

# POTENCIAL EFEITO DESREGULADOR ENDÓCRINO E HEPATOTÓXICO DE SUBPRODUTOS DE DESINFECÇÃO PRESENTES EM ÁGUAS CONTAMINADAS COM CLOREXIDINA

*Viviane da Silva Carvalho<sup>1</sup>, Renata Colombo<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade, Escola de Artes, Ciências e Humanidades – Universidade de São Paulo (EACH-USP). Contato: [viviane.silva.carvalho@usp.br](mailto:viviane.silva.carvalho@usp.br)

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade, Escola de Artes, Ciências e Humanidades – Universidade de São Paulo (EACH-USP). Contato: [renatacolomb@usp.br](mailto:renatacolomb@usp.br)

**Resumo:** A clorexidina é um biocida amplamente utilizado no mundo, sendo considerado um dos mais eficientes contra bactérias, fungos e leveduras. O seu uso extensivo como desinfetante e antisséptico tem promovido um aumento na incidência dessa substância em corpos hídricos. Em se tratando de águas de abastecimento, estudos mostram que as etapas usualmente empregadas nas estações de tratamento de águas (ETA) não removem completamente esta substância das águas. Adicionalmente, por apresentar caráter catiônico, reações entre a clorexidina e as espécies de cloro (presentes na etapa de cloração) podem levar à formação

de subprodutos da desinfecção (DBP). Os DBP são substâncias que podem ser tão ou mais tóxicas que as suas substâncias orgânicas precursoras e, por isso, é necessário o seu monitoramento e regulamentação. O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento da clorexidina quando submetida a uma condição de cloração similar à aplicada na ETA, identificar os DBP formados e avaliar a toxicidade dos subprodutos formados. Para isso, a solução de clorexidina foi exposta a  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cloro livre, pH 6,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , na presença de luz e diferentes tempos de reação. O monitoramento da clorexidina e dos DBP formados foi realizado por meio de análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. A toxicidade (receptor de estrogênio, receptor de androgênio, receptor de tiroide A e B e hepatotoxicidade) foi avaliada via modelos preditivos, utilizando a plataforma Vega. Os resultados obtidos mostraram que a clorexidina reage parcialmente com o cloro, formando DBP que apresentam atividade de desregulação endócrina e/ou hepatotoxicidade.

**Palavras-chave:** ODS, toxicidade, água, saneamento.

## POTENTIAL ENDOCRINE DISRUPTING AND HEPATOTOXIC EFFECTS OF DISINFECTION BY-PRODUCTS PRESENT IN WATER CONTAMINATED WITH CHLORHEXIDINE.

**Abstract:** Chlorhexidine is a biocide widely used in the world and is considered one of the most efficient against bacteria, fungi and yeasts. Its extensive use as a disinfectant and antiseptic has promoted an increase in the incidence of this substance in water bodies. When it comes to supply water, studies show that the steps usually employed in Water Treatment Plants (WTP) do not completely remove this substance from the water. Additionally, due to its cationic character, reactions between chlorhexidine and chlorine species (present in the chlorination step) can lead to the formation of disinfection by-products (DBP). DBP are substances that can be as or more toxic than their organic precursors and, therefore, their monitoring and regulation is necessary. The objective of this work was to verify the behavior of chlorhexidine when subjected to a chlorination condition similar to that applied in the ETA, identify the formed DBPs and evaluate the toxicity of the formed by-products. For this, the chlorhexidine solution was exposed to  $2 \text{ mgL}^{-1}$  of free chlorine, pH 6,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , in the presence of light and different reaction times. The monitoring of chlorhexidine and the formed DBP was carried out through liquid chromatography analysis coupled to a mass spectrometer. Toxicity (estrogen receptor, androgen receptor, thyroid receptor A and B and hepatotoxicity) was

evaluated via predictive models, using the Vega platform. The results obtained showed that chlorhexidine partially reacts with chlorine to form DBPs that present endocrine disrupting activity and/or hepatotoxicity.

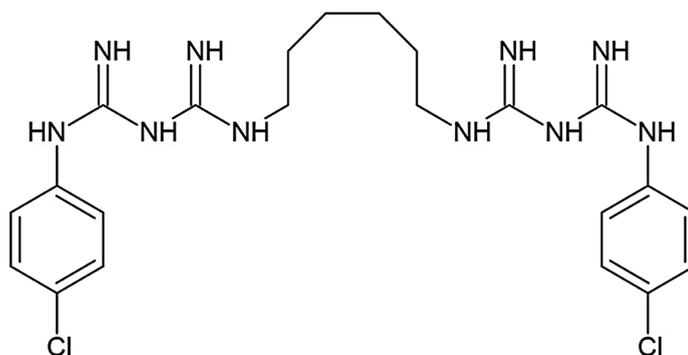
**Keywords:** ODS, toxicity, water, sanitation.

## 1. INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes são substâncias químicas encontradas nos produtos de uso cotidiano. A presença desses compostos, principalmente no meio aquático, leva a alterações no ecossistema e apresenta riscos à saúde humana (CAREGHINI *et al.*, 2015; DIAMOND *et al.*, 2015). Estudos mostram o potencial de persistência desses compostos em ambientes aquáticos, bem como seus efeitos nocivos, como desregulação endócrina, carcinogenicidade, citotoxicidade e resistência bacteriana (LIU; WONG, 2013; HE *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017). Dentre os contaminantes emergentes estão os biocidas, os quais têm despertado interesse devido aos seus efeitos na biota dos ambientes em que estão presentes (ALENCAR *et al.*, 2019).

Um dos biocidas mundialmente mais utilizado como desinfetante e antisséptico e reconhecido como substância essencial pela Organização Mundial da Saúde é a clorexidina (Figura 1).

**Figura 1** – Molécula de clorexidina



A clorexidina é uma substância extremamente eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e leveduras, e está presente como ingrediente ativo em muitos tipos de produtos desinfetantes e antissépticos de pele, membranas, mucosas, instrumentos e equipamentos (KUDO *et al.*, 2002; FIORENTINO *et al.*, 2010; MUSTEATA; PAWLISZYN, 2005; WHO, 2019).

Durante o uso destes produtos, parte da clorexidina não metabolizada é descartada na forma de resíduos, já tendo sido detectada em águas superficiais, potáveis e residuais (YAVUZ *et al.*, 2013, 2015).

A clorexidina é classificada como perigosa para o ambiente aquático, e é considerada tóxica para populações de protozoários, crustáceos, algas e para a biomassa cianobacteriana (LAWRENCE *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2014; JESUS *et al.*, 2013). Quando presente em efluentes de esgoto hospitalar, a clorexidina pode desencadear resistência a diversas famílias bacterianas (NUÑEZ; MORETTON, 2007; KOLJALG *et al.*, 2002).

Por se tratar de uma biguanida catiônica, quando na presença de substâncias químicas aniônicas tem grande potencial de reação, dando origem a outras substâncias orgânicas com elementos aniônicos, como o cloro. Durante o processo de desinfecção das águas essa reação pode dar origem a subprodutos de desinfecção (DBP). Alguns DBP formados pela reação do cloro com a matéria orgânica naturalmente presente nas águas já são bem conhecidos e documentados na literatura, entre eles os trihalometanos (THM), os ácidos haloacéticos (HAA), os haloacetoneitrilos (HAN) e as halocetonas (WHO, 2004; DEBORDE; VON GUNTEN, 2008). No entanto, diversos outros DBP provenientes de substâncias orgânicas poluentes estão sendo identificados, analisados e reconhecidos pelas suas propriedades tóxicas às espécies aquáticas e à saúde humana (PANYAKAPO; SOONTOMCHAI; PAOPUREE, 2008).

A determinação dos efeitos tóxicos de substâncias presentes em águas tem sido cada vez mais exigida por diversos órgãos ambientais e vem ao encontro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda Global 2030, em especial os ODS 3 e 6, que asseguram a disponibilidade de água de qualidade para a população, a promoção da saúde e do bem-estar humano; a proteção dos corpos hídricos e o desenvolvimento de tecnologias de tratamento de águas cada vez mais eficientes (COSTA *et al.*, 2014; ONU, 2021).

Para determinar estes efeitos, diversos organismos podem ser empregados, e essa escolha depende da representação ecológica destes organismos, da sua constituição biológica e se apresentam facilidade de cultivo em laboratório. Contudo, nos últimos anos, as agências reguladoras têm incentivado o uso de métodos alternativos para a determinação de informações acerca da segurança de substâncias químicas. Um exemplo disso é o Regulamento de Produtos de Biocidas n. 528/2012 EU, o qual prevê o uso de métodos não baseados em animais (MONTAGNER *et al.*, 2017; ECHA, 2012).

Um desses métodos alternativos são os modelos preditivos baseados na relação estrutura-atividade (SAR, do inglês *structure-activity relationship*). Este método se baseia no conceito de que a atividade biológica de uma substância química pode estar relacionada à sua estrutura molecular. Quando essa atividade é quantificada, esta relação é determinada pelo método QSAR (do inglês *quantitative structure-activity relationship*). Um modelo QSAR se baseia em dados experimentais de diversas substâncias químicas. A partir disso, é desenvolvido um modelo que vincula esses dados experimentais com características moleculares, a fim de prever a toxicidade das substâncias em estudo (BENFENATI *et al.*, 2013; CASSANO *et al.*, 2014; CAPPELLI *et al.*, 2015; BLÁZQUEZ *et al.*, 2020; BOUHEDJAR *et al.*, 2020). Há diversas plataformas disponíveis que se baseiam nestes modelos, como a Vega-QSAR. Nesta plataforma há uma variedade de modelos por meio dos quais o grau de toxicidade de uma substância é avaliado. Para cada modelo, um conjunto de características químicas (fragmentos moleculares ou grupos funcionais) que exibem uma correlação estatisticamente relevante com o modelo selecionado é usado para avaliar as informações de toxicidade da substância-alvo (BENFENATI *et al.*, 2013).

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento da clorexidina em meio clorado, mediante simulação de uma condição empregada nas Estações de Tratamento de Águas, identificar a formação de possíveis DBP, bem como avaliar a toxicidade destes últimos utilizando modelos preditivos disponíveis na plataforma Vega-QSAR.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Substâncias e reagentes utilizados

Para a realização dos experimentos, utilizou-se uma solução de digluconato de clorexidina a 20%, obtida da Fagron (Barcelona, CA, Espanha). O ácido fórmico foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e a acetonitrila, da J.T. Baker (Goiânia, GO, Brasil), ambos com grau HPLC. Já a solução de hipoclorito de sódio foi fornecida pela Nalgon (São Paulo, SP, Brasil) e contém 10% a 12% de cloro livre – grau analítico. A água purificada (resistividade 18,2 MΩ cm) foi obtida por meio do sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore GmbH, Eschborn, Alemanha).

## 2.2. Processo de degradação da clorexidina

Os experimentos de degradação foram realizados com uma solução de digluconato de clorexidina na concentração de  $0,5 \text{ mg}^{-1}$ . Tal solução foi exposta a  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cloro livre, pH 6,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , na presença de luz, e a reação foi monitorada por 30 min, 2 e 4 horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2011). Após cada um dos períodos reacionais, alíquotas de 1 mL da solução foram retiradas, filtradas em membranas de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  e analisadas por LC-ESI-MS. Uma alíquota da solução de clorexidina, submetida às condições de cloro, pH, temperatura e luz descritas, porém antes da adição de cloro, também foi analisada por LC-ESI-MS e considerada como solução de referência para este estudo.

## 2.3. Condições de análise por LC-ESI-MS

As análises LC-ESI-MS foram realizadas por meio de um sistema de cromatografia líquida modular Shimadzu Prominence LC 20 AT, acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu LCMS-8030 triplo quadrupolo. A separação dos compostos foi realizada utilizando-se como fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,1% de ácido fórmico e uma coluna Shim-pack XR-ODS II ( $100 \times 3,0 \text{ mm} \times 2,2 \text{ }\mu\text{m}$ ) (Shimadzu, Quioto, Japão). O modo de eluição empregado foi o gradiente linear: 0-5 min, 40-100% B; com a temperatura do forno a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , com vazão de fase móvel de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ . Para todas as análises LC-ESI-MS foi adotado o modo *full scan* ( $m/z$  100 a 1.000) e ionização por *eletrospray* no modo positivo. Em relação à linha de dessolvatação e do bloco térmico, a temperatura foi de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Como gás de nebulização e secagem utilizou-se o nitrogênio com vazão de 3 e  $15 \text{ L min}^{-1}$ , respectivamente. O monitoramento dos íons e dos fragmentos foi feito por meio da varredura de íons no modo positivo.

## 2.4. Modelos preditivos

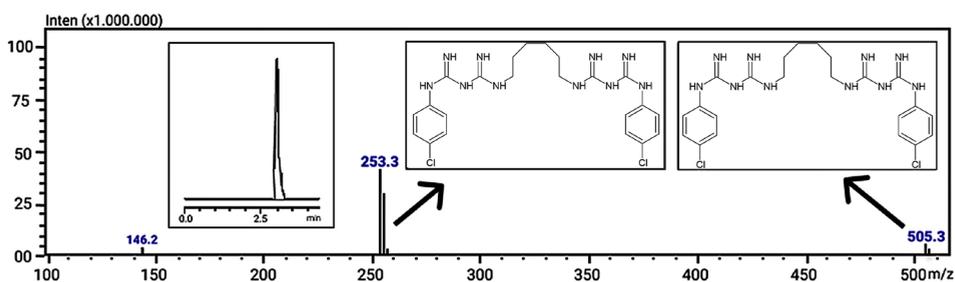
Para a predição dos possíveis efeitos de desregulação endócrina dos DBP utilizou-se a plataforma Vega, a qual se baseia em modelos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR).

Quatro parâmetros foram avaliados: receptor de estrogênio, receptor de androgênio, receptor de tiroide A e B e hepatotoxicidade. Para prever essas atividades foram empregados dois modelos de receptor de estrogênio (IRFMN, IRFMN/CERAPP), um modelo de receptor de androgênio (IRFMN/COMPARA), um modelo de receptor de tiroide A e um de receptor de tiroide B (ambos NRMEA) e um modelo de hepatotoxicidade (IRFMN).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições cromatográficas empregadas neste estudo, a clorexidina foi detectada na forma de um pico com tempo de retenção de 3,0 min e íon molecular  $m/z$  505, junto com seu respectivo isótopo de cloro ( $m/z$  507). O fragmento característico dessa molécula, nas condições empregadas, foi  $m/z$  253 (com seu respectivo isótopo  $m/z$  255), que se refere ao íon molecular duplamente carregado (Figura 2). Tanto o íon molecular quanto o fragmento característico da clorexidina já foram relatados na literatura (HISHINUMA *et al.*, 2006; BARBIN, 2008).

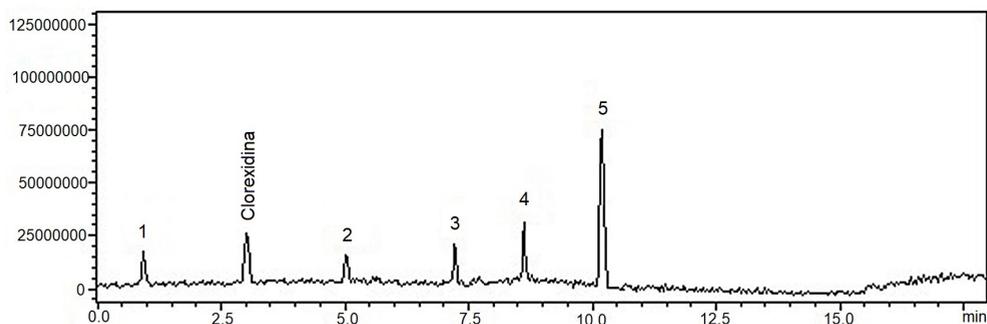
Figura 2 – Cromatograma de íons totais (TIC) e espectro de massa da clorexidina



Nas alíquotas das soluções dos diferentes tempos reacionais analisados, constatou-se a presença deste pico (Figura 3), demonstrando que, na condição de cloração empregada neste estudo, a degradação da clorexidina não ocorre totalmente. A comparação da altura do pico de clorexidina na alíquota da solução referência e nas alíquotas dos diferentes tempos reacionais mostrou que ocorre uma degradação parcial, sendo esta diretamente proporcional ao tempo de contato da clorexidina com o cloro.

Empregando as condições de análises por LC-ESI-MS descritas no item 2.3, foi possível a identificação de cinco DBP, formados pela exposição da clorexidina ao cloro. Na Tabela 1 estão descritos o tempo de retenção, o íon molecular e os fragmentos destes cinco DBP.

**Figura 3** – Cromatograma TIC da solução de clorexidina com 2 mgL<sup>-1</sup> de cloro livre, pH 6, a 20 °C, na presença de luz e após 30 minutos de reação



**Tabela 1** – Dados obtidos por LC-MS dos derivados da clorexidina

DBPs	Tempo de retenção (min)	Íon molecular	Fragmentos
1	0,9	208	167; 146; 122 e 106
2	5,0	256	208; 167; 146 e 122
3	7,2	167	122 e 105
4	8,6	359	217 e 162
5	10,2	575	493; 449; 383; 355; 279 e 128

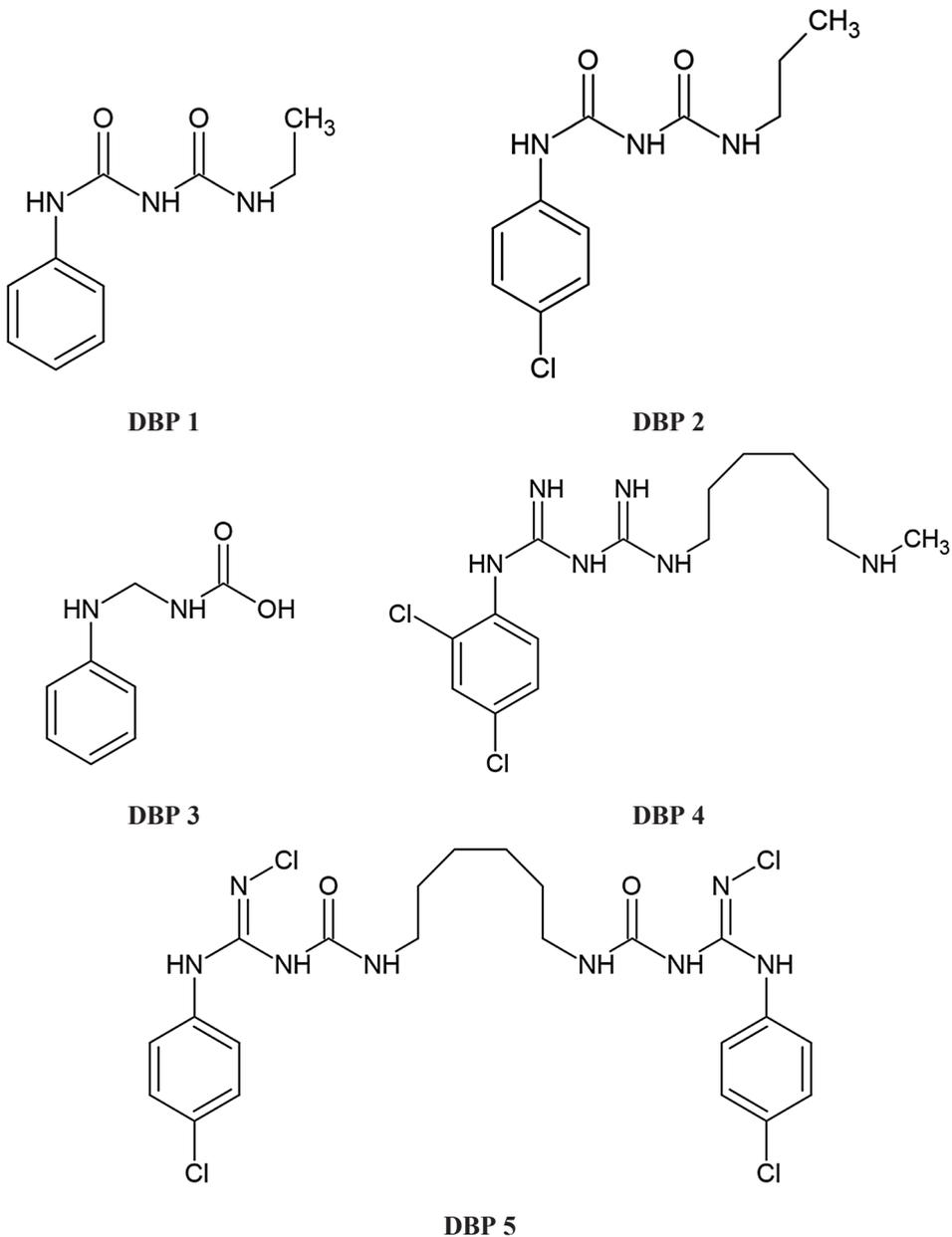
A identificação estrutural dos DBP foi realizada por meio dos dados gerados pelas análises de LC-MS, como valor do íon molecular e dos fragmentos encontrados. Além disso, também foram considerados conceitos teóricos sobre reações, fragmentação e rearranjo de moléculas orgânicas, bem como trabalhos sobre a formação de cloroaminas e de derivados de degradação da clorexidina (LAYER, 1963; ALLINGER, 1978; MCLAFFERTY; TURECEK, 1993; BARBIN, 2008; ROCHA, 2008; HU, 2010; CAREY, 2011; YANG, 2012). As estruturas destes cinco DBP podem ser observadas na Figura 4.

Os DBP (1) e (2) teriam se formado pelo rompimento da cadeia de carbonos e pela hidrólise dos grupos iminas (reação catalisada pela presença do OCl<sup>-</sup>), gerando grupos imidas. No caso do DBP (2) ainda teria ocorrido a saída do cloro do anel benzênico, enquanto no DBP (1) ocorre cloração no anel benzênico, sendo que este cloro entra no anel na posição orto, orientado pelo grupo amina.

A formação do composto (3) é proposta partindo-se do rompimento de uma ligação carbono-nitrogênio e da hidrólise de 2 grupos imina. Posteriormente, propõe-se a perda de uma unidade de cloro do anel benzênico, a hidratação de uma das carbonilas do grupo imida e a perda sequencial de uma das hidroxilas proveniente desta hidratação.

O processo de formação da substância (4) se baseia no rompimento inicial de uma ligação carbono-nitrogênio, seguido da entrada adicional de uma unidade de cloro no anel benzênico. O DBP (5) é formado a partir da cloração de dois grupos iminas e da hidrólise dos outros dois grupos iminas.

Figura 4 – Estrutura molecular dos DBP formados durante a degradação da clorexidina



Para verificar a possível atividade dos DBP no sistema endócrino, foi utilizada a plataforma Vega. Os modelos presentes nesta plataforma utilizam dados experimentais acerca da toxicidade dos compostos e dados de moléculas semelhantes. Assim é feita uma predição baseada na estrutura molecular do composto-alvo. Com base nesses dados, a plataforma gera um índice de domínio de aplicabilidade (IDA), o qual classifica a qualidade da previsão. Este IDA é composto por diversos critérios: (i) verificação da semelhança com as moléculas parecidas; (ii) comparação entre o valor predito e os valores experimentais dos compostos; (iii) verificação da precisão destes valores previstos para as moléculas semelhantes; (iv) observação da semelhança entre alguns fragmentos centrados nos átomos. A partir destes critérios é gerada uma avaliação global geral sobre o domínio de aplicabilidade do composto. O IDA varia de 0 a 1; quanto mais próximo de 1, melhor é a predição. Para este estudo foram considerados apenas os resultados com  $IDA \geq 0,7$ , sendo que os DBP que apresentaram um índice abaixo deste valor estavam fora do domínio de aplicabilidade do modelo.

Para o *endpoint* receptor de estrogênio, ambos os modelos previram os DBP (1), (2) e (4) como não ativos. O DBP (3) foi predito como ativo para o modelo IRFMN/CERAPP, mas ficou fora do domínio de aplicabilidade do modelo IRFMN. O DBP (5) ficou fora do domínio de aplicabilidade de ambos os modelos.

Para o modelo de receptor de androgênio IRFMN/COMPARA, os DBP (1), (2) e (3) foram previstos como não ativos. Já o DBP (4) foi previsto como receptor de androgênio, apresentando o alerta estrutural NCICCC(Cl)CCl, que significa que esta parte da molécula é a responsável pela atividade. O DBP 5 não pode ser avaliado, pois ficou fora do domínio de aplicabilidade do modelo.

Os modelos NRMEA para receptor de tiroide A e B previram os DBP (1), (2) e (3) e (4) como não ativos, e o DBP (5) ficou fora do domínio de aplicabilidade.

Em relação ao *endpoint* de hepatotoxicidade, o modelo IRFMN previu os DBP (1), (2) como hepatotóxicos. Para estes DBP, o alerta estrutural (estrutura da molécula responsável pela atividade) destacado foi NCNCICCCCCl. Os DBP (3) e (4) e (5) ficaram fora do domínio de aplicabilidade do modelo.

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio dos experimentos de degradação da clorexidina em condição aplicada às águas nas estações de tratamento, nota-se que a clorexidina interage com o cloro e forma subprodutos de desinfecção, sendo esta formação influenciada pelo tempo de reação. O uso da plataforma Vega para a predição toxicológica dos DBP

se mostrou uma boa alternativa aos testes toxicológicos em animais. Observou-se que, dos cinco DBP identificados, um deles foi previsto como receptor de androgênio e outros dois como hepatotóxicos. Nas bases de dados internacionais não há informações sobre a identificação e o estudo toxicológico dos DBP apresentados neste estudo e, portanto, os dados apresentados podem contribuir com a base de dados toxicológica e com futuros estudos acerca da clorexidina. Os resultados apresentados neste estudo contribuem ainda com informações para a definição de padrões de produção e consumo mais sustentáveis e de tecnologias de tratamento de água e efluentes cada vez mais eficientes, garantindo a disponibilidade de água de qualidade e, conseqüentemente, saúde e bem-estar humano e proteção dos corpos hídricos, como previsto nos ODS 3, 6 e 12 da Agenda Global 2030.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E. L. C. *et al.* Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade do antisséptico bucal gluconato de clorexidina 0,12 % em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. **Revinter**, v.12, n. 2, p. 5-13, 2019.
- ALLINGER, N. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1978.
- BARBIN, L. E. *et al.* Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 12, p. 1508-1514, 2008.
- BENFENATI, E. *et al.* VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology. **CEUR Workshop Proceedings**, 1107, p. 21-28, 2013.
- BLÁZQUEZ, M. *et al.* Comparing in vivo data and in silico predictions for acute effects assessment of biocidal active substances and metabolites for aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, 111291, 2020.
- BOUHEDJAR, K. *et al.* Modelling quantitative structure activity–activity relationships (QSAARs): auto-pass-pass, a new approach to fill data gaps in environmental risk assessment under the REACH regulation. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 31, n. 10, 785–801, 2020.
- CAPPELLI, C. I. *et al.* Assessment of *in silico* models for acute aquatic toxicity towards fish under REACH regulation. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 12, p. 977-999, 2015.
- CAREGHINI, A. *et al.* Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a

review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5711-5741, 2015.

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

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

COSTA, I. L. *et al.* Ocorrência de Fármacos antidepressivos no Meio Ambiente- Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1408-1431, 2014.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. R. S. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment - kinetics and mechanisms: a critical review. **Water Research**, v. 42, n. 1, p. 13-51, 2008.

DIAMOND, M. L. *et al.* Exploring the planetary boundary for chemical pollution. **Environment International**, v. 78, p. 8-15, 2015.

ECHA. **Regulamento n. 528/2012, de 27 de junho de 2012**. Relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas. União Europeia: Parlamento europeu. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32012R0528>>. Acesso em: 7 set. 2021.

FIorentino, F. A. M.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Analytical Methods for the Determination of Chlorhexidine: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 89-101, 2010.

JESUS, F. T. *et al.* Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. **Ecotoxicology** v. 22, n. 9, p. 1348-1358, 2013.

HE, L. Y. *et al.* Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. **Environment International**, v. 92, p. 210-219, 2016.

HISHINUMA, T. *et al.* Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenoethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. **Journal of Chromatography B**, v. 831, n. 1-2, p. 105-109, 2006.

HU, J. *et al.* Halonitromethane formation potentials in drinking waters. **Water Research**, v. 44, n. 1, p. 105-114, 2010.

KOLJALG, S.; NAABER, P.; MIKELSAAR, M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, n. 2, p. 106-113, 2002.

KUDO, K. Toxicological Analysis of Chlorhexidine in human serum using HPLC on a polymer-coated ODS column. **Journal of analytical toxicology**, v. 26, n. 2, p. 119-122, 2002.

LAWRENCE, J. R.; ZHU, B.; SWERHONE, G. D. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3541-3550, 2008.

LAYER, R. W. The Chemistry of Imines. **Chemical reviews**, v. 63, n. 5, p. 489-510, 1963.

LI, Y. C.; KUAN, Y. H.; LEE, S. S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Chlorhexidine on Macrophages In Vitro. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 452-458, 2014.

LIU, J. L.; WONG, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. **Environment International**, v. 59, p. 208-224, 2013.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação n., 5 de 28 de setembro de 2017**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>>. Acesso em: 6 set. 2021.

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

MUSTEATA, F. M.; PAWLISZYN, J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 1015-1024, 2005.

NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires City hospital wastewater. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 644-648, 2007.

ONU, 2021. **Sustainable Development Goals**. Disponível em: <<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>>

PANYAKAPO, M.; SOONTOMCHAI, S.; PAOPUREE, P. Cancer Risk Assessment from Exposure to Trihalomethanes in Tap Water and Swimming Pool Water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 372-378, 2008.

ROCHA, D. F. O. **Estudo da redução de iminas**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

WHO. **Disinfectants and Disinfectant by-products. Environmental Health Criteria 216**. 2004. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42274/who\\_ehc\\_216.pdf;jsessionid=b64a83b22bd11d1b1fa79307aad5e83b?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42274/who_ehc_216.pdf;jsessionid=b64a83b22bd11d1b1fa79307aad5e83b?sequence=1)>. Acesso em: 6 set. 2021.

WHO. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 2011. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf)>. Acesso em: 6 set. 2021.

WHO. **World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019**. 2019. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 11 set. 2021.

YANG, X. *et al.* Precursors and nitrogen origins of trichloronitromethane and dichloroacetonitrile during chlorination/chloramination. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 25-32, 2012.

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

YAVUZ, M.; OGGIONI, M.; YETIS, U. Biocides in drinking water system of Ankara, Turkey. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 12, p. 3253–3262, 2015.

YAVUZ, M. **Investigation of occurrence and fate of biocides in wastewater treatment plants and surface waters**. Master Thesis. Middle East Technical University, Turkey, 2013. 81 p.