concentrações de cafeína em água superficial marinha da Baía de Santos, SP;
- Verificar se as concentrações encontradas na Baía de Santos são capazes de causar efeito tóxico a organismos marinhos, de acordo com estudos pretéritos;
- Analisar o perigo ambiental marinho (HQ) com as concentrações de cafeína encontradas;

- Verificar a relação entre a contaminação por cafeína e a balneabilidade em zonas costeiras;
- Propor a cafeína como um marcador químico de contaminação por efluente doméstico na Baía de Santos, SP;
- Propor alternativas para retirada de contaminantes emergentes em tratamento de esgoto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e coleta de amostras

A Baía de Santos (São Paulo, Brasil) abrange os municípios de Santos e São Vicente, caracterizados por uma densa área urbana onde segundo dados do IBGE (2019), a população estimada em 2018 era de 432.957 habitantes. Trata-se de uma região formada por um complexo industrial petroquímico e o maior porto da América Latina, além da alta densidade populacional e atividade turística de veraneio. Segundo relatado por Abessa *et al*., (2005) a Baía de Santos recebe diariamente mais de 7,367 m^3 de esgoto pré-condicionado. A estação de pré-condicionamento de esgoto (EPC) recebe efluentes dos municípios de Santos e São Vicente. Após o pré-concionamento, o esgoto é lançado na Baía de Santos pelo emissário submarino a 10 metros de profundidade, numa área localizada a 4,5 km de distância da praia (PEREIRA *et al*., 2016).

A Baía de Santos recebe também as águas dos canais de drenagem urbana, além da potencial carga poluidora oriunda dos canais dos estuários de Santos e São Vicente (HARARI *et al*., 2013).

Ainda de acordo com Harari *et al.* (2013), estes canais de drenagem construídos por toda a extensão praiana possuem comportas as quais permanecem fechadas quando não há chuvas. Entretanto, quando ocorrem precipitações volumosas, estas comportas são abertas, possibilitando assim o recebimento de efluentes no corpo marinho causando possíveis contaminações por esgotos domésticos vindos destes canais.

A fim de realizar uma avaliação ampla da contaminação de cafeína na baía de Santos, incluindo a zona de praias, foram coletadas amostras de água em 14 pontos no entorno dos difusores do emissário submarino de Santos, situados no centro da baía em uma profundidade média de 10 m, bem como nos canais estuarinos e zona de praia. A Figura 2 apresenta os pontos de coleta.

Figura 2. Pontos de coleta de água na Baía de Santos, SP.

Para cada ponto foi coletado 1L de água com auxílio de uma garrafa Van Dorn, acondicionadas em garrafas âmbar, transportadas para o laboratório e armazenadas em freezer (-20 ºC) até o momento das análises. Parâmetros físico-químicos (TºC, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e potencial de oxirredução) foram medidos no momento da coleta com uma sonda multiparamétrica modelo YSI Yellow Spring.

2.2. Extração por fase sólida (EFS)

As amostras de água foram submetidas à extração por fase sólida (EFS) de acordo o procedimento adaptado de Wille *et al*. (2010) e Ghoshdastidar *et al*. (2015). Foram utilizados cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) para extração e obtenção dos eluatos. (Figura 2).

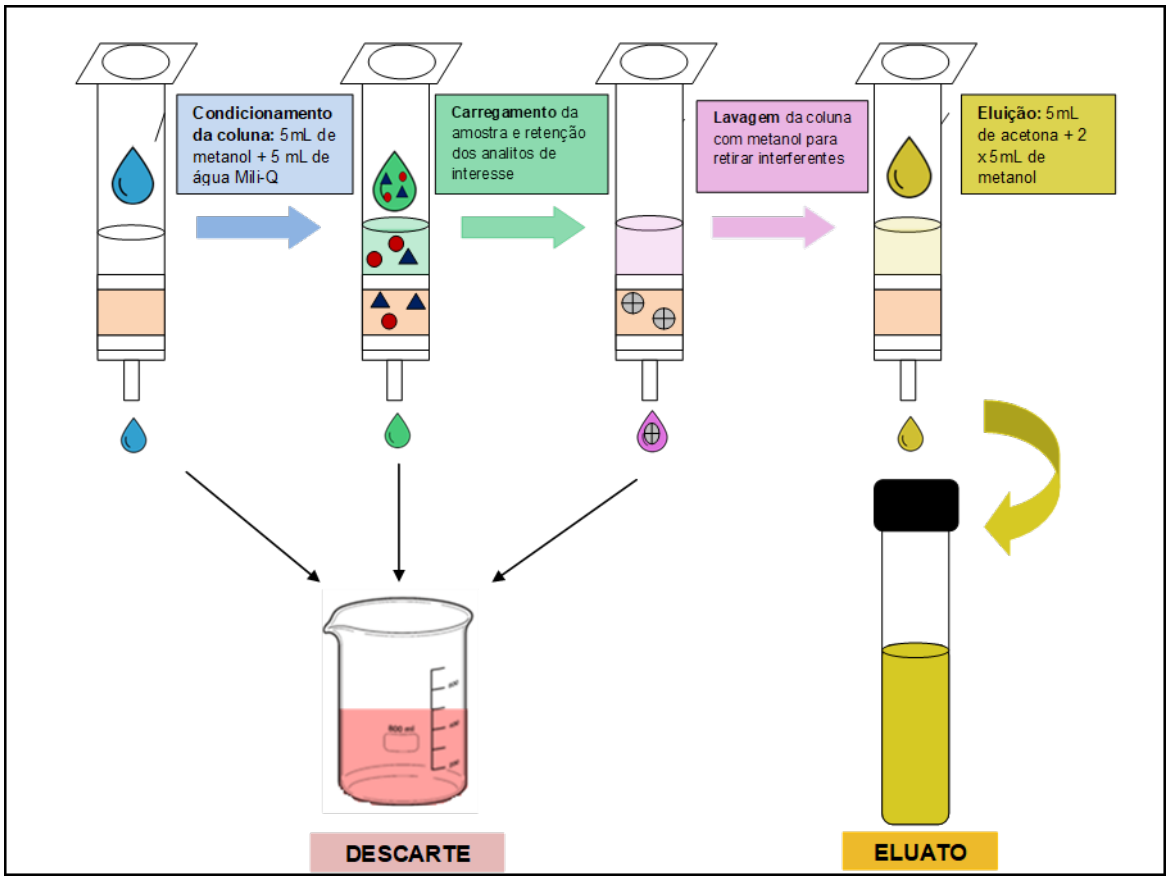


Figura 3. Esquema de extração em fase sólida (EFS) (FONTES, 2016).

As amostras de água do mar foram preparadas de acordo com Pereira *et al*. (2016). Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para 7,0±0,5 antes da extração, utilizando uma solução de HCl (1M) e, posteriormente, as amostras foram filtradas através de papel filtro Whatman (diâmetro GF / C 47 mm, retenção de partículas 1,2 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os filtros foram lavados com 2 ml de metanol e o extrato de metanol recolhido foi adicionado à amostra filtrada. As amostras foram então submetidas à extração em fase sólida usando cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com 5 ml de metanol e 5 ml de água Milli-Q e as amostras filtradas (misturadas com extrato de metanol) foram carregadas nos cartuchos. Após as amostras terem sido carregadas, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Mili-Q (2 vezes) e depois secos sob vácuo durante 30 minutos. A etapa de eluição foi realizada com 5 mL de acetona e duas vezes com 5 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 1 mL com solução de água/acetonitrila (95: 5, v / v) e filtradas em filtro de 0,45 µM (Millipore) antes da análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector espectrometria de massas do tipo triploquadrupolo linear "iontrap" (MS/MS)

Para determinação da cafeína nas amostras de água marinha, 10 µL do eluato de cada amostra foram analisadas por um HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido íon trap/LC-QqLIT ABSciex, Ontario (Canadá). As amostras de água do mar foram analisadas por uma coluna Agilent Eclipse XDB-C18 4,6 × 50 mm, 1,8 µm a 25°C, e a fase móvel em 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS Grade) em água (solvente A) e acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Um gradiente linear de 0,7 mL· min−1 foi usado, começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A concentração do solvente "A" diminuiu linearmente de 95% para 5% ao longo de 5 min e esta condição foi mantida por 1 minuto. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 minutos e a cafeína foi detectada e quantificada usando fonte de ionização por "electrospray" (ESI - modo positivo) no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar o composto (Tabela 2) (PEREIRA *et al*., 2016). Os parâmetros da fonte de íons adotados foram (i) gás de interface - 20 a.u; (ii) gás de colisão - 8 a.u; (iii) voltagem da ESI - 5500; (iv) temperatura do gás de origem - 650ºC; (v) gás do nebulizador - 45 a.u; (vi) gás de aquecimento - 65 a.u. Posteriormente foi empregada uma curva de calibração matriz, como descrito por Wille *et al*., (2010).

Tabela 2. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.

Fármaco	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Cafeína	195,2	138,3 110,1	26 26	19 29	4 4	0,1	8,5	3,42

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de desagregação); CE (energia de colisão); CXP (Potencial de Saída de Colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção). No Q3, na célula superior, encontra-se o íon quantificador e na célula inferior o íon qualificador.

2.4. Dados de Balneabilidade.

A fim de verificar a relação entre as concentrações de cafeína encontradas na baía de Santos com a balneabilidade das praias da região, foram verificados, primeiramente os resultados das classificações das praias de Santos durante o período da coleta (mês de setembro de 2018), através dos dados coletados pela CETESB. Após este levantamento de dados, foi realizada uma análise comparativa destes resultados de balneabilidade com as concentrações encontradas na baía de Santos.

No Estado de São Paulo, Brasil, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) é o órgão responsável por avaliar e divulgar a balneabilidade das praias, medindo, entre outros fatores, os níveis de *enterococos*, o qual, de acordo com o CONAMA 274/2000, deve ter valor inferior 100 UFC (Unidade Formadora de Colônias) em 80% do tempo, para que seja classificada como própria ao banho de mar (CONAMA 274/00).

Os critérios para classificar uma praia como própria ou imprópria foram estabelecidos na Resolução Conama nº 274/2000 vigente desde janeiro de 2001 e na Decisão de Diretoria – CETESB DD nº112-2013-E. De acordo com esta resolução e decisão acima citada, o critério adotado pela CETESB para águas marinhas é baseado na densidade de *enterococos*. Caso as concentrações de *enterococos* sejam superiores a 100 UFC/100 mL, em duas ou mais amostras de um conjunto de cinco semanas, ou apresentar valor superior a 400 UFC/100 mL na última amostragem, fica caracterizada a impropriedade da praia para recreação de contato primário.

A utilização dos cinco resultados considera a grande variabilidade dos dados microbiológicos, representando a tendência de qualidade da praia. Sua classificação, como imprópria, indica, portanto, um comprometimento na qualidade sanitária das águas, implicando em um aumento no risco à saúde do banhista e tornando desaconselhável a sua utilização para o banho (MARTINS *et al*., 2018).

Para realizar as classificações das praias, a Companhia Ambiental utiliza os Limites de coliformes termotolerantes, *E. coli e enterococos* por 100 mL de água, para cada categoria (CONAMA 274/00).

2.5. Critérios para a classificação do perigo ambiental

Com a finalidade de determinar uma classificação do perigo ambiental causado pela presença da cafeína no ecossistema foi utilizada uma abordagem determinística de avaliação aplicada às amostras coletadas neste estudo, conforme aplicado por Dafouz (2018). Com este método foram calculados os quocientes de perigos individuais (*Hazard Quotient* - HQ) para cada local de amostragem a fim de determinar o potencial de efeito derivado da exposição à cafeína no meio marinho.

O HQ é definido pelo Departamento de Meio Ambiente dos Estados Unidos por meio da Agência de Proteção Ambiental (US EPA) pela razão entre a exposição potencial para uma substância e sua concentração abaixo da qual nenhum efeito é esperado (US EPA, 1997a; US EPA, 1997b).

O valor potencial de exposição foi considerado como a concentração ambiental medida (MEC) em cada local de amostragem.

Devido à liberação contínua de cafeína nos ambientes estudados, a exposição crônica foi considerada o cenário de exposição mais adequado para a avaliação.

Para mensuração dos perigos de efeitos crônicos relacionados à presença de cafeína, foram selecionados alguns organismos bioindicadores na literatura, observando as concentrações de efeito não observado (CENO) para cada organismo estudado.

A PNEC (Concentração sem Efeitos Previstos) foi calculada pela menor CENO encontrada, a fim de explicar qualquer incerteza associada aos dados disponíveis. Assim, para determinar o valor da PNEC, foi calculada a menor CENO em organismos estudados nas literaturas. O HQ foi então calculado como HQ = MEC / PNEC. Sendo que, se o valor de HQ for menor que 0,1, não são esperados efeitos adversos; se o valor estiver entre 0,1 e 1, alguns efeitos adversos podem ser levados em consideração; se o valor obtido for entre 1 e 10, é provável que possam ocorrer efeitos adversos; finalmente, se a HQ for maior que 10, os efeitos adversos são mais prováveis (US EPA, 1997a).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Concentrações de cafeína na baía de Santos

Após a análise por espectrometria de massas, foram obtidos os seguintes resultados para cada um dos 14 pontos, conforme Tabela 3 e Figura 4.

Tabela 3: Resultados das concentrações em cada ponto de coleta

Pontos	Cafeína (ng L^{-1})
01	495
02	611
03	624
04	1322
05	299
06	321
07	263
08	260
09	291
10	305
11	288
12	404
13	333
14	386

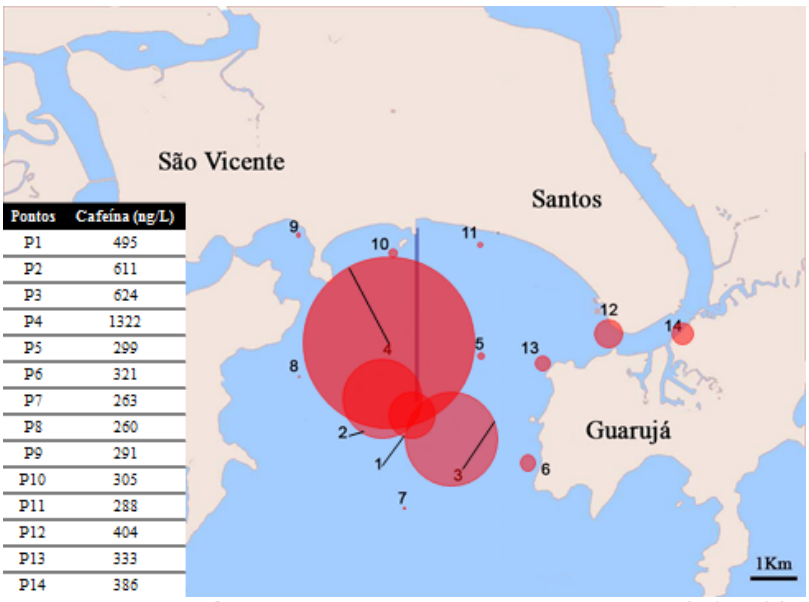


Figura 4: Resultados das análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS) em ng L^{-1} dos 14 pontos de coleta.

Comparando as concentrações encontradas nos 14 pontos da baía de Santos, observa-se que a maior concentração de cafeína quantificada foi no ponto 04, com 1.322 ng L^{-1}. Conforme demonstrado na figura 04, este ponto

encontra-se próximo aos difusores do emissário, levando assim à hipótese de que a concentração foi maior devido à sua proximidade.

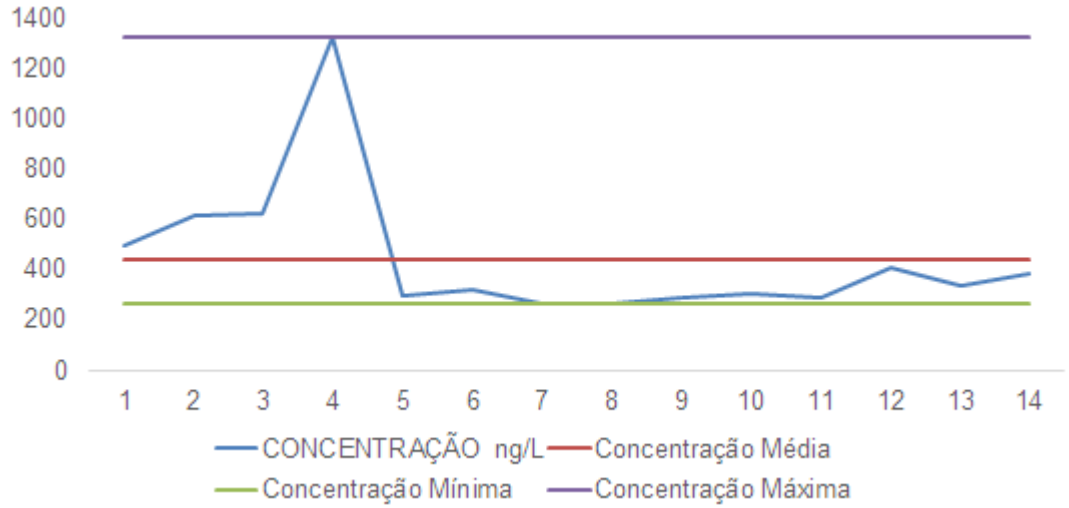


Figura 5: Concentrações (ng L^{-1}) nos pontos de coleta.

Conforme demonstrado na figura 05, praticamente todos os pontos estão abaixo da média de 443 ng L^{-1}, com exceção dos pontos 01; 02; 03; 04, os quais estão justamente próximos dos difusores. Os demais pontos, que estão mais distantes dos difusores, resultaram em concentrações abaixo da média, demonstrando uma dispersão maior da cafeína.

O destaque de maior concentração de cafeína encontrado no ponto 04 pode ser devido à preamar no horário da coleta, deslocando a pluma para a costa, conforme tábua das marés (Tábua de Marés, 2019).

Com relação à dispersão dos dados coletados, praticamente todos os pontos encontram-se próximos à curva de dispersão, com exceção do ponto 04, conforme ilustrado na figura 06. Isso demonstra que há uma tendência de queda dos resultados, pois, quanto mais longe dos difusores, menores são as concentrações de cafeína encontradas.

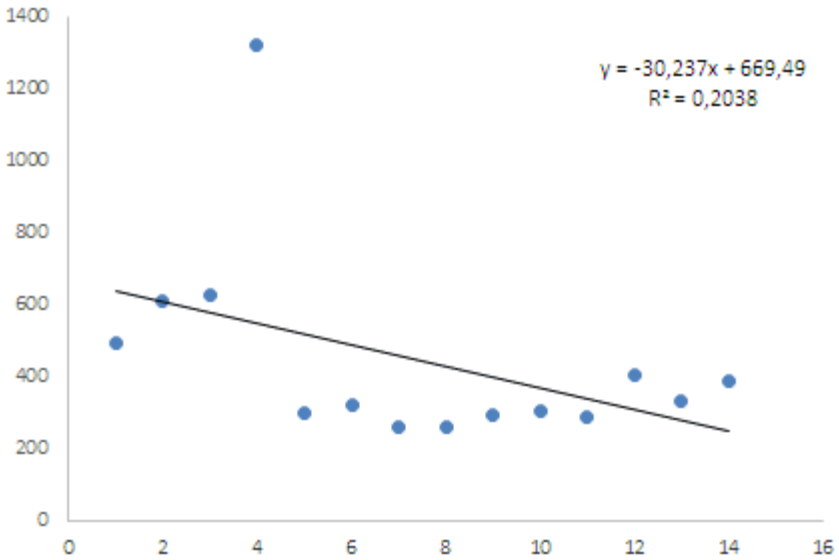


Figura 6: Diagrama de Dispersão (ng L^{-1}) nos pontos de coleta.

Há uma tendência de queda dos resultados, pois, quanto mais longe dos difusores, menores são as concentrações de cafeína encontradas. Esta diferença de concentrações encontradas podem ter ocorrido devido às interferências de variáveis ambientais, tais como, radiação solar, temperatura, salinidade, hidrodinâmica, entre outras as quais influenciam na dispersão de plumas, principalmente com a pressão dos jatos de efluentes lançados em emissários submarinos (FERREIRA, 2015).

3.2. Comparação entre as concentrações encontradas na baía de Santos com outras zonas costeiras e rios.

Em 2014 foi realizado um estudo também na Baía de Santos, a fim de detectar, entre outras substâncias, a presença de cafeína. Nesta pesquisa anteriormente realizada, foi identificada uma concentração máxima de 649 ng L^{-1} (PEREIRA *et al*., 2016). Este resultado foi menor do que a concentração máxima encontrada no estudo atual, de 1.322 ng L^{-1}, uma diferença de 204% entre as concentrações máximas de cafeína encontradas em Santos, nas amostras de 2014 (649 ng L^{-1}) e 2018 (1.322 ng L^{-1}).

Em um estudo realizado em Boston Harbor - USA, em 2016, foi identificado uma variação da concentração de cafeína de 15 ng L^{-1} no porto externo e uma alta de 185 ng L^{-1} no porto interno. De acordo com este estudo, o resultado encontrado no porto interno foi consequência de alguns eventos como, transbordamento de esgoto, bem como de descarga irregular de

efluentes sanitários nos drenos pluviais da cidade. Entretanto, foram realizadas melhorias nos sistemas de águas residuais, bem como, a abertura de um túnel de 14 quilômetros de extensão para liberação dos efluentes para dentro dos sistemas de tratamento, os quais são tratados em até 89%. Assim, após estas melhorias em infraestrutura, Boston Harbor teve uma redução de 86% de contaminação em 27 anos (CANTWEL, *et al*, 2016).

Um estudo realizado em Matosinhos, Portugal em 2017 detectou em todas as amostras coletadas uma concentração variando entre 18 a 525 ng L^{-1}, sendo que os locais detectados com maior concentração de cafeína foram em águas salinas de praias classificadas com excelente qualidade, localizadas em cidades com alta densidade populacional e riqueza turística. Estes resultados de alta concentração de cafeína encontrada nestes locais praianos foram devido à descarga de efluente em emissários submarinos no mar (PAIGA *et al*., 2017). Verifica-se que a concentração máxima encontrada em zonas costeiras em Portugal (525 ng L^{-1}) foi inferior à concentração máxima encontrada em Santos (1.322 ng L^{-1}).

Estudos realizados no mar das Ilhas Lesbos - Grécia em 2016, indicaram a presença de cafeína em uma concentração entre 6,1 ng L^{-1} até 522 ng L^{-1} detectados próximos às bocas de emissários (NÖDLER *et al*., 2016). Foi verificado que a concentração máxima encontrada na Grécia (522 ng L^{-1}) é menor do que a concentração máxima encontrada no presente trabalho (1.322 ng L^{-1}).

De acordo com estudos realizados em Nova Escócia (Canadá) em 2015, foram encontradas concentrações de cafeína de até 115.141 ng L^{-1} em alguns pontos, onde foram detectados incidentes de despejos de esgotos não tratados na região portuária de Metropolitan Halifax. Neste estudo foram coletadas amostras em diferentes pontos em águas receptoras de estações de tratamento de esgoto municipais, detectando, entre outros produtos farmacêuticos e metabólitos, uma forte presença de cafeína em 100% das amostras (GHOSHDASTIDAR *et al*., 2015).

Em 2012 foi realizado um estudo na Ilha de Barbados, no Caribe, detectando a presença de cafeína em amostras de águas residuais em uma concentração entre 100 ng L^{-1} e 6900 ng L^{-1}. Conforme este estudo o crescimento populacional é uma das causas desta contaminação, a qual atinge o ecossistema marinho (EDWARDS *et al*., 2015).

Em 2015 foi realizado um estudo no Golfo de Saronikos e Baía de Elefsis no Mar Egeu localizados no Mar Mediterrâneo, para encontrar entre outros componentes emergentes, a cafeína, variando em concentrações entre 5,2 a 78,2 ng L^{-1}. Neste estudo foi demonstrada a contaminação por ações antrópicas, além de insumos da estação de tratamento de águas residuais (ETE) de Atenas, revelando ser a principal fonte de poluição no Golfo de Saronikos, bem como a contaminação por atividades de navegação, efluentes industriais, dragagem e / ou insumos (ALYGIZAKIS *et al*., 2016).

Em Oregon, em 2012, após estudos realizados em 14 locais no oceano costeiro, foram detectadas concentrações de cafeína na ordem de 44,7 ng L^{-1}, bem abaixo da concentração máxima encontrada na costa Santista. Neste mesmo estudo foram identificadas concentrações de cafeína em rios, na ordem de 152,2 ng L^{-1}. Este estudo revela que locais de mar aberto, como Oregon, apresentam níveis de concentração de contaminantes menores do que em locais como baías fechadas (DEL REY *et al*., 2012).

Durante estudos realizados em Cingapura, reservatórios de água natural apresentaram cafeína em 100% das amostras, com uma concentração de 2.980 ng L^{-1}, em pontos distantes do reservatório, possivelmente devido a vazamentos de efluentes ao longo do rio, diminuindo a concentração em até 644,5 ng L^{-1} mais próximo dos reservatórios de água doce. Esta diminuição de concentração ao longo do rio deve-se aos efeitos de fotólise, assim como a diluição e biodegradação, os quais podem estar eliminando processos para cafeína (YOU *et al*., 2015). Em comparação aos resultados encontrados em Santos, a concentração máxima detectada neste estudo em Cingapura, em águas doces (2.980 ng L^{-1}), foi muito superior à maior concentração máxima encontrada em Santos (1.322 ng L^{-1}), próxima aos difusores do emissário. Isso sugere que alguns efeitos como salinidade, energia das marés e a hidrodinâmica podem ter influência na dispersão dos contaminantes.

Em estudo realizado em Teresópolis (Estado do Rio de Janeiro, Brasil) foram detectadas concentrações de cafeína em um intervalo entre 160 ng L^{-1} e 47.500 ng L^{-1}, no Rio Paquequer, resultados muito superiores aos encontrados em Santos. De acordo com este estudo, alguns fatores como a presença de cafeína na vegetação, sendo lançada ao corpo d'água em estações chuvosas, assim como, a circulação atmosférica transportando cafeína contaminada pelo ar proveniente de fábricas de torrefação localizadas na cidade, contaminando o

ambiente e as nuvens e consequentemente a chuva contaminada (GONÇALVES *et al*., 2017).

Cesen *et al*., (2019) observaram a presença da cafeína em 83% das amostras, onde a concentração máxima encontrada foi de 49.600 ng L^{-1} na Eslovênia e na Croácia em estações de tratamento de esgoto desaguando em rios da região. Outro estudo realizado nos rios Piraí e Jundiaí, estado de São Paulo, foi detectada a presença de diversos fármacos e inclusive a cafeína em todas as amostras coletadas. Neste estudo foi constatada a concentração máxima de cafeína de 662 ng L^{-1} no rio Piraí e 14.050 ng L^{-1} no rio Jundiaí (DE SOUSA *et al*., 2018).

A Figura 7 compara a concentração máxima encontrada em Santos com os demais lugares analisados em ecossistemas marinhos.

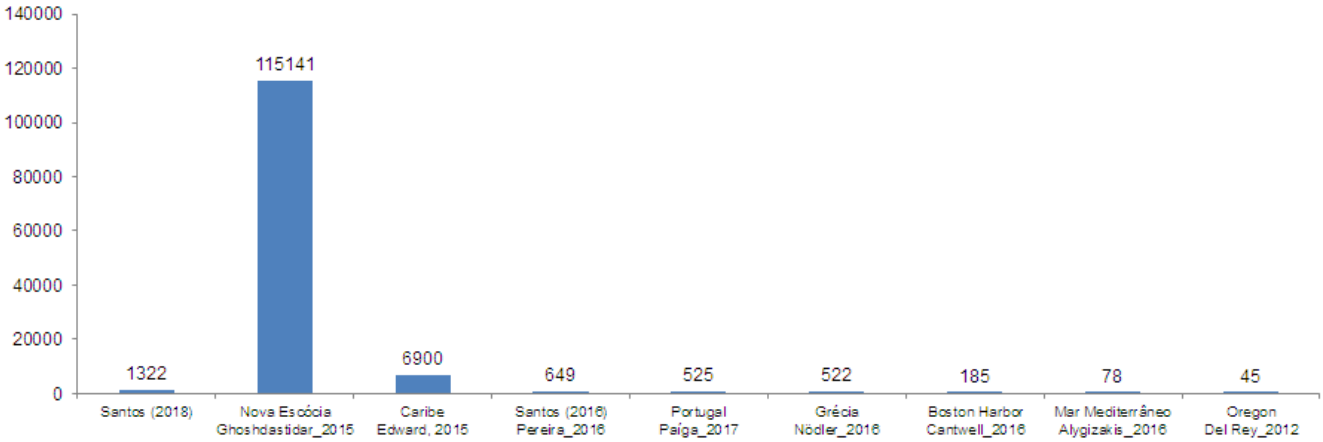


Figura 7: Comparação entre as concentrações máximas (ng L^{-1}) encontradas em Santos e outras zonas costerias.

Comparando a concentração máxima encontrada em Santos na coleta de 2018 com as concentrações máximas encontradas em outras zonas costeiras estudadas, observa-se que Santos teve uma concentração superior a Portugal (525 ng L^{-1}), uma diferença de 252%; Grécia (522 ng L^{-1}), uma diferença de 253%; Boston Harbor (185 ng L^{-1}), uma diferença de 715%; Mar Mediterrâneo (78 ng L^{-1}), uma diferença de 1625% e Oregon (45 ng L^{-1}), uma diferença de 2938%. Todavia, em alguns lugares as concentrações máximas encontradas foram superiores às de Santos, tais como Nova Escócia (115.141 ng L^{-1}), uma diferença de 8710% e Caribe (6.900 ng L^{-1}), uma diferença de 522%.

Comparando as concentrações encontradas em ecossistemas marinhos de Santos com as águas de ecossistemas lênticos e lóticos de outros estudos,

verifica-se que, com exceção de Oregon e Rio Piraí, os outros lugares tiveram concentrações máximas bem acima das concentrações encontradas em Santos, como mostra a figura 08.

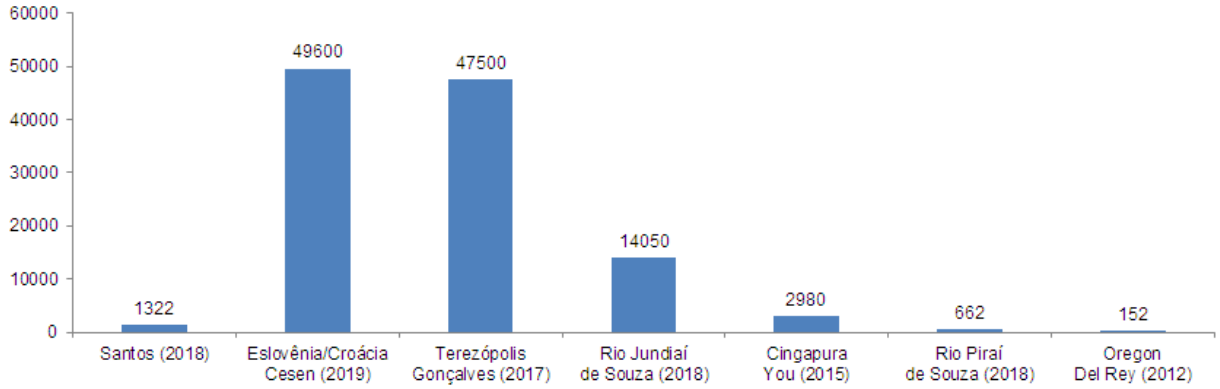


Figura 8: Comparação entre as concentrações máximas (ng L^{-1}) encontradas em Santos com águas doces.

A figura acima demonstra que a concentração máxima detectada em ecossistemas costeiros de Santos (1.322 ng L^{-1}) foi inferior às concentrações máximas observadas em ecossistemas lênticos e lóticos, assim como na Eslovênia/Croácia com uma concentração de 49.600 ng L^{-1}, uma diferença de 3752%; em Terezópolis, com uma com uma concentração de 47.500 ng L^{-1}, uma diferença de 3593%; em Rio Jundiaí com uma concentração de 14.050 ng L^{-1}, uma diferença de 1063% e em Cingapura com uma concentração de 2.980 ng/l, uma diferença de 225%. Já nas águas de rio de Oregon foi detectada uma concentração máxima de 152 ng L^{-1}, inferior à concentração máxima de Santos (1.322 ng L^{-1}), uma diferença de 870%. Assim como no Rio Piraí também com uma concentração máxima de 662 ng L^{-1}, inferior à concentração máxima de Santos (1.322 ng L^{-1}), com uma diferença de 200%. Estas diferenças de concentrações de contaminantes entre diferentes lugares podem ser explicadas por alguns fatores como a climatologia e hidrografia estuarina, o modelo hidrodinâmico do local, o clima, o índice pluviométrico, as características geológicas locais, concentração populacional, energias das ondas, entre outros fatores, os quais influenciam na dispersão ou persistência destas substâncias no corpo receptor aquático (NEVES, 2008).

Assim, conforme os resultados encontrados na baía de Santos há uma necessidade de maior atenção e investimentos em saneamento para degradação de contaminantes emergentes, conforme foi realizado em Boston Harbor, US, (CANTWEL *et al.*, 2016).

3.3. Comparação entre a concentração de cafeína e balneabilidade

Foi realizada uma análise das concentrações de cafeína coletadas nos pontos de praia, com os resultados de balneabilidade e quantidade de *enterococos* conforme dados divulgados pela CETESB.

Os pontos de coleta localizados em zonas de praia (área de recreação) deste estudo foram: ponto 09 (Gonzaguinha – São Vicente); ponto 10 (Rua Frederico Ozanan – José Menino – Santos); ponto 11 (Gonzaga – Santos); ponto 12 (Ponta da Praia – Santos).

A tabela 4 apresenta uma comparação entre concentração de cafeína (ng L^{-1}) x quantidade de *enterococos* (UFC/100ml) x classificação de balneabilidade (CETESB) nos pontos de praia.

Tabela 4: Comparação entre quantidade de cafeína (ng/l) x quantidade de *enterococos* (UFC/100ml) x classificação de balneabilidade (CETESB) nos pontos de praia

Ponto x CAF (ng L^{-1}) 25/09/2018	P.09 Gonzaguinha (291 ng L^{-1})	P.10 José Menino (305 ng L^{-1})	P.11 Gonzaga (288 ng L^{-1})	P.12 Ponta da Praia (404 ng L^{-1})
02/09/2018				
Enterococos	124	11	23	71
Classificação	Imprópria	Imprópria	Própria	Imprópria
09/09/2018				
Enterococos	39	05	03	43
Classificação	Imprópria	Própria	Própria	Própria
16/09/2018				
Enterococos	39	01	32	37
Classificação	Imprópria	Própria	Própria	Própria
23/09/2018				
Enterococos	30	09	11	12
Classificação	Imprópria	Própria	Própria	Própria
30/09/2018				
Enterococos	80	104	08	184
Classificação	Própria	Imprópria	Própria	Imprópria

Conforme a tabela 4 a praia com maior quantidade de *enterococos* na semana da coleta (23/9/2018) foi a do Gonzaguinha – São Vicente (ponto 09) com 30 UFC/ml, com uma quantidade de cafeína de 291 ng L^{-1}, sendo classificada como imprópria, apesar da quantidade de *enterococos* estar inferior a 100 UFC/ml. Esta praia foi classificada como imprópria neste período, provavelmente devido a outros fatores não abordados nesta pesquisa.

Foi verificado que o ponto 12 (Ponta da Praia) teve a maior concentração de cafeína, com 404 ng L^{-1}. Entretanto, a concentração de *enterococos* nesta semana estava com 12 UFC/ml, sendo que a praia classificada como própria para banho.

Fazendo uma análise mensal, evidencia-se que os pontos com maior percentual de *enterococos* acima de 100 UFC/ml foram os pontos 09 (Gonzaguiha), 10 (José Menino) e 12 (Ponta da Praia), as três com 20% das coletas, ou seja, das 05 coletas realizadas no mês apenas 01 estava acima do permitido, de acordo com a resolução do CONAMA 274/00.

Referente ao percentual mensal de balneabilidade imprópria, o ponto 10 (José Menino) estava imprópria para banho em 80% das coletas, ou seja, das 05 amostras realizadas neste mês 04 foram classificadas desta forma. Os pontos 10 (José Menino) e 12 (Ponta da Praia) estavam ambas impróprias em 40% e o ponto 11 (Gonzaga) estava própria o mês inteiro, não sendo registrada nenhuma amostra acima de 100 UFC/ml de *enterococos* e uma concentração de cafeína inferior aos demais pontos de praia com 288 ng L^{-1}.

Observou-se então uma correlação positiva (0,88) entre a concentração de cafeína e *enterococos*, de acordo com os dados da CETESB para a data 30/09, evidenciando um aumento desta bactéria conforme o aumento da concentração de cafeína.

De acordo com o Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo, a classificação das praias de Santos durante o mês de setembro (período de coleta) foi considerada como própria para banho de mar. A Figura 9 mostra o percentual de balneabilidade das praias de Santos durante o mês da coleta.

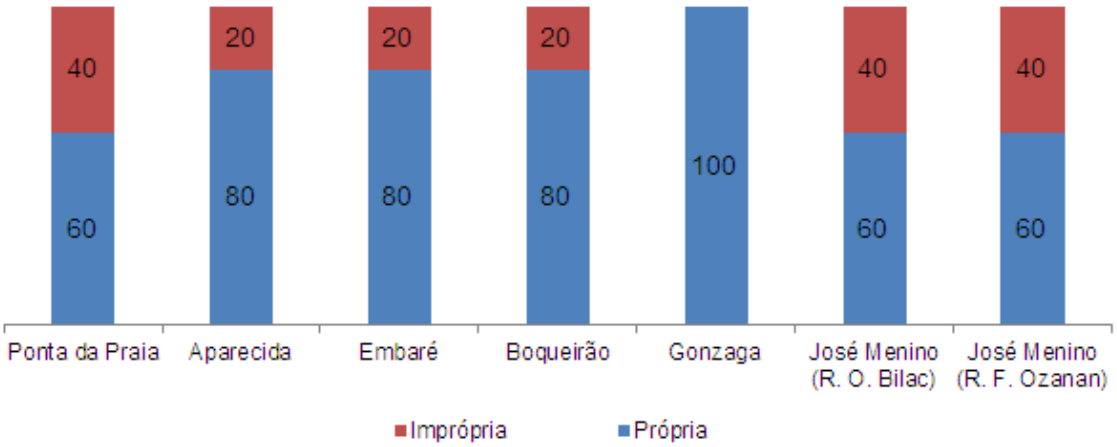


Figura 9: Percentual de balneabilidade das praias de Santos durante o mês da coleta - setembro de 2018 (CETESB, 2018).

Verifica-se na figura 08 que todas as praias monitoradas pela CETESB obtiveram mais de 60% de classificação de balneabilidade como própria para

banho de mar. Assim, apesar das concentrações de cafeína encontradas em Santos durante o mês de setembro de 2018, as praias estavam classificadas como próprias segundo os critérios adotados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Todavia, o a Ponta da Praia apresenta as menores porcentagens de balneabilidade própria (60%), resultado coerente com as maiores contrações de cafeína em praia (404 $ng.L^{-1}$).

Em um estudo realizado na Ilha de Montreal, relacionando a presença de cafeína com a quantidade de coliformes fecais, foi especificado que um limiar de 400 $ng.L^{-1}$ nos permite identificar amostras com contaminação fecal elevada, definido por mais de 200 unidades formadoras de colônias por 100 ml (UFC 100 ml/l) de coliformes fecais. Neste estudo as concentrações de cafeína estavam bem correlacionadas com coliformes fecais (SAUVÉ *et al*., 2011).

Esta correlação, entre a presença de cafeína com coliformes fecais, pode ser verificada também em estudos realizados na região da Grande Montreal, onde a presença substancial de cafeína foi identificada em praticamente todos os testes com coliformes fecais, de acordo com as amostras realizadas (DANESHVAR *et al*., 2012).

Pesquisas recentes se concentraram apenas em indicadores químicos para determinar contaminantes fecais humanos na água (PAIGA *et al*., 2017). Em estudo realizado nas praias de Portugal, correlacionando a incidência de cafeína com a balneabilidade, foi detectada a presença de cafeína na concentração de 18 a 525 ng L^{-1}, sendo que a maior concentração média de cafeína foi encontrada em amostras de água do mar coletadas em praias classificadas como próprias para banho, de acordo com os critérios locais (PAIGA *et al*., 2017).

Esta concentração encontrada em Portugal neste estudo está de acordo com o encontrado na baía de Santos. Assim, pode-se dizer que a incidência de cafeína não interfere na balneabilidade das praias pelos critérios atuais adotados pelo mundo.

Conforme estabelecido pelo Massachusetts Water Resources Authority (MWRA), órgão responsável pelo monitoramento de recursos hídricos de Boston, O Departamento de Saúde Pública de Massachusetts adotou o padrão Enterococcus para balneabilidade (WERME *et al*., 2017). Entretanto, deveriam incluir, também, outros critérios mais eficientes para detectar outros contaminantes tão prejudiciais quanto os microbiológicos, tais como os

contaminantes emergentes. Todavia, já existem na Europa alguns movimentos no sentido de considerar outros parâmetros para medir a balneabilidade, como resíduos sólidos encontrados nas águas (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2018).

Conforme estudos realizados em Boston Harbor (CANTWEL *et al.*, 2016), os limites diários de bactérias de coliformes fecais estavam dentro dos limites estabelecidos pelo MWRA. Levando em consideração que as contagens diárias de bactérias e coliformes fecais indicadoras de esgoto não excederam 14.000 coliformes por 100 mililitros no ponto de decloração, imediatamente antes da descarga, este limite de permissão diário foi cumprido durante todo o período de acompanhamento. Desde 2008, quase metade de todas as amostras não tiveram bactérias coliformes fecais detectáveis, e a contagem máxima foi apenas 501 coliformes fecais por 100 mililitros (WERME *et al.*, 2017).

Em Cingapura, os parâmetros adotados pelo NEA (National Environment Agency) para determinar a balneabilidade das praias para recreação são: 95% do tempo, a contagem de Enterococcus deve ser menor ou igual a 200 contagens por 100 mililitros de água; suscetibilidade do local à influência fecal. Apenas praias classificadas como 'boas' ou melhores serão consideradas adequadas para atividades de contato primário (NEA, 2018).

Apesar de estudos realizados em Cingapura detectar a presença de cafeína em 100% das amostras, com concentrações variando entre 644,5 ng L^{-1} e 2980 ng L^{-1} (You *et al.*, 2015), foi verificado que todas as praias monitoradas pelo órgão responsável estão próprias para atividades recreativas, durante um período de três anos (NEA, 2018).

Portanto, existe uma real necessidade do desenvolvimento de políticas públicas com relevância internacional para alcançar uma modernização nos monitoramentos de balneabilidade, inserindo outros indicadores relevantes, tais como a cafeína.

3.4. Efeitos tóxicos da cafeína em organismos aquáticos.

De acordo com estudo reallizado por Aguirre *et al*. (2015), foi identificado efeito em exposições a cafeína durante 21 dias a 100 ng L^{-1} em enzima de detoxificação (GST – Glândula Digestiva) e na estabilidade da membrana

lisossomal de hemócitos (LMS), causando citotoxicidade e estresse fisiológico em *Corbicula fluminea* expostos à cafeína. Conforme esta autora, a LMS foi significativamente afetada por todas as concentrações testadas. Comparando com o presente estudo, todos os pontos coletados ficaram acima de 100 ng L^{-1}, podendo causar efeitos subletais em organismos presentes na baía de Santos, considerando que a cafeína tem uma meia vida de 30 dias. De acordo com o mesmo estudo, bivalves expostas a 15.000 e 50.000 ng L^{-1} de cafeína apresentaram aumento de atividade de GPX em comparação com o controle, enquanto as atividades de GR e DNA aumentaram significativamente apenas quando os moluscos foram expostos a 50.000 ng L^{-1} de cafeína por um período de 21 dias. Estas concentrações estão bem acima da concentração máxima encontrada na Baía de Santos (1.322 ng L^{-1}), ou seja, a não seriam esperados efeitos genotoxicos (DNA).

Em outro estudo realizado em laboratório, Aguirre *et al*. (2014) avaliaram efeitos da cafeína em resposta à bioluminescência de bactérias *V. fischeri*, além de teste de inibição de crescimento com *I. galbana* e *P. subcapitata* e testes de fertilização com ouriço do mar (*Paracentrotus lividus)*. Nesse estudo foi verificado que a cafeína causou diferenças na bioluminescência em bactérias *V. Fischeri* em exposições a concentração variando de 200-18.000 mg L^{-1}. A inibição de crescimento da *I. galbana* e *P. subcapitata* foi observada após exposição a concentrações de 100-500 mg L^{-1}. Foi verificado também que para provocar um efeito agudo sobre a fertilização do ouriço do mar, foram necessárias exposições a 10.000 e 50.000 mg L^{-1}. Essas concentrações são muito superiores aos valores encontrados em Santos (µg L^{-1}).

Foi observado efeito crônico durante o desenvolvimento embrio-larval de ouriço do mar, onde houve um declínio significativo na porcentagem de plúteo normal expostos à cafeína entre 0,00001 mg L^{-1} (10 ng L^{-1}) a 0,015 mg L^{-1} (15.000 ng L^{-1}), demonstrando diminuição no desenvolvimento embriolarval de 63% para 29% respectivamente (AGUIRRE *et al*., 2014). Pode se dizer, assim, que a cafeína não provoca efeitos agudos nos organismos testados em concentrações ambientais, no entanto, foi observado um efeito crônico no desenvolvimento embriolarval na faixa de 0,00001 a 0,015 mg L^{-1} com efeito teratogênico significativo em *Paracentrotus lividus*. Por meio deste experimento relata-se que as concentrações encontradas em Santos podem afetar

organismos marinhos, especialmente em fase embrionária, podendo assim, comprometer processos reprodutivos.

Em um estudo realizado para avaliar o efeito da cafeína em hemolinfa de *Ruditapes philippinarum* na estabilidade da membrana lisossomal (LMS), em uma concentração variando entre 100 ng L^{-1} a 50.000 ng L^{-1}, foi observado que após 35 dias de pesquisa, obtendo uma concetração de cafeína de 15.000 ng L^{-1}, obteve uma redução de 50% da LMS em relação ao primeiro dia da pesquisa (AGUIRRE *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado na Espanha, em águas continentais foram testados os efeitos para duas espécies: *Daphnia magna* e *Diacyclops crassicaudis* à cafeína. Foi identificado efeito agudo em *Diacyclops crassicaudis crassicaudis* em uma concentração superior a 395.000 µg L^{-1} de cafeína. Foi observado efeito agudo em *Daphnia magna*, em uma concentração de cafeína superior a 5.280 mg L^{-1} (DI LORENZO *et al*., 2019). Estas concentrações encontradas estão muito superiores aos valores verificados em Santos em ng L^{-1}. Em estudo realizado para avaliar os efeitos da cafeína em *Prochilodus lineatus*, os quais foram expostos à cafeína em concentrações de 300, 3000 e 30000 ng/L por um período entre 24 a 168 horas, resultaram em uma redução na atividade de biotransformação, enzima etoxresorufina-O-deetilase (EROD) no cérebro, um aumento significativo no fígado. Com os resultados deste estudo, foi verificada a interferência da cafeína no processo de biotransformação do *Prochilodus lineatus*, após 168 horas de exposição, porém, não propiciou perturbações necessárias para causar estresse oxidativo (SANTOS-SILVA *et al*., 2018).

Em testes realizados por Maranho *et al*. (2015) com sedimentos marinhos contaminados com cafeína foram verificadas respostas letais e subletais relacionadas a diferentes fases do metabolismo (atividades enzimáticas das fases I e II), neurotoxicidade (atividade da acetilcolinesterase), estresse oxidativo (peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes) e danos genéticos (quebras de DNA) foram analisadas para avaliar possíveis efeitos adversos da cafeína. Nestes testes, o crustáceo anfípode *Ampelisca brevicornis* foi escolhida como espécie bioindicadora. Este estudo demonstrou a biodisponibilidade da cafeína na biota marinha da seguinte forma: fases I e II, onde foi verificado um estresse oxidativo com efeitos adversos em uma concentração de 1 ng g^{-1} e podendo causar a mortalidade em uma

concentração de 624 ng g^{-1}, além de alterações de quebras de fita de DNA com efeitos adversos em uma concentração de 1 ng g $^{-1}$ e podendo causar a mortalidade em uma concentração de 307 ng g^{-1} de em anfípodes expostos à cafeína em sedimentos marinhos. Evidencia-se assim que as concentrações encontradas em sedimentos marinhos que causam mortalidade, de acordo com este estudo, vão ao encontro das concentrações encontradas em água na Baía de Santos.

De acordo com os estudos verificados, a cafeína pode causar efeitos em enzima de detoxificação (GST – Glândula Digestiva) e na estabilidade da membrana lisossomal, causando a citotoxicidade e estresse fisiológico em Corbicula fluminea, com 100 ng L^{-1} (Aguirre *et al*., 2015), podendo, assim causar os mesmos efeitos a organismos em Santos, com uma concetração de cafeína de até 1.322 ng L^{-1}.

Foi observado um efeito crônico de retardo de crescimento durante o desenvolvimento embrio-larval de ouriço do mar, exposto a uma concentração de cafeína 0,00001 mg L^{-1} (10 ng L^{-1}) a 0,015 mg L-1 (15.000 ng L^{-1}), (Aguirre *et al*., 2014). Com a concentração encontrada em Santos, o contaminante estudado pode causar os mesmos efeitos crônicos aos organismos da região de Santos na fase embrio-larval, afetando seu desenvolvimento.

Foi observado que as concentrações encontradas em Santos podem provocar efeitos em *Prochilodus lineatus*, causando a redução na atividade de biotransformação, além da enzima (EROD) no cérebro, um aumento significativo no fígado, além da interferência no processo de biotransformação em uma concentração entre 300 a 3.000 ng L^{-1} (SANTOS-SILVA *et al*., 2018).

Foi constatado, também que as concentrações de cafeína encontradas na baía de Santos, juntamente com o processo de bioacumulação com outros contaminantes podem causar efeitos em peixes de consumo humano (ONDARZA *et al*., 2019), além de causar mortalidade (através de danos no GPX e no DNA), em uma concentração entre 307 ng g-1 e 624 ng g-1, respectivamente no crustáceo *Ampelisca brevicornis* de cafeína impregnada em sedimentos marinhos (MARANHO *et al*., 2015).

No tangente à bioacumulação, Santos-Silva *et al*. (2018) realizaram um estudo nos rios Paraná e Acaraguá, os quais atravessam áreas protegidas na Argentina, para identificar as influências das atividades humanas sobre peixes deste bioma. Foi evidenciada uma importante presença de diversas

substâncias, como fármacos, antibióticos, drogas e a cafeína nos peixes da região. A cafeína representou, neste estudo, 91% do total das concentrações farmacêuticas medidas, variando 1,2 a 13 $\mu g.Kg^{-1}$ do peso corporal. Os maiores níveis de cafeína foram encontrados no fígado (média: 8,1 $\mu g.Kg^{-1}$) seguidos por brânquias e 5,7 e 2,2 $\mu g.Kg^{-1}$, respectivamente. Porém, a cafeína foi encontrada principalmente no músculo de todos os *Prochilodus lineatus* do Rio Paraná (0,8 a 6 $\mu g.Kg^{-1}$), exceto no fígado feminino (0,6 $\mu g.Kg^{-1}$). Estas concentrações de cafeína apresentadas foram menores do que os peixes do Rio Acaraguá. A presença da cafeína em todos os peixes amostrados indica a existência de uma fonte de descargas de efluentes na região, demonstrando a absorção e bioacumulação em peixes da província de Missiones.

3.5. Avaliação de perigo da cafeína em ambientes aquáticos

De acordo com o método de avaliação de perigo exposto no item 2.4 (Critérios para a Classificação do Risco), foram escolhidos alguns organismos bio-indicadores na literatura a fim de observar os efeitos crônicos e respostas, após a exposição às concentrações de cafeína, possibilitando a determinação do valor PNEC pela menor CENO observada.

Tabela 5: Concentrações de efeito não observado (CENO) e respostas em organismos bio-indicadores após exposição à cafeína. CENO (ng L^{-1}).

Espécie	Grupo	CENO ($ng.L^{-1}$)	Endpoint	Referência
P. lividus	Ouriço do mar	10	Desenvolvimento embriolarval	Aguirre-Martinez *et al*. (2014)
Diopatra neopolitana	Polychaeta	500	crescimento	Pires *et al*. (2016)
Corbicula manilensis	Molusco	50000	mortalidade	Aguirre-Martinez *et al*. (2015)
I. galbana	Alga	$5x10^{7}$	Crescimento	Aguirre-Martinez *et al*. (2014)
Bioluminescence V. fischeri	Bacteria	$1x10^{8}$	Mortalidade	Aguirre-Martinez *et al*. (2014)
P. subcapitata	Alga	$1x10^{8}$	Crescimento	Aguirre-Martinez *et al*. (2014)
P. lividus	Ouriço do mar	$1x10^{10}$	Fertilização	Aguirre-Martinez *et al*. (2014)

Com a finalidade de determinar a PNEC de exposição crônica, foi realizado foi realizado um levantamento de estudos que avaliaram a toxicidade da cafeína em organismos aquáticos marinhos. Foram estudadas 06 espécies

diferentes, sendo observados 07 efeitos respostas (*endpoints*), conforme apresentado na tabela 06. Para determinação da PNEC foi considerado o menor valor CENO encontrado de acordo com os efeitos encontrados nos organismos destes estudos, ou seja, o desenvolvimento embriolarval do *P. Lividus*, com a menor concentração de efeito não observado (CENO) de 10 ng L^{-1} de cafeína (Aguirre *et al*., 2014). Considerando o valor CENO = 10, pode-se determinar o valor da PNEC como a menor CENO encontrada (10 ng L^{-1}). Após a determinação do valor PNEC, foi calculado o valor do HQ. A tabela 06 apresenta os valores de HQ para cada ponto de amostragem.

Tabela 6: Mensuração do HQ da cafeína em cada ponto de coleta

Pontos	MEC Caf. (ng L^{-1})	PNEC (ng L^{-1})	HQ
01	495	10	50
02	611	10	61
03	624	10	62
04	1322	10	132
05	299	10	30
06	321	10	32
07	263	10	26
08	260	10	26
09	291	10	29
10	305	10	30
11	288	10	29
12	404	10	40
13	333	10	33
14	386	10	39

Conforme verificado na tabela 06, foram evidenciados valores acima de 10 em todos os pontos amostrados, havendo assim a possibilidade de efeitos adversos, de acordo com os critérios atotados pelo Departamento de Meio Ambiente dos Estados Unidos por meio da Agência de Proteção Ambiental (US EPA), indicando perigo ao ecossistema estudado.

Pode-se observar uma maior criticidade nos pontos 1, 2, 3 e 4, os quais resultaram em HQ's superiores a 50, com destaque para o ponto 04 (difusor do emissário) com HQ de 132. Uma atenção pode ser dada também aos pontos de praia, como o ponto 09 (HQ:29); ponto 10 (HQ:30); ponto 11(HQ:29) e o ponto 12 (HQ:40), possibilitando um possível perigo ambiental em nestes locais.

Considera-se então, que há indicativo de perigo ambiental em todos os pontos de coleta para a biodiversidade marinha da região, sendo esperados efeitos adversos em organismos presentes na Baía de Santos.

3.6. Alternativas para tratamentos do esgoto

Existe a necessidade de novas formas de tratamento de esgoto para uma adequada e eficiente remoção de contaminantes em corpos hídricos.

Como a cafeína pode trazer consigo outras substâncias bioativas tóxicas, há a necessidade de se implantar alternativas nas estações de tratamento de esgoto a fim de que estas substâncias não sejam despejadas nos ambientes aquáticos.

Estudo realizado no Canadá com processo de degradação por fotólise foi verificada a diminuição da cafeína no corpo hídrico após exposição à luz ultravioleta, com uma degradação de 30 dias para 28,5 dias (LAM *et al*., 2004).

Em estudo realizado para verificação de sorção com interações hidrofóbicas para degradação em sistemas aquosos naturais, verificou-se a biodegradação da cafeína em 1,5 dia (LIN *et al*., 2010).

Em outro estudo realizado para avaliar a degradação da cafeína em amostras de água, após a aplicação de processos oxidativos avançados fenton, foto-fenton e fotólise de peróxido de hidrogênio, foi verificado que houve uma redução de 96,9% da cafeína em um experimento com 0,6 $mg.L^{-1}$ de Fe^{+2}, mais 34 $mg.L^{-1}$ de H_2O_2 com uma concentração de cafeína em 0,31 ppm exposta à radiação UV durante 10 minutos (MAFIOLETI, 2016).

Outra alternativa para o tratamento secundário é o tratamento avançado por absorção de carvão ativado. Em um experimento realizado na Suíça para verificar a biotransformação do diclofenaco durante o tratamento de águas residuais, foi constatado que em contato com o lodo ativado ocorreram reações semelhantes à hidroxilação e descarboxilação, apresentando assim a eficácia no tratamento (JEWELL *et al*., 2016).

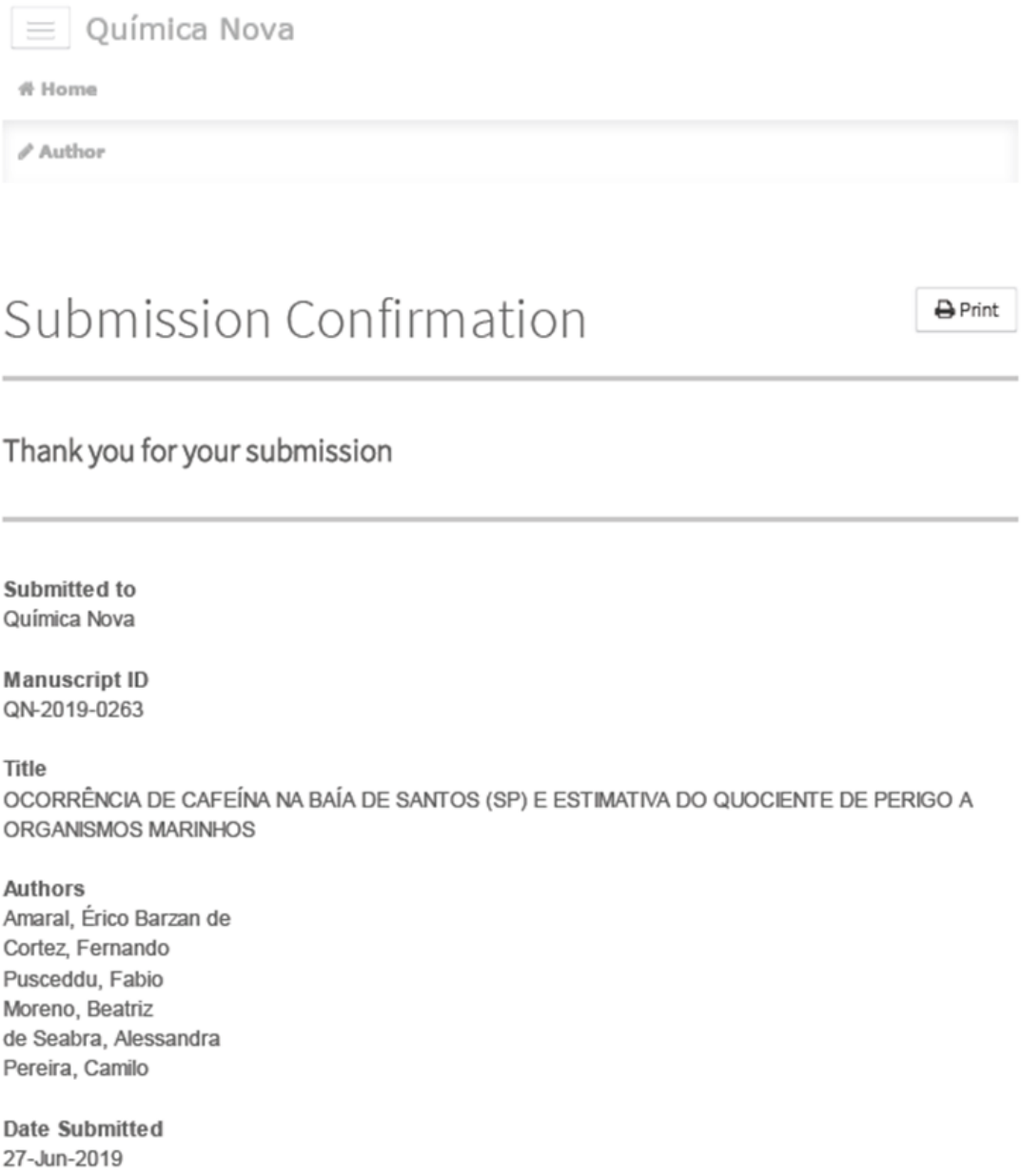
4 CONCLUSÕES

Foi constatado que as concentrações de cafeína encontradas na Baía de Santos variaram de 206 ng L^{-1} a 1.322 ng L^{-1} e foram consideradas altas se comparadas a demais ecossistemas marinhos. Foi observado que existe potencial ocorrência de efeitos tóxicos e consequentemente perigo relacionado a efeitos crônicos, uma vez que a estimativa de HQ foram superiores a 10.

Há evidências de relação entre altas concentrações de cafeína (~ 400 $ng.L^{-1}$) com a presença de micro-organismos indicadores de balneabilidade, e futuros monitoramentos podem empregar a cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico não tratado em regiões costeiras.

Neste estudo foram expostas também algumas alternativas para um tratamento mais eficiente de contaminantes emergentes, tais como os processos oxidativos avançados através de fotólise e os processos de carvão ativado para remoção ou biotransformação destes contaminantes, procurando assim diminuir impactos ambientais.

5 TRABALHO SUBMETIDO.



Química Nova

Home

Author

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to
Química Nova

Manuscript ID
QN-2019-0263

Title
OCORRÊNCIA DE CAFEÍNA NA BAÍA DE SANTOS (SP) E ESTIMATIVA DO QUOCIENTE DE PERIGO A ORGANISMOS MARINHOS

Authors
Amaral, Érico Barzan de
Cortez, Fernando
Pusceddu, Fabio
Moreno, Beatriz
de Seabra, Alessandra
Pereira, Camilo

Date Submitted
27-Jun-2019

6 REFERÊNCIAS.

ABESSA, D. M., CARR, R. S., RACHID, B. R., SOUSA, E. C., HORTELANI, M. A., & SARKIS, J. E. (2005). Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, 50(8), 875-885.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V., DELVALLS, A. T., & MARTÍN-DÍAZ, M. L. (2015). Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on Corbicula fluminea (Müller, 1774). **Ecotoxicology and environmental safety**, 120, 142-154.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V., OWUOR, M. A., GARRIDO-PÉREZ, C., SALAMANCA, M. J., DEL VALLS, T. A., & MARTÍN-DÍAZ, M. L. (2014). Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota. Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. **Chemosphere**, 120, 75-85.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V., BURATTI, S., FABBRI, E., DELVALLS, A. T., & MARTÍN-DÍAZ, M. L. (2013). Using lysosomal membrane stability of haemocytes in Ruditapes philippinarum as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. **Journal of Environmental Sciences**, *25*(7), 1408-1418.

ALYGIZAKIS, N. A., GAGO-FERRERO, P., BOROVA, V. L., PAVLIDOU, A., HATZIANESTIS, I., & THOMAIDIS, N. S. (2016). Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. **Science of the Total Environment**, 541, 1097-1105.

ÁRIAS, DAVID GUITIERREZ. Contaminantes emergentes, seus efeitos no meio ambiente e desafios para novos mecanismos de purificação de água. **Unicamp**, 2013.

BRASIL. Resolução CONAMA n.º 274/2000. Disponível em https://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272. Acesso em 28/12/2018.

BRENELLI, E. C. S. (2003). A extração de cafeína em bebidas estimulantes-uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica**. Química nova**, 26(1), 136-138.

CANELA, MARIA CRISTINA, *ET AL*. 2014. Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. **INCTAA**.

CANTWELL, M. G., KATZ, D. R., SULLIVAN, J. C., BORCI, T., & CHEN, R. F. (2016). Caffeine in Boston Harbor past and present, assessing its utility as a tracer of wastewater contamination in an urban estuary. ***Marine pollution bulletin***, *108*(1), 321-324.

CESEN, M., AHEL, M., TERZIĆ, S., HEATH, D. J., & HEATH, E. (2019). The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. **Science of The Total Environment**, 650, 2446-2453.

CETESB: Classificação Semanal por Municípios 2018. Disponível em https://cetesb.sp.gov.br/praias/classificacao-anual-por-municipios. Acesso em 02/01/2019;

DANESHVAR, A., ABOULFADL, K., VIGLINO, L., BROSÉUS, R., SAUVÉ, S., MADOUX-HUMERY, A. S., & PRÉVOST, M. (2012). Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. **Chemosphere**, 88(1), 131-139.

DEL REY, Z. R., GRANEK, E. F., & SYLVESTER, S. (2012). Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, *64*(7), 1417-1424.

DE SOUSA, D. N. R., MOZETO, A. A., CARNEIRO, R. L., & FADINI, P. S. (2018). Spatio-temporal evaluation of emerging contaminants and their partitioning along a Brazilian watershed. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(5), 4607-4620.

DI LORENZO, T., CASTAÑO-SÁNCHEZ, A., DI MARZIO, W. D., GARCÍA-DONCEL, P., MARTÍNEZ, L. N., GALASSI, D. M. P., & IEPURE, S. (2019). The role of freshwater copepods in the environmental risk assessment of caffeine and propranolol mixtures in the surface water bodies of Spain. **Chemosphere,** *220*, 227-236.

DAFOUZ, R., CÁCERES, N., RODRÍGUEZ-GIL, J. L., MASTROIANNI, N., DE ALDA, M. L., BARCELÓ, D.,& VALCÁRCEL, Y. (2018). Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk. A regional and global study. **Science of the Total Environment**, 615, 632-642.

EDWARDS, Q. A., KULIKOV, S. M., & GARNER-O'NEALE, L. D. (2015). Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. ***SpringerPlus*****,** *4*(1), 57.

EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2018. EUROPEAN BATHING WATER QUALITY IN 2017. ISBN 978-92-9213-951-3 ISSN 2315-1846/1977-8449 doi:10.2800/116560. Disponível em: https://www.eea.europa.eu/publications/european-bathing-water-quality-in-2017. Acessado em 28/12/2018.

FERREIRA, F. R. (2015). Análise da qualidade ambiental das praias do Guarujá (SP) através da avaliação de lançamentos pontuais de esgotos-Emissário Submarino do Guarujá, canais artificiais e rios da Praia do Perequê (Doctoral dissertation, **Universidade de São Paulo**);

FONTES, M. K. (2016). Avaliação do risco ambiental do fármaco diclofenaco em ambientes marinhos (Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de São Paulo**);

GHOSHDASTIDAR, A. J., FOX, S., & TONG, A. Z. (2015). The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. Environmental. **Science and Pollution Research**, 22(1), 689-700.

GONÇALVES, E. S., RODRIGUES, S. V., & SILVA-FILHO, E. V. D. (2017). The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, *12*(2), 192-202.

GOKULAKRISHNAN, S., CHANDRARAJ, K., & GUMMADI, S. N. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, 37(2), 225-232.

HARARI, J., FERREIRA, F. R., DEGASPARI, F. A., & SARTOR, S. M. (2013). Modelagem numérica da hidrodinâmica e da dispersão de esgoto na Baía de Santos, SP. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, 18(1), 205-214.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados. Santos, código: 3548500. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/santos.html?. Acessado em: 12/02/2019;

JEWELL, K. S., FALÅS, P., WICK, A., JOSS, A., & TERNES, T. A. (2016). Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes. **Water research**, 105, 559-567.

LAM, M. W., YOUNG, C. J., BRAIN, R. A., JOHNSON, D. J., HANSON, M. A., WILSON, C. J., ... & MABURY, S. A. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23(6), 1431-1440.

LIN, A. Y. C., LIN, C. A., TUNG, H. H., & CHARY, N. S. (2010). Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. **Journal of Hazardous Materials**, 183(1-3), 242-250.

MAFIOLETI, J. P. (2016). Avaliação da degradação da cafeína em amostras de água usando espectrofotometria após tratamento com processos oxidativos avançados (Bachelor's thesis, **UNIVATES**).

MARANHO, L. A., MOREIRA, L. B., BAENA-NOGUERAS, R. M., LARA-MARTÍN, P. A., DELVALLS, T. A., & MARTÍN-DÍAZ, M. L. (2015). A candidate short-term toxicity test using Ampelisca brevicornis to assess sublethal responses to pharmaceuticals bound to marine sediments. **Archives of environmental contamination and toxicology**, *68*(2), 237-258.

MARTINS, MARIA HELENA R.B; MENEGON, NELSON; LAMPARELLI, CLÁUDIA CONDÉ. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo, página 72. **CETESB**, 2018;

MONTAGNER, C. C., VIDAL, C., & ACAYABA, R. D. (2017). Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Quim. Nova**, 40(9), 1094-1110.

NEA - NATIONAL ENVIRONMENT AGENCY (2018). Recreational Beaches and Fresh Water Bodies. Singapore's water quality guidelines for recreational beaches and fresh water bodies. Disponível em: https://www.nea.gov.sg/our-services/pollution-control/water-quality/recreational-beaches-and-fresh-water-bodies. Acessado em 02/01/2019.

NEVES, RAMIRO; BARETTA, JOB; MATEUS MARCOS. Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America (book). IST Press, 2008.

NÖDLER, K., TSAKIRI, M., ALOUPI, M., GATIDOU, G., STASINAKIS, A. S., & LICHA, T. (2016). Evaluation of polar organic micropollutants as indicators for wastewater-related coastal water quality impairment. **Environmental Pollution**, 211, 282-290.

OLIVEIRA, M. F. (2018). Avaliação da argila Verde-lodo calcinada como adsorvente na remoção de cafeína= Evaluation of calcined Verde-lodo clay as adsorbent for caffeine removal (Dissertação, **UNICAMP**)

ONDARZA, P. M., HADDAD, S. P., AVIGLIANO, E., MIGLIORANZA, K. S., & BROOKS, B. W. (2019). Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. **Science of The Total Environment**, 649, 1029-1037.

ORTEGA, A. D. S. B., MARANHO, L. A., NOBRE, C. R., MORENO, B. B., GUIMARÃES, R. S., LEBRE, D. T.,& PEREIRA, C. D. S. (2018). Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel Perna perna. **Environmental Science and Pollution Research**, 1-10.

PAIGA, P., & DELERUE-MATOS, C. (2017). Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. **Marine pollution bulletin,** *120*(1-2), 355-363.

PEREIRA, C. D. S., MARANHO, L. A., CORTEZ, F. S., PUSCEDDU, F. H., SANTOS, A. R., RIBEIRO, D. A.,& GUIMARÃES, L. L. (2016). Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment,** *548*, 148-154.

PETRIE, B., BARDEN, R., & KASPRZYK-HORDERN, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research,** *72*, 3-27.

PIRES, A., ALMEIDA, Â., CORREIA, J., CALISTO, V., SCHNEIDER, R. J., ESTEVES, V. I., ... & FREITAS, R. (2016). Long-term exposure to caffeine and carbamazepine: Impacts on the regenerative capacity of the polychaete Diopatra neapolitana. **Chemosphere**, 146, 565-573.

SABESP, 2019. A SABESP no município. Região Santos. Disponível em http://site.sabesp.com.br/site/interna/Municipio.aspx?secaoId=18&id=603. Acessado em 23/05/2019.

SANTOS-SILVA , T. G., MONTAGNER, C. C., & MARTINEZ, C. B. (2018). Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost Prochilodus lineatus. **Environmental toxicology and pharmacology**, 58, 237-242.

SAUVÉ, S., ABOULFADL, K., DORNER, S., PAYMENT, P., DESCHAMPS, G., & PRÉVOST, M. (2012). Fecal coliforms, caffeine and carbamazepine in stormwater collection systems in a large urban area. **Chemosphere**, 86(2), 118-123.

TÁBUA DE MARÉS (2019). Disponível em: https://tabuademares.com/br/so-paulo/santos. Acesso em: 12/02/2019;

US EPA, 1997a. Ecological Risk Assessment Guidance for Superfund: Process for Designing and Conducting Ecological Risk Assessments - Interim Final (EPA Publication No. 540/ r-97/006). **U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.**

US EPA, 1997b. Terms of Environment: Glossary, Abbreviations and Acronyms (EPA Publication No. 175-b-97-001). **U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.**

US EPA, 2017. Ecotox User Guide: Ecotoxicology Knowledgebase System. Version 4.0. 2017. **United States Environmental Protection Agency**, Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division, United States EPA, Washington, D.C.

WERME C, KEAY KE, LIBBY, PS, CODIGA DL, TAYLOR DI, WU DC, CHARLESTRA L. 2017. 2016 outfall monitoring overview. **Boston: Massachusetts Water Resources Authority**. Report 2017-12. 49 p. Disponível em: http://www.mwra.state.ma.us/harbor/html/archive.htm#omo. Acessado em 02/01/2019.

WILLE, K., NOPPE, H., VERHEYDEN, K., VANDENBUSSCHE, J., DE WULF, E., VAN CAETER, P., JANSSEN, C.R., DE BRABANDER, H.F., VANHAECKE, L., 2010. Validation and application of an LC–MS/ MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Anal. Bioanal. Chem**. 397 (5), 1797–1808.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cafeína,ICSC: 0405. 1998; Disponível em: http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0405. Acessado em 21/05/2019.

YOU, L., NGUYEN, V. T., PAL, A., CHEN, H., HE, Y., REINHARD, M., & GIN, K. Y. H. (2015). Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. **Science of the Total Environment**, *536*, 955-963.