

Ana Isabel Costa Fortunato

# Ocorrência de Diclofenac, Ibuprofeno e Paracetamol em águas residuais em Portugal

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Pena  
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Universidade de Coimbra  
Faculdade de Farmácia  
Coimbra  
Julho de 2014

**Autor**

Ana Isabel Costa Fortunato

Tese de Mestrado submetida, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em  
Segurança Alimentar

**Orientador interno**

Professora Doutora Angelina Pena

**Co-orientador**

Professora Doutora Celeste Lino

Docentes FFUC



## Resumo

Os medicamentos são classificados, actualmente, como uma classe emergente de contaminantes ambientais. A comunidade científica tem detectado a sua ocorrência nos últimos anos em águas residuais, águas de superfície e águas de consumo. A sua presença no meio hídrico deve-se, principalmente, ao consumo de compostos farmacêuticos por parte da população, e a sua consequente entrada contínua no ambiente através da excreção pela urina e fezes do Homem. As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) são consideradas como a principal fonte de contaminação de fármacos no meio aquífero.

Deste modo, o presente trabalho pretende avaliar a ocorrência de compostos farmacêuticos em águas residuais, nos afluentes e efluentes, de quinze ETARs, em cinco regiões diferentes de Portugal (Zona Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve), durante o Verão de 2013. Os medicamentos seleccionados neste estudo foram o diclofenac, o ibuprofeno e o paracetamol, devido ao seu consumo no país.

Para avaliar a ocorrência ambiental destes compostos efectuou-se uma extração em fase sólida seguida por cromatografia líquida com detecção de massa em *tandem* (SPE/LC/MS-MS). Foi possível identificar e quantificar a presença dos medicamentos em estudo nas diferentes ETARs em Portugal. Dos resultados obtidos, o paracetamol apresentou ser o fármaco com teores mais elevados nos afluentes, com uma concentração máxima de 48,878 µg/L. Nos efluentes, verificou-se que o ibuprofeno foi o que apresentou uma concentração mais elevada, de aproximadamente 0,995 µg/L. A remoção média, para os três compostos em estudo variou entre 63 e 99,8%.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que as ETARs 5 e 7, podem constituir zonas de risco de contaminação para as águas de superfície, devido aos níveis elevados detectados nos efluentes.

Futuramente, será necessária a realização de mais estudos de monitorização para continuar a dar cumprimento à nova Directiva 2013/39/UE.

**Palavras-chave:** Diclofenac, Ibuprofeno, Paracetamol, Contaminantes Emergentes, ETAR, Ecossistema Aquático, Segurança Alimentar.



## Abstract

The pharmaceutical drugs are classified, currently, as an emerging class of environmental contaminants. The scientific community has detected their occurrence in recent years in wastewater, surface water and drinking water. Their presence in the aquatic environment is due mainly to the consumption of pharmaceutical compounds by the population and the consequent continuous discharge into the environment through excretion in human urine and faeces. Wastewater Treatment Plants (WWTPs) are considered the main source of contamination by pharmaceuticals in the aquatic environment.

This study aims to evaluate the occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater, the influent and effluent, in fifteen WWTPs in five different regions of Portugal (North, Center, Lisbon and Vale do Tejo, Alentejo and Algarve), during the summer of 2013. The pharmaceuticals selected in this study were diclofenac, ibuprofen and paracetamol, due to their high consumption in our country.

To assess the environmental occurrence of these compounds was performed solid phase extraction followed by liquid chromatography with tandem mass detection (SPE/LC/MS-MS). It was possible to identify and quantify the presence of the drugs under study in different WWTPs in Portugal. From the results obtained, paracetamol presented higher levels in influent, with a maximum concentration of 48,878 mg/L. In the effluent, it was found that ibuprofen showed the higher concentration of about 0,995 mg/L. The average of removal for all three compounds was between 63 and 99,8%.

The results of this study indicate that WWTPs 5 and 7 may constitute a risk contamination point to surface waters due to high levels detected in the effluent.

In the future, it will be necessary to perform more monitoring studies in order to accomplish comply the new Directive 2013/39/UE.

**Keywords:** Diclofenac, Ibuprofen, Paracetamol, Emerging Contaminants, WWTPs, Aquatic Ecosystem, Food Safety.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Doutora Angelina Pena pela disponibilidade, pelas críticas construtivas, pela motivação e conhecimento que me transmitiu ao longo da realização deste trabalho. Ao Dr. André Pereira, por toda a disponibilidade e pela ajuda prestada na realização da componente experimental.

Aos meus amigos Rui Pedro, Filipa Albuquerque e Filipa Costa pelo incondicional apoio.

Aos meus pais Noémia e José Fortunato, pelo amor e carinho, não só nesta etapa mas em todas da minha vida.



## Índice geral

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de gráficos</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.2. Entrada e dissiminação de fármacos no ambiente .....	2
1.3. Características físico-químicas dos compostos farmacêuticos .....	3
1.3.1. Diclofenac .....	3
1.3.2. Ibuprofeno .....	4
1.3.3. Paracetamol .....	5
1.4. Ocorrência de compostos farmacêuticos na água .....	6
1.4.1. Diclofenac .....	6
1.4.2. Ibuprofeno .....	9
1.4.3. Paracetamol .....	11
1.5. Ecotoxicologia dos compostos farmacêuticos .....	12
1.5.1. Ecotoxicologia do diclofenac .....	14
1.5.2. Ecotoxicidade do ibuprofeno .....	17
1.5.3. Ecotoxicidade do paracetamol .....	20
<b>2. Metodologias analíticas dos compostos farmacêuticos</b> .....	<b>23</b>
2.2. Princípios gerais da Cromatografia Líquida .....	25
2.2.1. Detector de espectrometria de massa .....	26
<b>3. Trabalho Experimental</b> .....	<b>29</b>
3.1. Amostragem .....	29
3.2. Materiais e Reagentes .....	29
3.3. Procedimento experimental .....	30
<b>4. Resultados</b> .....	<b>34</b>
4.1. Revalidação do método .....	34
4.2. Discussão dos resultados .....	36
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>40</b>



<b>7. Referências .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>48</b>



<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estrutura química diclofenac .....	3
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ibuprofeno.....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do paracetamol .....	5
<b>Figura 4.</b> Resultado do ensaio de toxicidade realizado em ovos de peixe <i>Danio rerio</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> Resultado do ensaio de toxicidade em larvas de peixes <i>Danio rerio</i> .....	21
<b>Figura 6.</b> Esquema das etapas da Extração em Fase Sólida.....	24
<b>Figura 7.</b> Esquema do funcionamento do sistema HPLC .....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema da estrutura básica de um espectrómetro de massa.....	26
<b>Figura 9.</b> Filtração da amostra .....	30
<b>Figura 10.</b> Acidificação da amostra .....	31
<b>Figura 11.</b> Extração em Fase Sólida com Colunas Oasis MAX 500 mg .....	31
<b>Figura 12.</b> Secagem das amostras com azoto .....	32
<b>Figura 13.</b> Espectrómetro <i>Varian</i> 500-MS com a fonte ESI.....	32





<b>Índice de tabelas</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Características físico-químicas do diclofenac.....	4
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas do ibuprofeno.....	5
<b>Tabela 3.</b> Propriedades físico-químicas do paracetamol .....	6
<b>Tabela 4.</b> Concentração média (máxima) de diclofenac em águas residuais e águas de superfície em diferentes países ( $\mu\text{g/L}$ ).....	7
<b>Tabela 5.</b> Presença de diclofenac nas águas de consumo a nível mundial .....	8
<b>Tabela 6.</b> Concentração média (máxima) de ibuprofeno em águas residuais e águas de superfície em diferentes países em ( $\mu\text{g/L}$ ).....	9
<b>Tabela 7.</b> Presença de ibuprofeno nas águas de consumo a nível mundial .....	10
<b>Tabela 8.</b> Concentração média (máxima) de paracetamol em águas residuais e águas de superfície em diferentes países ( $\mu\text{g/L}$ ).....	11
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros de toxicidade aguda e crónica .....	14
<b>Tabela 10.</b> Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com diclofenac .....	15
<b>Tabela 11.</b> Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com o ibuprofeno .....	18
<b>Tabela 12.</b> Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com o paracetamol.....	20
<b>Tabela 13.</b> Valores de LOD, LOQ, recuperação e RSD para o diclofenac, ibuprofeno e paracetamol.....	34
<b>Tabela 14.</b> Concentrações de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol em afluentes e efluentes de quinze ETARs em Portugal e as suas respectivas taxas de remoção .....	35
<b>Tabela 15.</b> Características das Estações de Tratamento de Águas Residuais .....	49

**Índice de gráficos****Página**

<b>Gráfico 1.</b> Concentração de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol nos afluentes de 15 ETARs ( $\mu\text{g/L}$ ) .....	36
<b>Gráfico 2.</b> Concentração de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol nos efluentes de 15 ETARs ( $\mu\text{g/L}$ ).....	37
<b>Gráfico 3.</b> Percentagem de remoção do diclofenac, ibuprofeno e paracetamol em 15 ETARs .....	38



## Lista de abreviaturas

AINE - Anti-inflamatório não esteróide

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

CBO<sub>5</sub> - Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de cinco dias

CE - Comunidade Europeia

CI - Ionização química

COX - Ciclooxigenase

CQO - Carência Química de Oxigénio

EC<sub>50</sub> - Concentração efectiva a 50%

EI - Ionização de electrões

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

EUA - Estados Unidos da América

FAB - *Fast Atom Bombardment*

FDA - *Food and Drug Administration*

FE - Fase Estacionária

FM - Fase Móvel

GC/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IT- *Ion Trap*

LC<sub>50</sub> - Concentração letal a 50%

LC/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa



LOD - Limite de detecção

LOEC - Menor concentração com efeito observado

LOEL - Nível mais baixo com efeito observado

LOQ- Limite de quantificação

MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

NOEC - Concentração sem efeito observado

NOEL - Nível sem efeito observado

pKa - Constante de acidez

Q- Quadropolo

RSD - Desvio padrão relativo

SPE - Extração em Fase Sólida

SPME - Microextração em Fase Sólida

TOF - *Time of Flight*

TSS - Sólidos Suspensos Totais

UE - União Europeia

UHPLC - *Ultra High Performance Liquid Chromatography*



## I. Introdução

Os medicamentos são uma classe emergente de contaminantes ambientais largamente utilizados em medicina humana e medicina veterinária (Mompelat *et al.*, 2009). Após a sua administração, uma parte significativa é eliminada para o ambiente (Jones *et al.*, 2003), contaminando águas subterrâneas, águas de superfície e solos. O consumo elevado por parte da população conduz à entrada contínua de quantidades residuais no ambiente, levando os organismos aquáticos à exposição multigeracional. O impacto ambiental que resulta da sua presença constitui uma preocupação crescente de saúde pública, a nível mundial, uma vez que possuem efeito biológico (Fent *et al.*, 2006).

A ocorrência ambiental de fármacos já é conhecida desde os anos 70. Nos Estados Unidos da América (EUA), um estudo desenvolvido por Garrison *et al.* (1976), verificou a presença de ácido clofíbrico, em águas residuais domésticas não tratadas e em efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), um ano depois, Hignite e Azamoff (1977), detectaram a ocorrência de ácido salicílico, em afluentes e efluentes de ETARs. Desde então, a presença de resíduos de medicamentos no ambiente encontra-se descrita na literatura científica, a nível mundial, apesar de os resultados serem ainda insuficientes para se poder efectuar um estabelecimento do risco para o Homem.

As ETARs são consideradas como a principal fonte de entrada de medicamentos no ambiente, uma vez que, reúnem os resíduos de medicamentos que entram na rede de esgotos municipais e hospitalares (Lin *et al.*, 2009). Os medicamentos são desenhados para serem persistentes e não são completamente removidos pelos processos de tratamento convencionais das ETARs. A complexidade química de cada composto faz com que a taxa de remoção varie de composto para composto, apresentando uns maior resistência à degradação que outros (Boxall, 2004; Gracia-Lor *et al.*, 2012). Este facto conduz a uma grande preocupação, no que diz respeito, ao potencial impacto sobre os ecossistemas e na saúde humana (Santos *et al.*, 2013a).

A Directiva 2013/39/UE implementa programas de monitorização para os contaminantes emergentes com a finalidade de priorizar as substâncias que apresentem risco para o ambiente aquático. Foi estabelecida uma lista de vigilância de substâncias para as quais devem ser recolhidas em toda a União Europeia (UE) dados de monitorização, uma vez que podem representar um risco significativo para o meio aquático, na qual estão incluídos, o diclofenac, o 17-beta-estradiol e o 17-alfa-etinilestradiol.



O diclofenac, o ibuprofeno e o paracetamol são medicamentos largamente utilizados pela população portuguesa e estão no ranking das 100 substâncias activas mais vendidas em Portugal.

Segundo os dados do INFAMED I.P., em 2011, o paracetamol foi o segundo medicamento mais vendido em Portugal, representando a venda de mais de três milhões de embalagens, o ibuprofeno ficou em nono lugar no ranking das 100 substâncias activas mais vendidas no país, com mais de dois milhões de embalagens e o diclofenac ocupou o décimo sétimo lugar no top de vendas, mais de um milhão de embalagens vendidas durante o ano (INFARMED I.P., 2011).

Atendendo à Directiva 2013/39/UE, que exige a monitorização ambiental de diclofenac na água, este trabalho tem como objectivo dar complemento a esta nova legislação da Comunidade Europeia (CE). Assim, efectuou-se a determinação destes três compostos, em afluentes e efluentes, de quinze ETARs, localizadas em cinco regiões diferentes de Portugal. Neste estudo, foi também avaliada a remoção destes compostos em cada ETAR, por forma a identificar as zonas de maior contaminação e de modo a promover as correctas medidas de minimização do risco ambiental de fármacos.

## **1.2. Entrada e dissiminação de fármacos no ambiente**

A entrada dos compostos farmacêuticos no ambiente hídrico dá-se principalmente através da excreção de medicamentos pela urina e fezes do Homem. A excreção dos fármacos pode ser feita sob a forma de princípio activo na sua forma não modificada e/ou sob a forma do(s) seu(s) metabolito(s). De um modo geral, dependendo do fármaco, 40 a 90% do composto pode ser excretado na forma não modificada (Jones *et al.*, 2003).

Como são continuamente libertados na rede de esgotos (Fent *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2013a), as ETARs tem uma elevada importância, uma vez que constituem a principal via de entrada de compostos farmacêuticos no ambiente e que tem como objectivo o tratamento das águas residuais.

Os tratamentos realizados nas ETARs, de uma forma geral, podem compreender os seguintes processos: pré-tratamento (gradeamento e desarenação), tratamento primário (floculação e sedimentação), tratamento secundário (processos biológicos de oxidação) e, em alguns casos, tratamento terciário (desinfecção) (Gracia-Lor *et al.*, 2012).



No entanto, estes tratamentos podem não ser eficientes na completa remoção destes compostos (Fent *et al.*, 2006; Gracia-Lor *et al.*, 2012).

Existe uma multiplicidade de factores que podem influenciar significativamente a remoção dos mesmos, tais como, as propriedades físico-químicas do composto farmacêutico como a fotossensibilidade, biodegradabilidade, lipofilicidade, volatilidade e solubilidade em água (Boxall, 2004), as condições climáticas e as condições operacionais do processo de tratamento, como o tempo de retenção de sólidos, tempo de retenção hidráulica (Gracia-Lor *et al.*, 2012). Assim, as ETARs, constituem pontos de contaminação bem definidos, que devem ser monitorizados, por forma a avaliar o seu impacto nas águas de superfície e nas águas subterrâneas (Fent *et al.*, 2006).

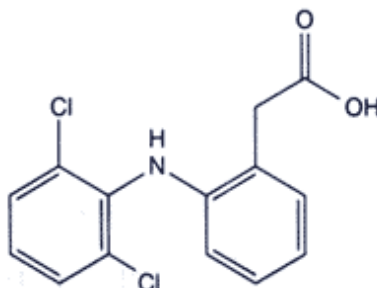
### 1.3. Características físico-químicas dos compostos farmacêuticos

Seguidamente, apresentam-se as propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e algumas características físico-químicas dos compostos farmacêuticos em estudo, o diclofenac, ibuprofeno e paracetamol.

#### 1.3.1. Diclofenac

O diclofenac é um anti-inflamatório não-esteróide (AINE), possui propriedades antirreumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (Saravanan *et al.*, 2011), é usado em medicina humana desde 1970 (Fent *et al.*, 2006).

Este composto é um inibidor da síntese das prostaglandinas que influenciam a produção da inflamação, dor e febre (Christen *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Estrutura química diclofenac (Adaptado de Han *et al.*, 2006)



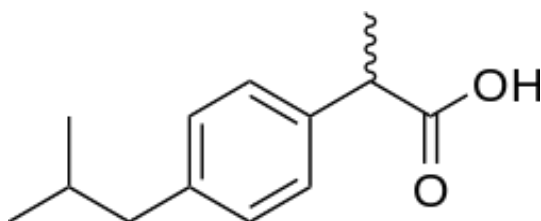
Em termos de farmacocinética, cerca de 60 % da dose administrada de diclofenac é excretada na urina sob a forma de metabolitos e menos de 1 % é excretada na forma não modificada. A dose restante é eliminada pela bÍlis e fezes, também sob a forma de metabolitos (INFARMED I.P., 2013). Algumas das suas características físico-químicas encontram-se na Tabela 2, como o peso molecular, pKa e solubilidade.

Propriedades	Descrição
Peso molecular	296,16 g/mol
pKa	4,0±0,2 em água a 25 °C
log Kow (octanol-água)	4,51
Solubilidade em água (25°C)	2,37 mg/L
Pressão de vapor (25°C)	6,14 x 10 <sup>-8</sup> mm Hg

**Tabela 1.** Características físico-químicas do diclofenac (Adaptado de Van den Brandhof e Montforts, 2010)

### 1.3.2. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um derivado do ácido propiónico com acção anti-inflamatória, analgésica e antipirética, actuando por inibição da síntese das prostaglandinas. É utilizado no tratamento de dor e febre, devido à funcionalidade da ciclooxigenase (COX) (INFARMED I.P., 2008; Paíga *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Estrutura química do ibuprofeno (Adaptado de Han *et al.*, 2006)





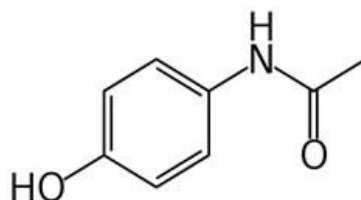
A biotransformação hepática e a excreção completa-se em 24 horas após a última dose, sendo excretado menos de 1% na forma não modificada (INFARMED I.P., 2008).

Propriedades	Descrição
Peso Molecular	206,3
pKa	4,91
Log Kow	3,97
Solubilidade em água (25 °C)	21,0 mg/L
Pressão a vapor (25°C)	1,2 mPa

**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas do ibuprofeno (Adaptado de Nallani *et al.*, 2011)

### 1.3.3. Paracetamol

O paracetamol é um fármaco com propriedades analgésicas, utilizado para o alívio temporário de dores leves a moderadas associadas a gripes e resfriados comuns e na redução da febre (Christen *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Estrutura química do paracetamol (Adaptado de Han *et al.*, 2006)

Em termos de farmacocinética, o paracetamol, após administração oral é rapidamente e completamente absorvido.

Após o metabolismo hepático, os metabolitos farmacologicamente inativos são excretados por via renal, sendo apenas 4% excretado sob a forma não modificada. A semi-vida de eliminação média é de 1,5 a 2,5 horas, geralmente, dentro de 24 horas a excreção é completa (Bound e Voulvoulis, 2005).

A Tabela 3 apresenta algumas características físico-químicas do paracetamol.



Propriedades	Descrição
Peso Molecular	151,2 g/mol
pka	9,38
logKow	0,46
Solubilidade em água (20°C)	12,75 g/L
Pressão a vapor (20°C)	11,4 mmHg

**Tabela 3.** Propriedades físico-químicas do paracetamol (Adaptado de Y. Kim *et al.*, 2007)

#### 1.4. Ocorrência de compostos farmacêuticos na água

Como já foi referido anteriormente, a ocorrência de fármacos deve ser avaliada nas águas residuais das ETARs, por serem consideradas como a principal fonte contaminação destes compostos no ambiente aquático. Devido à incompleta remoção dos medicamentos nas ETARs, verifica-se a sua introdução contínua, a nível residual, no meio aquático circundante.

Um estudo recente promovido pela CE, realizado nos efluentes de 90 ETARs urbanas europeias, detectou a presença de substâncias farmacologicamente activas com impacto no meio aquífero receptor (Loos *et al.*, 2013).

Outros estudos publicados na literatura científica, realizados a nível mundial, confirmam a ocorrência de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol em águas residuais de ETARs, em águas de superfície e águas de consumo humano.

##### 1.4.1. Diclofenac

Na literatura científica encontram-se descritos alguns estudos de ocorrência de diclofenac, em águas residuais, águas de superfície e águas de consumo humano, em vários países, como Alemanha (Ternes, 1998; Heberer *et al.*, 2002), Coreia (Han *et al.*, 2006; S. D. Kim *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2011), Espanha (Gracia-Lor *et al.*, 2012), Portugal (Salgado *et al.*, 2010) e Reino Unido (Roberts e Thomas, 2006) (Tabela 4).



A Tabela 4, apresenta as concentrações médias e máximas de diclofenac detectadas nos afluentes e efluentes de ETARs e águas de superfície.

Fármaco	País	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)	Água de superfície (µg/L)	Referências
<b>Diclofenac</b>	Alemanha	n.a.	0,81 (2,1)	n.a.	0,15 (1,20)	(Ternes, 1998)
	Alemanha	3,02	2,51	17	n.a.	( Heberer et al., 2002)*
	Coreia	0,392 (6,88)	0,216 (0,221)	45	n.a.	(Sim et al., 2011)
	Coreia	2,59 (9,87)	1,97 (10,96)	24	n.d.	(Han et al., 2006)
	Coreia	n.a.	0,040 (0,127)	n.a.	0,003 (0,006)	(Kim, S. D. et al., 2007)
	Espanha	n.a.	0,421	n.a.	0,176	(López-Serna et al., 2010)*
	Espanha	0,56 (1,49)	0,33 (0,74)	41	n.a.	(Gracia-Lor et al., 2012)
	Portugal	(0,00674)	(0,001612)	76	n.a.	(Salgado et al., 2010)
	Reino Unido	n.a.	0,599(2,349)	n.a.	n.a.	(Ashton et al., 2004)
<b>Média Europeia</b>			<b>0,049 (0,174)</b>			(Loos et al., 2013)

n.a. não avaliado; n.d. não detectado; \*- valor médio

**Tabela 4.** Concentração média (máxima) de diclofenac em águas residuais e águas de superfície em diferentes países (µg/L)

Nos vários estudos realizados em afluentes e efluentes nas ETARs, na Alemanha (Heberer et al., 2002), na Coreia (Han et al., 2006; Sim et al., 2011), em Espanha (Gracia-Lor et al., 2012) e em Portugal (Salgado et al., 2010) verifica-se uma redução das concentrações nos efluentes, após os vários tratamentos preconizados nas diferentes ETARs.



Em alguns estudos foi apenas avaliada a ocorrência de diclofenac nos efluentes (Ternes, 1998; Kim, S. D. *et al.*, 2007; López-Serna *et al.*, 2010; Ashton *et al.*, 2004).

Na literatura científica existem alguns estudos que demonstram uma grande variabilidade da taxa de eliminação de diclofenac nas ETARs, entre 7 a 63% (Clara *et al.*, 2005). Os teores mais elevados foram reportados pela Alemanha (Heberer *et al.*, 2002) com concentrações de 3,02 e 2,51  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Portugal (Salgado *et al.*, 2010) foi o país em que se observou a concentração mais baixa de diclofenac, muito abaixo da média europeia, 0,049  $\mu\text{g/L}$ , de acordo com Loos *et al.* (2013). Na Coreia (Kim, S. D. *et al.*, 2007), na Alemanha (Ternes, 1998) e em Espanha (López-Serna *et al.*, 2010) foi ainda detectada a presença deste composto em águas de superfície com concentrações entre 0,003, 0,15 e 0,176  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

O diclofenac foi também encontrado em águas de consumo humano. A Tabela 5, apresenta as concentrações detectadas de diclofenac em águas de consumo, a nível mundial.

Fármaco	País	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Referências
Diclofenac	Alemanha	0,006	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)
	Espanha	n.d.	(López-Roldán <i>et al.</i> , 2010)
	Eslovénia	< 0,007	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
	EUA	0,00025	
	França	0,0025	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)

n.d. não detectado

**Tabela 5.** Presença de diclofenac nas águas de consumo a nível mundial

Na Europa, o diclofenac foi detectado em França (Mompelat *et al.*, 2009), Alemanha (Mompelat *et al.*, 2009) e Eslovénia (Santos *et al.*, 2010) em concentrações que variaram entre 0,0025, 0,006 e 0,007  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. A Eslovénia (Santos *et al.*, 2010) foi o país que apresentou maior concentração de diclofenac em água de consumo, por outro lado, não foi detectado em Espanha.



### I.4.2. Ibuprofeno

A ocorrência de ibuprofeno em afluentes e efluentes de ETARs e em águas de superfície tem sido reportada em vários estudos (Ternes, 1998; Cleuvers, 2003; Ashton et al., 2004; Lee et al., 2004; Han et al., 2006; Kim, S. D. et al., 2007; Santos et al., 2009; Salgado et al., 2010; Gracia-Lor et al., 2012) (Tabela 6).

Fármaco	País	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)	Água de superfície (µg/L)	Referências
<b>Ibuprofeno</b>	Alemanha	n.a.	0,37 (3,4)	n.a.	0,07 (0,53)	(Ternes, 1998)
	Coreia	0,300 (0,580)	0,070 (0,310)	77	n.d.	(Han et al., 2006)
	Coreia	n.a.	0,065 (0,137)	n.a.	0,028 (0,038)	(Kim, S. D. et al., 2007)
	Espanha	14,6 (19,1)	0,05	99,7	n.a.	(Gracia-Lor et al., 2012)
	Espanha	69,7 (353)	4,13 (26,5)	94,1	n.a.	(Santos et al., 2009)
	Portugal	(0,106)	(0,0436)	58,8	n.a.	(Salgado et al., 2010)**
	Reino Unido	n.a.	4,201 (27,256)	n.a.	n.a.	(Ashton et al., 2004)
	Suiça	1,75(4,5)	0,24 (28)	86	n.a.	(Cleuvers, 2003)
<b>Média Europeia</b>			<b>0,085 (2,13)</b>			(Loos et al., 2013)

n.a. não avaliado; n.d. - nada detectado; \*\* - concentração máxima

**Tabela 6.** Concentração média (máxima) de ibuprofeno em águas residuais e águas de superfície em diferentes países (µg/L)



De acordo com a tabela anterior, as concentrações de ibuprofeno à saída são também inferiores às concentrações detectadas à entrada, demonstrado a eficácia de remoção das ETARs (Han *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010; Cleuvers, 2003). Espanha (Santos *et al.*, 2009) e Reino Unido (Ashton *et al.*, 2004) foram os países que apresentaram maior concentração de ibuprofeno no efluente, com concentrações de 4,13 e 4,20  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Em Portugal (Salgado *et al.*, 2010) observou-se a concentração mais baixa de ibuprofeno, 0,0436  $\mu\text{g/L}$ , muito abaixo da média europeia, 0,085  $\mu\text{g/L}$ , de acordo com Loos *et al.* (2013).

O ibuprofeno foi também detectado em águas de superfície na Coreia (Kim, S. D. *et al.*, 2007), e na Alemanha (Ternes, 1998) em concentrações que variaram entre 0,028 e 0,07  $\mu\text{g/L}$ .

De acordo com Fent *et al.* (2006), a percentagem de remoção de ibuprofeno pode variar entre 97 e 100%, no entanto, é possível detectar a sua presença em águas de consumo humano (Tabela 7).

Fármaco	País	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Referências
Ibuprofeno	Alemanha	0,003	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)
	Eslovénia	< 0,012	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
	Espanha	0,00371	(López-Serna <i>et al.</i> , 2010)
	França	0,0006	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)
	Filândia	0,0085	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)
	EUA	1,350	(Mompelat <i>et al.</i> , 2009)

**Tabela 7.** Presença de ibuprofeno nas águas de consumo a nível mundial



Nos Estados Unidos (Mompelat *et al.*, 2009) foi detectada a concentração mais elevada, 1,350 µg/L de ibuprofeno na água de consumo humano, relativamente a outros valores encontrados em estudos europeus, como na Alemanha (Mompelat *et al.*, 2009), Finlândia (Mompelat *et al.*, 2009), França (Mompelat *et al.*, 2009), Espanha (López-Serna *et al.*, 2010) e Eslovénia (Santos *et al.*, 2010), cujos teores variaram entre 0,0006 e 0,0012 µg/L.

#### 1.4.3. Paracetamol

A ocorrência de paracetamol em águas residuais tem sido reportada por vários estudos científicos, desenvolvidos em diversos países, como na Coreia (Henschel *et al.*, 1997; Kim, S. D. *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2007), em Espanha (Gracia-Lor *et al.*, 2012) e Reino Unido (Santos *et al.*, 2010) (Tabela 8).

Fármaco	País	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)	Água de superfície (µg/L)	Referências
Paracetamol	Alemanha	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	(Ternes, 1998)
	Coreia	0,013(0,057)	<0,005 (0,127)	61,5	0,0041(0,073)	(Henschel <i>et al.</i> , 1997)
	Coreia	n.a.	0,0095 (0,019)	n.a.	0,033 (0,073)	(Kim, S. D. <i>et al.</i> , 2007)
	Coreia	8,81 (51,9)	n.d.	100	n.a.	(Sim <i>et al.</i> , 2011)
	Coreia	0,070 (0,260)	0,030 (0,160)	57,1	n.d.	(Park <i>et al.</i> , 2007)
	Espanha	44,8 (201)	n.d.	100	n.a.	(Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2012)
	Reino Unido	(0,050)	n.a.	n.a.	n.a.	(Santos <i>et al.</i> , 2010)

n.a. não avaliado; n.d. - nada detectado; \*\* - concentração máxima

**Tabela 8.** Concentração média (máxima) de paracetamol em águas residuais e águas de superfície em diferentes países (µg/L)



Como se pode constatar da análise da Tabela 8, os estudos realizados em afluentes e efluentes de ETARs na Coreia (Henschel *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2007) verifica-se uma redução da concentração à saída, indicando uma boa redução deste composto nas ETARs em questão. Em Espanha (Gracia-Lor *et al.* 2012), o paracetamol não foi detectado no efluente, evidenciando a completa remoção nesta ETAR.

Apesar da concentração deste fármaco à saída das ETARs ser relativamente baixa ou nula é possível detectar a sua presença em águas de superfície e águas de rios. De acordo com Kim S. D. *et al.* (2007) e Henschel *et al.* (1997), foi detectado na Coreia em concentrações entre 0,033 e 0,041 µg/L, em águas de superfície.

O paracetamol foi também detectado em águas de rio em Portugal. Um estudo realizado por Santos *et al.* (2013b), detectou não só a presença de paracetamol, mas também, do seu principal metabolito (paracetamol - glicuronídeo) e do seu principal produto de transformação (*p*-aminofenol) em águas de sete rios, localizados a norte do país. Verificou-se a presença de todos os compostos em estudo, sendo a primeira vez que o paracetamol-glicuronídeo foi encontrado em água de rio, em concentrações até 3,57 mg/L.

### **1.5. Ecotoxicologia dos compostos farmacêuticos**

A Directiva Europeia 2001/83/CE, que mais tarde veio a ser alterada pela Directiva 2010/84/UE, no que diz respeito ao estabelecimento de um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano, fixa regras harmonizadas para a autorização, supervisão e farmacovigilância dos medicamentos para uso humano na União Europeia.

Como já foi referido anteriormente, em 2013, com a implementação da nova Directiva Europeia 2013/39/UE, foi incluído pela primeira vez na lista de vigilância três medicamentos, entre os quais o diclofenac, numa nova abordagem estratégica em matéria de poluição da água por substâncias farmacêuticas.

Os conhecimentos científicos sobre o destino e o efeito dos resíduos de medicamentos na água evoluíram consideravelmente nos últimos anos, representando uma ameaça para o ecossistema aquático.

Estes podem provocar efeitos de toxicidade para os organismos aquáticos, acumulação nos ecossistemas, assim como, perda de *habitats* e de biodiversidade.





Actualmente sabe-se que existe uma multiplicidade de factores que podem influenciar o efeito provocado nos organismos aquáticos, como o tipo de resíduo químico e o tempo de exposição (Kümmerer, 2008). Acrescenta-se o facto destes organismos não estarem somente expostos a compostos farmacêuticos mas a uma mistura de substâncias químicas presentes nas águas, incluindo pesticidas, biocidas e produtos químicos industriais em geral. Consequentemente, o comportamento ambiental de uma substância pode ser alterado na presença de outras substâncias (Boxall, 2004; Kümmerer, 2008) e estes podem ter, ou não, efeitos antagonistas/sinérgicos em conjunto com outras substâncias que partilhem o mesmo mecanismo de acção (Kümmerer, 2008). Todos estes factores podem interferir de forma significativa na fisiologia, metabolismo, comportamento e reprodução dos organismos aquáticos (Boxall, 2004; Fent *et al.*, 2006).

Por constituir uma ameaça para a saúde pública, foi premente o desenvolvimento de procedimentos de avaliação do risco ambiental com base em dados de estudos ecotoxicológicos. Foram realizados vários estudos de toxicologia em invertebrados, algas e peixes. Estes são extremamente relevantes para poder prever por extrapolação os impactos dos resíduos de medicamentos no Homem e nos ecossistemas, baseando-se na hipótese de que os modos de acção são semelhantes em seres humanos (Crane *et al.*, 2006).

Os testes de toxicidade podem ser classificados como agudos e crónicos. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para estimar a dose ou concentração de um agente tóxico sobre organismos-teste ou população durante um curto período de tempo, geralmente de 24 a 96 horas.

Por outro lado, os testes de toxicidade crónica são testes que permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas e multigeracionais, devido à exposição contínua a resíduos de medicamentos no meio aquífero (Gros *et al.*, 2010; Regina *et al.*, 2008).

A toxicidade de um composto é geralmente, expressa pelos parâmetros da Tabela 9.



Toxicidade	Parâmetros
Aguda	EC <sub>50</sub> - Concentração afectiva
	LC <sub>50</sub> - Concentração letal
Crónica	NOEL - Nível sem efeito observado NOEC - Concentração sem efeito observado
	LOEL - Nível mais baixo com Efeito Observado LOEC - Menor concentração com efeito observado

**Tabela 9.** Parâmetros de toxicidade aguda e crónica (Adaptado de Regina *et al.*, 2008)

O termo EC<sub>50</sub> é definido como a concentração de uma determinada substância tóxica que provoca uma resposta em 50% da população de organismos em estudo. Desta forma, quanto menor for o seu valor, mais tóxica é a substância testada para os organismos. Do mesmo modo, a LC<sub>50</sub> é aquela que provoca a morte de metade da população de organismos presentes no ensaio (Regina *et al.*, 2008).

### 1.5.1. Ecotoxicologia do diclofenac

Na literatura científica é possível encontrar diferentes ensaios de toxicidade aguda e crónica, realizados para avaliar os efeitos de diclofenac em organismos-teste. A Tabela 10 resume alguns desses testes de toxicidade em diferentes espécies de invertebrados, algas e peixes, relatados na literatura científica.



Taxon	Espécie	Tempo	Concentração	Toxicologia endpoint	Teste (efeito)	Referências
Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	48h	224,30 µg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Ferrari et al., 2003)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48h	22,7 µg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	
	<i>Daphnia magna</i>	48h	68 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Cleuvers, 2003)
	<i>Daphnia magna</i>	48h	80,1 mg/L	EC <sub>50</sub>	Morte	(Han et al., 2006)
Algas	<i>Dunaliella Tertiolecta</i>	96 h	185,690 µg/L	EC <sub>50</sub>	Inibição do crescimento	(Santos et al., 2010)
	<i>P. subcapitata</i>	96 h	10 µg/L 20 µg/L	NOEC LOEC	Inibição do crescimento	
Peixes	<i>Danio rerio</i> (Ovos)	72h	5,3 mg/L 1,5 mg/L	EC <sub>50</sub> NOEC	Deformação da cauda	(Van den Brandhof e Montforts, 2010)
	<i>Danio rerio</i>	96 h	214 mg/L	EC <sub>50</sub>	Morte	(Haap et al., 2008)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 dias	<1 µg/L 1 µg/L	NOEC LOEC	Alterações citopatológicas	(Triebkorn et al., 2004)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 dias	5µg/L	LOEC	Lesões renais Alterações das guelras	(Schwaiger et al., 2004)

**Tabela 10.** Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com diclofenac

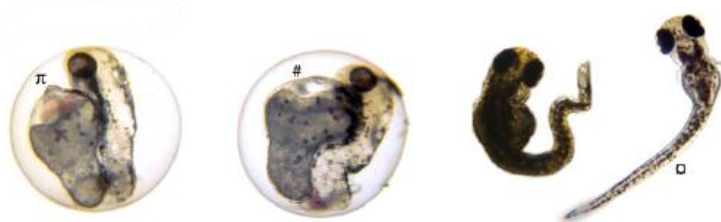
Nos invertebrados, foram realizados apenas ensaios de toxicidade aguda e verifica-se que toda a população apresenta uma resposta adversa ao diclofenac, em 50% dos organismos em estudo.



No caso da *Ceriodaphnia dubia* (Ferrari *et al.*, 2003), verifica-se maior sensibilidade para o diclofenac, uma vez que, a exposição de 48 horas a uma concentração de 22,7 µg/L, foi capaz de causar a imobilização a 50% da população em estudo. Por outro lado, a *Daphnia magna* (Ferrari *et al.*, 2003) apresenta uma sensibilidade menor, observando-se a imobilização de metade da população para uma exposição a uma concentração dez vezes superior, 224,30 µg/L.

Para ensaios realizados em algas, também apenas se encontram descritos estudos de toxicidade aguda. Segundo Santos *et al.*, (2010), a espécie *Dunaliella Tertiolecta* apresentou toxicidade após um período de exposição de 96 horas a uma concentração de de 185,690 µg/L, observando-se efeitos adversos no crescimento da população. Estes efeitos foram também observados na alga *P. subcapitata* após a exposição a 96 horas com concentração de diclofenac entre 10 e 20 µg/L.

Um ensaio realizado em ovos de peixe *Danio rerio*, verificou-se que uma concentração de 5,3 mg/L de diclofenac durante 72 horas, provocou a deformação da cauda a 50% da população de embriões em estudo (Van Den Brandhof e Montforts, 2010) (Figura 4).



**Figura 4.** Resultado do ensaio de toxicidade realizado em ovos de peixe *Danio rerio* (Adaptado de Van den Brandhof e Montforts, 2010)

Verificou-se também, de acordo com Haap *et al.* (2008) que o diclofenac numa concentração de 214 mg/L durante 96 horas, provocou a morte a 50% da população de *Danio rerio*.

No caso dos peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss*, após 28 dias, a menor concentração aplicada capaz de provocar alterações citopatológicas, correspondeu a 1 µg/L de diclofenac (Triebkorn *et al.*, 2004).



Um ensaio realizado para a mesma espécie de peixes que a anterior, de acordo com Schwaiger *et al.* (2004), os organismos apresentaram uma toxicidade crónica para o diclofenac, observando-se lesões renais e alterações nas guelras após 28 dias de ensaio. A menor concentração aplicada em que se observa um efeito adverso na população, foi de 5 µg/L. Verificou-se também, a bioacumulação de diclofenac no organismo dos peixes, mais especificamente, no fígado, rins, guelras e músculo. Os factores de bioconcentração no fígado podem variar entre 10 e 2700 vezes e no rim entre 5 e 1000 vezes.

Um dos casos mais mediáticos de bioacumulação do diclofenac publicado na Nature, refere-se à diminuição drástica da população de abutres na Índia e no Paquistão, cerca de 97% em três anos. Esta foi devida à ingestão involuntária de diclofenac através de carcaças de gado tratadas com diclofenac, antes das suas mortes. Estas aves necrófagas, acabaram por morrer por insuficiência renal aguda, demonstrado elevada sensibilidade para este medicamento (Oaks *et al.*, 2004).

Um estudo científico realizado por Cuklev *et al.* (2011), permitiu a comparação directa dos níveis de plasma sanguíneo em peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss* com os níveis plasmáticos no Homem, após a exposição a diclofenac. O estudo revelou que após a exposição a uma concentração máxima de 81,5 mg/L durante duas semanas, a concentração no plasma do peixe atingiu, cerca de 88% dos níveis terapêuticos humanos.

### 1.5.2. Ecotoxicidade do ibuprofeno

A ocorrência ambiental de ibuprofeno, juntamente com a elevada utilização por parte da população, faz com que a exposição aguda e crónica a ibuprofeno, em ambiente aquático, possa afectar a vida dos organismos (Paíga *et al.*, 2013). Alguns investigadores realizaram ensaios de toxicidade para avaliar os efeitos provocados por ibuprofeno em organismos-teste. A tabela seguinte resume alguns desses ensaios de toxicidade em diferentes espécies de invertebrados, algas e peixes.



Taxon	Espécie	Tempo	Concentração	Toxicologia endpoint	Efeito	Referências
Invertebrados	<i>Hydra attenuata</i>	24h	22,36 mg/L	LC <sub>50</sub>	Mortalidade	(Quinn et al., 2007)
		96 h	1,65 mg/L	EC <sub>50</sub>	Morfologia	
	<i>Daphnia magna</i>	48h	108 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Cleuvers, 2003)
	<i>T. platyurus</i>	24h	19,59 mg/L	LC <sub>50</sub>	Mortalidade	(Y. Kim et al., 2007)
	<i>Planorbis carinatus</i>	72h	17,1 mg/L	LC <sub>50</sub>	Sobrevivência	(Pounds et al., 2008)
		21 dias	5,36 mg/L	NOEC	Sobrevivência	
		21 dias	2,43 mg/L	LOEC	Crescimento	
			1,02 mg/L	NOEC		
21 dias	5,36 mg/L	LOEC	Reprodução			
	2,43 mg/L	NOEC				
Algas	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	3 dias	315 mg/L	EC <sub>50</sub>	Inibição do crescimento	(Cleuvers, 2003)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	-	342,2 mg/L	EC <sub>50</sub>	Inibição do crescimento	(Cleuvers, 2004)
	<i>Lemna minor</i>	7 dias	22 mg/L	EC <sub>50</sub>	Inibição do crescimento	
Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	21 dias	1 µg/L	LOEC	Citopatologia do fígado	(Santos et al., 2010)

**Tabela II.** Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com o Ibuprofeno



No caso dos invertebrados foram realizados testes de toxicidade aguda para os organismos *Hydra attenuata* (Quinn et al., 2007), *Daphnia magna* (Cleuvers, 2003) e *T. platyurus* (Y. Kim et al., 2009).

No ensaio realizado para a espécie *Hydra attenuata* (Quinn et al., 2007), verificou-se maior sensibilidade para o ibuprofeno, uma vez que, uma exposição a 1,65 mg/L durante 96 horas provocou alterações morfológicas em 50% da população em estudo. Por outro lado, as espécies *T. platyurus* (Y. Kim et al., 2009) e *Hydra attenuata* (Quinn et al., 2007) após um período de exposição a 24 horas a uma concentração de 19,59 e 22,36 mg/L, respectivamente, verificou-se a morte de 50% dos organismos no ensaio toxicológico. A população de *Daphnia magna* (Cleuvers, 2003) foi a espécie em que se observou menor sensibilidade, apresentando sinais de imobilização após um período de 48 horas a uma concentração de 108 mg/L.

Foram também realizados testes de toxicidade crónica em invertebrados, em caracóis da espécie *Planorbis carinatus* (Pounds et al., 2008), em que se avaliou a exposição em várias fases, no crescimento, reprodução e sobrevivência destes organismos. O crescimento, foi a fase que apresentou mais sensibilidade ao ibuprofeno, verificando-se que, a menor concentração com efeito observado foi de 2,43 mg/L.

As algas da espécie *Desmodesmus subspicatus* (Cleuvers, 2003) apresentaram maior sensibilidade, uma vez que a exposição a um período de 3 dias a uma concentração 315 mg/L de ibuprofeno, provocou a inibição do crescimento de 50% da população. Por outro lado, a alga da espécie *Lemna minor* (Cleuvers, 2004), após uma exposição de 7 dias a 22 mg/L também apresentou efeitos adversos no seu crescimento.

Em relação aos peixes, um ensaio realizado na espécie *Oncorhynchus mykiss* (Santos et al., 2010), observou-se que após a exposição de 21 dias, a menor concentração de ibuprofeno com efeito observado foi de 1 µg/L, apresentando sinais de citopatologia no fígado.



### I.5.3. Ecotoxicidade do paracetamol

Muitos estudos científicos têm sido realizados para avaliar a ecotoxicidade do paracetamol no ambiente aquático. Foram desenvolvidos processos de investigação em organismos-alvo, como invertebrados, algas e peixes para determinar os efeitos adversos à exposição do medicamento (Tabela 12).

Taxon	Espécie	Tempo	Concentração	Toxicologia <i>endpoint</i>	Teste (efeito)	Referências
Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	48h	30,1 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Daphnia magna</i>	48h	50 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Henschel <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Daphnia magna</i>	48 h	9,2 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Claessens <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Daphnia magna</i>	96 h	26,6 mg/L	EC <sub>50</sub>	Imobilização	(Y. Kim <i>et al.</i> , 2007)
Alga	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	72h	134 mg/L	EC <sub>50</sub>	Inibição do crescimento	(Henschel <i>et al.</i> , 1997)
Peixes	<i>Orzias latipes</i>	96 h	160 mg/L	EC <sub>50</sub>	Mortalidade	(Y. Kim <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Danio rerio</i>	48 h	378 mg/L 920 mg/L	LC <sub>50</sub> LC <sub>50</sub>	Pulsação dos embriões de peixe	(Henschel <i>et al.</i> , 1997)

**Tabela 12.** Resumo dos ensaios de ecotoxicidade com o Paracetamol



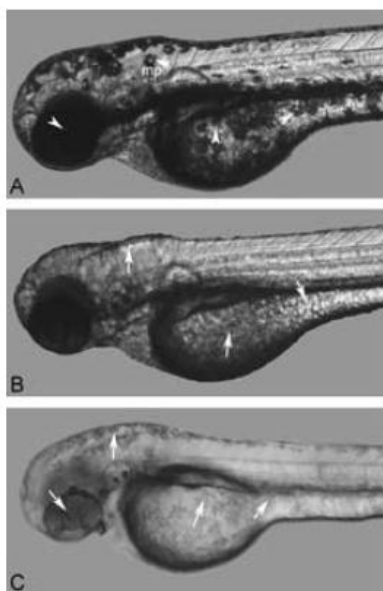


Após a análise da tabela anterior, verifica-se que a espécie de invertebrados *Daphnia magna* (Claessens et al., 2013), apresenta maior sensibilidade para o paracetamol, visto que, após a exposição a um período de 48 horas a uma concentração de 9,2 mg/L provocou a imobilização de 50% da população em estudo.

Nas algas, observou-se a inibição do crescimento da espécie *Scenedesmus subspicatus* (Henschel et al., 1997), após a exposição a 72 horas a uma concentração de 134 mg/L de paracetamol.

No caso dos peixes, um ensaio toxicológico realizado por Y. Kim et al., 2007, em peixes da espécie *Orzias latipes*, verificaram que a exposição a 96 horas a 26,6 mg/L, provocou a morte de 50 % da população.

Um ensaio toxicológico realizado em 30 ovos de peixe da espécie *Danio rerio*, avaliou a exposição ao paracetamol em concentrações, que variaram entre 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg/L, durante sete dias consecutivos. Os resultados obtivos, revelam que o paracetamol interferiu com o normal desenvolvimento embrionário, com o crescimento, com o comportamento, morfologia e a sobrevivência de larvas de *Danio rerio*. A Figura 5, evidência a pigmentação reduzida nos embriões, devido à exposição a 50 mg/L (B) e a 100 mg/L (C) de paracetamol (David e Pancharatna, 2009).



**Figura 5.** Resultado do ensaio de toxicidade em larvas de peixes *Danio rerio* (A) controlo; (B) 50 mg/L; (C) 100 mg/L (Adaptado de David e Pancharatna, 2009)



Nunes *et al.*, 2014, realizaram testes de toxicidade aguda em duas espécies de plantas aquáticas, *Lemna gibba* e *Lemna minor*, para avaliar a exposição a paracetamol. Os biomarcadores selecionados foram, o número de folhas, a biomassa, o teor em clorofila e prolina. O ensaio realizado reporta diferentes resultados entre as duas espécies de algas, apresentado um risco ecotoxicológico para a alga *L. minor*, uma vez que, se verificou uma diminuição significativa no número de frondes após a exposição a 446,6 mg/L de paracetamol. Por outro lado, não foram observados efeitos adversos no teor de clorofila nem na biomassa total, em ambas as espécies.



## 2. Metodologias analíticas dos compostos farmacêuticos

A crescente contaminação ambiental provocada por resíduos de fármacos no ambiente aquático, impõe o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, exactas e precisas para a identificação e quantificação destes compostos químicos, a nível residual.

De um modo geral, na determinação de fármacos em águas procede-se à extração em fase sólida para eliminação dos interferentes e pré-concentrar dos analitos existentes na amostra, seguida da análise cromatográfica (López-Roldán *et al.*, 2010; Orlando *et al.*, 2009; Singh, 2013). Este procedimento não é obrigatório e alguns investigadores não efectuam este pré-tratamento da amostra, enquanto que outros investigadores defendem que a preparação da amostra permite obter melhores resultados.

As técnicas de extração mais utilizadas, actualmente, pela comunidade científica são a extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME), sendo a SPE a mais descrita na literatura científica.

Vários investigadores utilizam a técnica SPE na análise multiresíduo de medicamentos em águas (Castiglioni *et al.*, 2006; Fram & Belitz 201; Heberer, 2002; Hilton e Thomas 2003; Radjenović *et al.*, 2009), enquanto que, Salgado *et al.* (2010), aplicou a SPME na análise de 65 produtos farmacêuticos em cinco ETARs em Portugal.

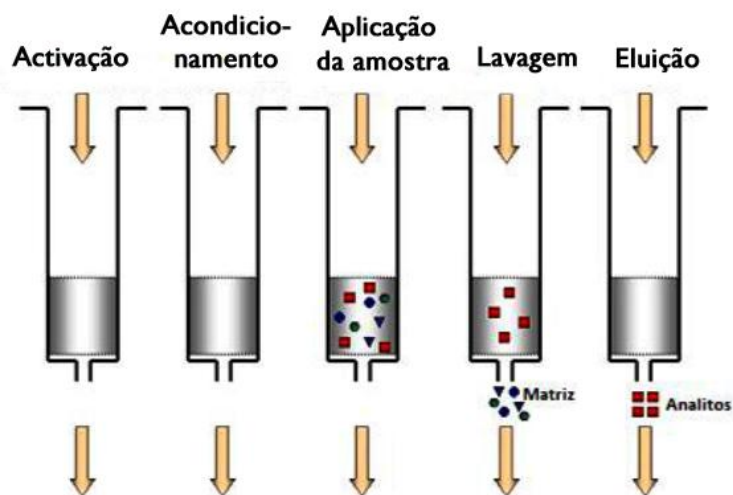
Para além das etapas de extração da amostra, a separação é igualmente importante durante o processo analítico. A capacidade de separação é ainda mais importante quando há a necessidade de determinar um grande número de analitos em simultâneo. Os métodos analíticos utilizados na determinação de compostos farmacêuticos no ambiente aquífero são normalmente baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) (Alda *et al.*, 2003)

### 2.1. Princípios gerais de Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida é um método bastante utilizado devido à sua rapidez, ao facto de requerer pouco volume de solvente orgânico e apresenta uma grande flexibilidade de eluentes (Mastroianni *et al.*, 2010; Orlando *et al.*, 2009).



Esta técnica permite que os analitos contidos numa matriz aquosa sejam extraídos selectivamente, eliminando grande parte dos compostos interferentes (Regina *et al.*, 2001). O processo de extracção pode ser dividido em cinco fases, como está representado na Figura 6.



**Figura 6.** Esquema das etapas da Extração em Fase Sólida [Imagem Online] Disponível em: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>> Acesso em Fev. 2014)

O processo inicia-se com a activação das colunas de extração com a adição de um solvente, para permitir a solvatação dos compostos, seguida da adição de água de forma a garantir o acondicionamento. Adiciona-se a amostra de forma a reter os compostos de interesse, concentrando-os no suporte sólido. A etapa seguinte consiste na lavagem da coluna, que permite a remoção dos interferentes da matriz que ainda possam ter ficado retidos no passo anterior. Para finalizar, efectua-se a eluição com um determinado volume de solvente, seleccionado especificamente para romper a interacção analito/adsorvente, de modo a recuperar os compostos de interesse (Sousa *et al.*, 2011).

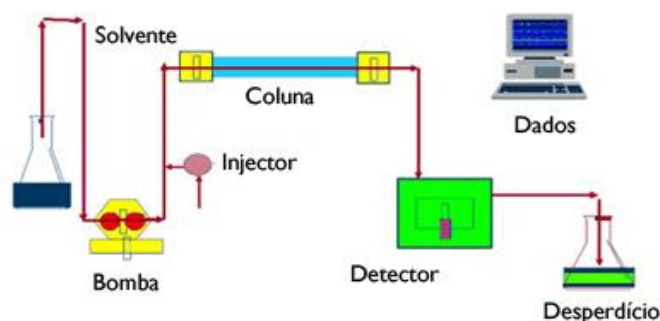
Existe uma grande diversidade de colunas de extração em fase sólida, destacam-se as colunas poliméricas e as colunas de troca iónica.



## 2.2. Princípios gerais da Cromatografia Líquida

Esta técnica permite, separar misturas de analitos com a introdução num sistema constituído por uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM), a pressões elevadas (Mcpolin, 2009; Singh, 2013). As técnicas mais utilizadas de cromatografia líquida é a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e a *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) (Mcpolin, 2009).

O sistema cromatográfico é constituído por um solvente, bomba, injector, coluna e um detector, como está representado na Figura 6.



**Figura 7.** Esquema do funcionamento do sistema HPLC (Adaptado de Zoloco, 2012)

Vários investigadores utilizaram esta técnica na determinação de compostos farmacêuticos em águas, sendo a HPLC a mais utilizada, como por exemplo, na determinação da ocorrência de compostos farmacêuticos em águas residuais em Espanha (Gracia-Lor *et al.*, 2012) e na avaliação de compostos farmacêuticos de uso humano, como o diclofenac e o ibuprofeno, em amostras de efluentes e águas de superfície (Hilton e Thomas 2003).

A UHPLC, apesar de ser uma técnica mais recente e mais dispendiosa, é actualmente bastante utilizada por vários investigadores, devido às inúmeras vantagens que apresenta: maior rapidez de análise, maior resolução e selectividade e menos poluente. Esta técnica foi utilizada na determinação de 21 tipos de antibióticos em águas residuais (Li *et al.*, 2009), na ocorrência de diferentes contaminantes emergentes, como medicamentos e pesticidas em águas (Mastroianni *et al.*, 2010), na determinação de compostos farmacêuticos, como o diclofenac, o ibuprofeno e o paracetamol em águas residuais, no Japão (Okuda *et al.*, 2009).



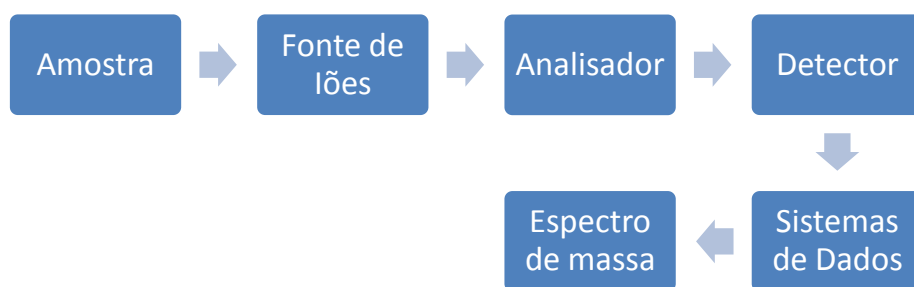
### 2.2.1. Detector de espectrometria de massa

Neste tipo de análise, a detecção tem de ser efectuada por espectrometria de massa, devido à sua especificidade.

A espectrometria de massa, de uma forma geral, consiste na determinação da relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa, baseando-se nas propriedades físicas do analíto (Bramer, 1998).

Este método é largamente utilizado pela comunidade científica devido à sua sensibilidade, sendo capaz de fornecer informações sobre a composição, estrutura molecular, composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, mesmo em baixas concentrações (Zocolo, 2012).

Um espectrómetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de dados (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema da estrutura básica de um espectrómetro de massa  
(Fonte: Elaborado pelo autor, 2014)

Os métodos de ionização mais comuns são a ionização por electrões (EI), ionização química (CI), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), *Fast Atom Bombardment* (FAB), *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) e ionização por *electrospray* (ESI) (Zocolo, 2012).

A ionização por *electrospray*, rapidamente se tornou numa das técnicas analíticas mais utilizadas pelos investigadores, devido à sua alta selectividade e sensibilidade, o baixo consumo de amostra, a compatibilidade com diferentes tipos solventes e a facilidade de utilização (Bramer, 1998; Ho *et al.*, 2003).



Após a ionização, é essencial realizar a separação dos iões e a medição das intensidades, para tal, existem vários tipos de analisadores, por exemplo, analisador de sector magnético, quadrupolo (Q), *Time of Flight* (TOF) e *Ion Trap* (IT).

No caso da detecção, pode ser realizada com vários tipos diferentes de detectores como *Post acceleration*, *Microchannel plate* ou *Photo diode array*, sendo o mais utilizado na maioria dos ensaios o *Electron multiplier* (Ho et al., 2003)

Por fim, o sistema de dados permite, através de um computador, a obtenção de espectro de massa dos componentes em análise.

Estes métodos são fundamentais na determinação de compostos farmacêuticos nas águas, evitando o impacto nos ecossistemas e na saúde do Homem.



# Trabalho experimental





### 3. Trabalho Experimental

O trabalho consiste na avaliação da ocorrência de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol em águas residuais, através da extração em fase sólida seguida por cromatografia líquida com detecção de massa em *tandem* (SPE/LC/MS-MS), acordo com o método de Sousa *et al.* (2011), tendo-se procedido à revalidação da metodologia analítica.

#### 3.1. Amostragem

Procedeu-se à recolha de quinze amostras de águas de ETARs, à entrada (afluente) e à saída (efluente) em cinco regiões diferentes de Portugal (Zona Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve), no Verão de 2013. As regiões foram seleccionadas de acordo com a população servida e com os seus pontos de descarga nos principais rios portugueses e Oceano Atlântico. Foi retirado para análise, um litro de água residual de 24 horas de afluentes e efluentes, armazenadas em recipientes de polietileno de alta densidade, previamente lavado com água bi-distilada e foram transportadas refrigeradas até o laboratório. Após a chegada, as amostras foram congeladas e armazenadas a -20 °C até à análise.

#### 3.2. Materiais e Reagentes

- Azoto Stuart and Block Heater Sample Concentration
- Bomba de vácuo Buchi Vacuum Pump V-700
- Colunas Oasis MAX (500 mg, 6 ml)
- Filtro de microfibras de vidro Whatman 934-AH
- Filtro de membrana Sartorius Biolab Products Cellulose Nitrate Filter 0,45 µm
- Filtro de membrana Whatman membranfilter 0,2 µm
- Frascos Erlenmeyer
- Medidor de pH Hanna Instruments
- Pipeta volumétrica 10 ml
- Pipeta volumétrica 5 ml
- Suporte
- Tubos de ensaio



## Reagentes

- Ácido Clorídrico (35%) Carlo ERBA
- Água Milli-Q
- Metanol Carlo ERBA para HPLC

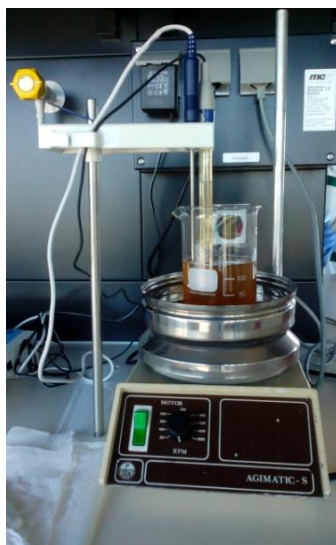
### 3.3. Procedimento experimental

Primeiramente, as amostras foram retiradas do congelador e colocadas à temperatura ambiente para descongelar. As amostras ambientais são complexas e exigem uma série de etapas de preparação e limpeza antes da extração. Desta forma, as amostras foram filtradas com três filtros diferentes, um filtro de microfibras de vidro, um filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e 0,2  $\mu\text{m}$ , reduzindo o risco de entupimento, o tempo de extração e permitindo um melhor desempenho analítico do processo (Figura 9).



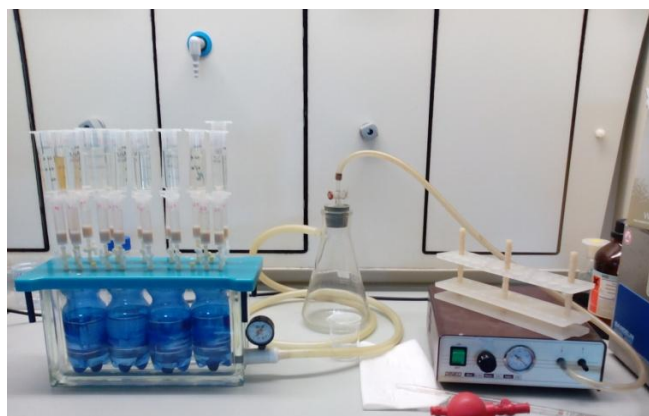
**Figura 9.** Filtração das amostra (Fonte: elaborado pelo autor, 2014)

Seguidamente, cada uma das amostras foi acidificada com ácido clorídrico (37 %) até pH 2 (Figura 10), alterando a carga molecular promovendo a precipitação dos interferentes. Experiências anteriores, demonstraram que a acidificação da amostra com HCl a pH 2 é obrigatória para assegurar a retenção adequada no adsorvente de alguns compostos (Sousa *et al.*, 2011)



**Figura 10.** Acidificação da amostra (Fonte: elaborado pelo autor, 2014)

A extracção e purificação foi realizada através de colunas Oasis MAX (500 mg, 6ml), estas têm a particularidade de conseguir reunir numa só coluna, especificidade para compostos hidrofílicos-lipofílicos e aniónicos. Seguidamente, as colunas foram pré-condicionadas com 6 ml de metanol, seguido por 3 ml de água Milli-Q a pH 2. Posteriormente, a amostra de águas residuais (100 ml para afluente e 50 ml para efluente) foi aplicada com um fluxo de 10 m/min e a coluna foi lavada com 3 ml de água Milli-Q. Deixou-se secar durante 15 minutos e a eluição foi realizada com a adição de 3 ml de metanol, por duas etapas (Figura 11).



**Figura 11.** Extração em fase sólida com Colunas Oasis MAX 500 mg (Fonte: Elaborado pelo autor, 2014)

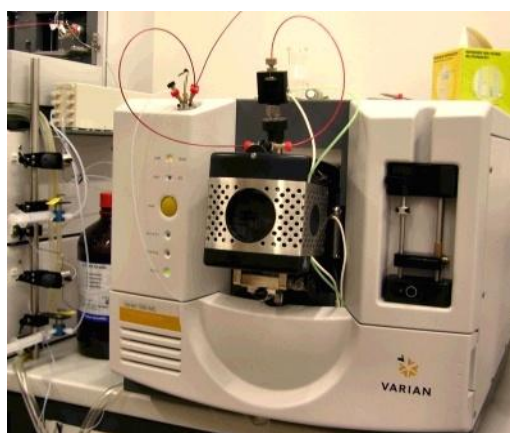


O eluente foi evaporado até à secura, a 45°C sob uma corrente suave de azoto (Figura 12). A amostra foi depois reconstituída com 200 µL de metanol/água Milli-Q (35:65 v/v) para proceder à análise cromatográfica.



**Figura 12.** Secagem das amostras com azoto (Fonte: elaborado pelo autor, 2014)

Foi utilizado um sistema LC/MS-MS equipado com duas bombas *Varian 210 HPLC*, um espectrómetro de massa *Varian 500 MS Ion Trap* (Figura 12) e um amostrador automático *ProStar 410*, também da marca *Varian*. Foi utilizada uma coluna analítica *Pursuit UPS C18*, de dimensão curta (2,1 milímetros i.d x50 mm, 2,4 mm) *Varian* e uma pré-coluna com as mesmas características (2,1 milímetros i.d x10 mm, 3 mm).



**Figura 13.** Espectrómetro *Varian 500-MS* com a fonte ESI (meio) [Imagem Online] Disponível em: < <http://wwwuser.gwdg.de/~instphyt/karlovsky/lab/Iontrap500MS/> > Acesso em Março 2014)



O sistema de gradiente iniciou-se com 25 % de metanol, atingindo os 75 % de gradiente em 8 min e os 100 % de metanol em 10 min, mantendo-se até aos 13 minutos. No final, esta foi re-equilibrada com as condições iniciais de 1 minuto e depois estabilizada, por 8 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C e o auto-amostrador a 10°C.

Os parâmetros de ionização *electrospray* foram otimizados por infusão de padrões de modo a maximizar a sensibilidade. A confirmação dos resultados positivos em amostras reais foi efectuada por comparação com os espectros MS dos padrões.

O software utilizado para o processamento de dados foi o *Varian MS Workstation* versão 6.9.1.



## 4. Resultados

### 4.1. Revalidação do método

A revalidação do método, realizada de acordo com Sousa *et al.* 2011, compreendeu a avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e efeito da matriz.

A linearidade foi determinada através das curvas de calibração, através de padrões e extrações em água Milli-Q, com um intervalo de concentrações entre 0,01 e 2 µg/L. Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) observados foram adequados, tendo oscilado entre 0,9926 e 0,9992 e o efeito matriz matriz foi negligenciado.

Os valores do limite de detecção (LOD), do limite de quantificação (LOQ), da recuperação e do desvio padrão relativo (RSD), para os respectivos medicamentos em estudo, estão representados na Tabela 13.

Composto farmacêutico	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)		Recuperação (%)		RSD (%)	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
Diclofenac	0,0167	0,0150	0,0556	0,0500	70,6	88,2	7,2	5,9
Ibuprofeno	0,0612	0,060	0,2041	0,200	73,6	72,5	12,5	11,1
Paracetamol	0,010	0,0094	0,0333	0,0313	*	68,6	*	13,0

\* - Contaminação da amostra com concentrações muito elevadas, não permitindo o cálculo destes parâmetros

**Tabela 13.** Valores de LOD, LOQ, recuperação e RSD para o diclofenac, ibuprofeno e paracetamol

De um modo geral, os valores de LOQ e LOD variaram entre 0,0313 e 0,2041 µg/L e 0,0094 e 0,0612 µg/L, respectivamente. Os ensaios de recuperação foram realizados para determinar a exatidão e a precisão nas amostras de afluentes e efluente das ETARs. A exactidão apresentou percentagens que variaram entre 68,6 e 88,2 % e a precisão oscilou entre 5,9 e 13 %.

Seguidamente, apresentam-se os resultados obtidos no trabalho experimental, as concentrações determinadas, no afluente e efluente, assim como, as percentagens de remoção das respectivas quinze ETARs, em cinco regiões diferentes de Portugal (Tabela 14).

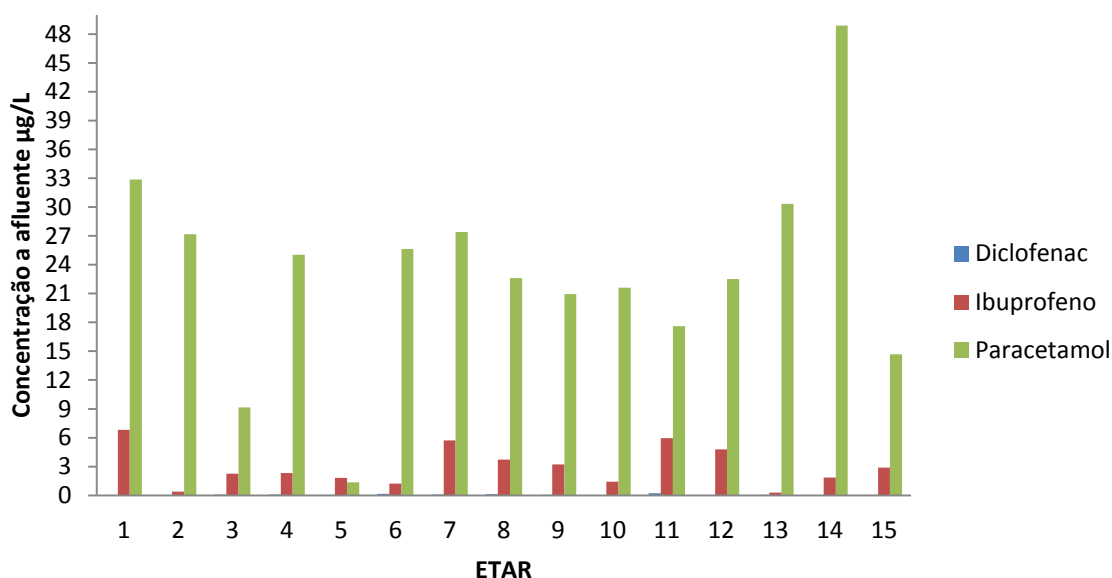




## 4.2. Discussão dos resultados

Da análise geral dos resultados, podemos constatar a presença de diclofenac, de ibuprofeno e paracetamol à entrada das 15 ETARs, em estudo.

O gráfico seguinte permite uma melhor visualização dos diferentes teores de compostos farmacêuticos detectados nos afluentes das diferentes ETARs.



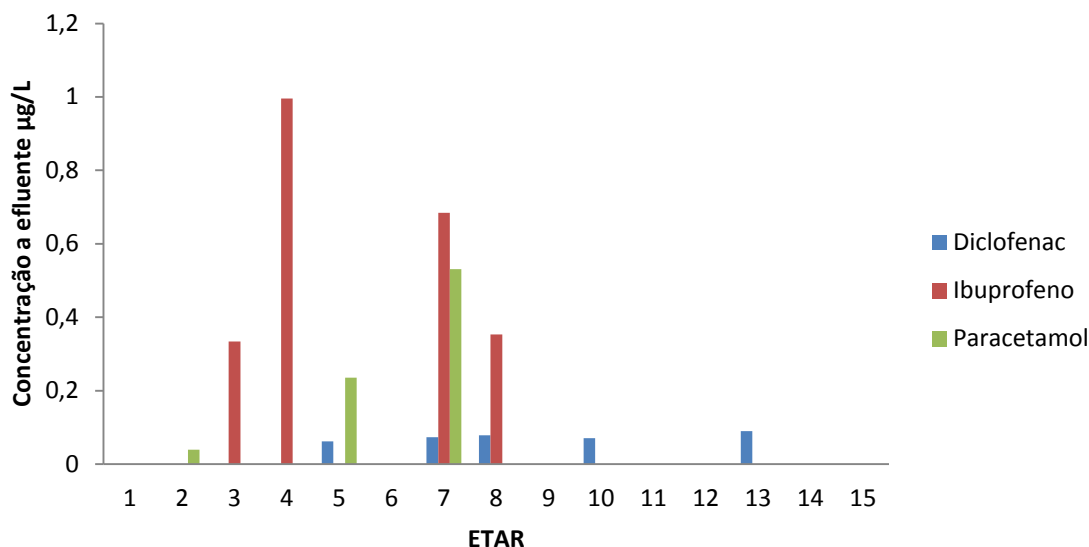
**Gráfico I.** Concentração de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol nos afluentes de 15 ETARs (µg/L)

Os teores mais elevados foram detectados para o paracetamol, com uma concentração máxima de 48,878 µg/L, seguindo-se o ibuprofeno e o diclofenac com concentrações de 5,944 e 0,2327 µg/L, respectivamente.

Estes resultados estão directamente relacionados com o padrão dos dados de consumo. Como já foi referido anteriormente, de acordo com o INFARMED I.P. (2011), estes compostos farmacêuticos ocuparam as primeiras posições no ranking das 100 substâncias activas mais vendidas em Portugal. O paracetamol foi o segundo medicamento mais vendido no país, seguido do ibuprofeno que ocupou o nono lugar do ranking e o diclofenac posicionou-se em décimo sétimo lugar no top de vendas.

A ocorrência dos compostos farmacêuticos foi também observadas nos efluentes, verificando-se uma redução nas concentrações dos compostos farmacêuticos à saída das ETARs, como podemos observar no Gráfico 2.



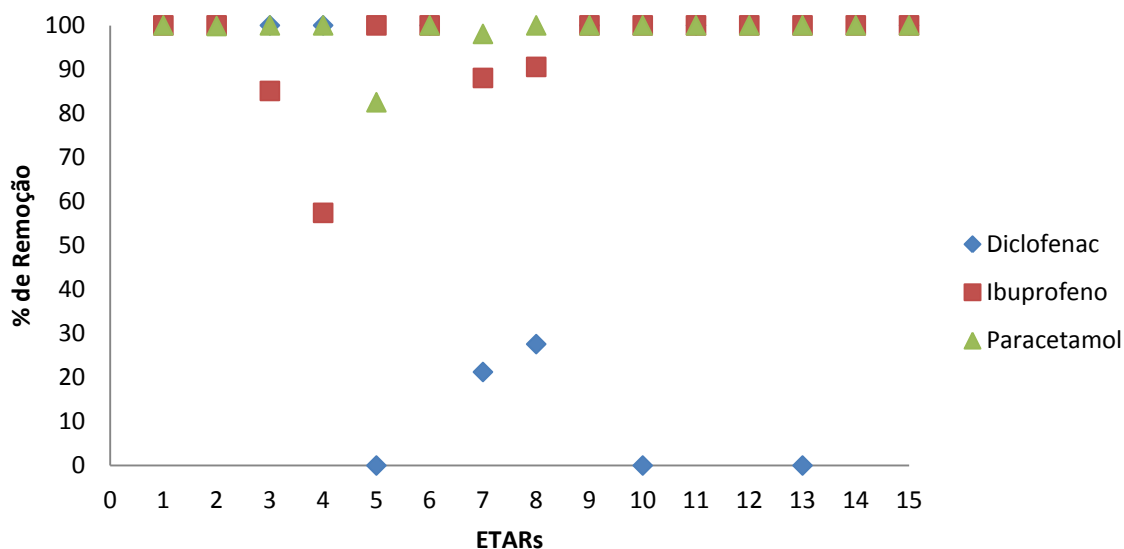


**Gráfico 2.** Concentração de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol nos efluentes de 15 ETARs ( $\mu\text{g/L}$ )

De acordo com o gráfico anterior, o ibuprofeno é o composto farmacêutico em que se observa teores mais elevados, com uma concentração máxima de  $0,995 \mu\text{g/L}$ , seguindo-se o paracetamol com teores máximos de  $0,530 \mu\text{g/L}$  e o diclofenac com  $0,0901 \mu\text{g/L}$ , verificando-se uma grande variabilidade nos teores encontrados.

Da análise comparativa dos resultados obtidos neste estudo com os obtidos no estudo de Loos *et al.*, (2013), realizado nos efluentes de 90 ETARs urbanas europeias, podemos verificar que os valores médios para o diclofenac ( $0,0249 \mu\text{g/L}$ ), foram bastante inferiores aos reportados por Loos *et al.* (2013), de  $0,049 \mu\text{g/L}$ . Em relação ao ibuprofeno, verificamos que os resultados médios por nós obtidos,  $0,01578 \mu\text{g/L}$ , se encontram acima da média europeia ( $0,085 \mu\text{g/L}$ ).

O gráfico seguinte apresenta as percentagens de remoção do diclofenac, ibuprofeno e paracetamol nas diferentes ETARs, em análise.



**Gráfico 3.** Percentagem de remoção do diclofenac, ibuprofeno e paracetamol de 15 ETARs em Portugal

O paracetamol foi o medicamento que apresentou maior percentagem média de remoção, em quase todas as ETARs em estudo, de aproximadamente 99,7%. No entanto, nas ETARs 2, 5 e 7 foi possível determinar a presença deste composto a efluente, com teores que variaram entre 0,0395 e 0,5307  $\mu\text{g/L}$ .

No caso do ibuprofeno, também se verificou uma percentagem média de remoção elevada, cerca de 94,7%. De um modo geral, as ETARs conseguiram remover na totalidade este medicamento das águas residuais, com excepção das ETARs 3, 4, 7 e 8, que ainda apresentaram concentrações de ibuprofeno que oscilaram entre 0,3343 e 0,9954  $\mu\text{g/L}$ .

O diclofenac foi o composto farmacêutico que apresentou menor taxa de remoção de entre os restantes fármacos em estudo, observando-se uma percentagem média de remoção de 63%. Pela análise do gráfico 3, verifica-se que comportamento do diclofenac, durante o processo de tratamento nas ETARs varia significativamente. Algumas ETARs conseguiram remover na totalidade este medicamento, como é o caso da ETAR 3, 4, 6, 9, 11 e 15, no entanto, verificou-se dois casos excepcionais. Nas ETARs 5 e 13, observou-se uma concentração de diclofenac mais elevada à saída do que à entrada e por outro lado, na ETAR 10, foi apenas detectado a presença de diclofenac à saída com uma concentração de 0,0705  $\mu\text{g/L}$ . Estes casos particulares podem resultar da desconjugação do conjugado glucoronídeo do diclofenac, durante os processos de tratamento (Gracia-Lor *et al.*, 2012).



A ETAR 7, foi a única estação que não conseguiu eliminar na totalidade nenhum dos medicamentos em estudo, verificando-se a presença de diclofenac, paracetamol e ibuprofeno nos efluentes, com concentrações que variaram entre 0,073, 0,5307 e 0,6848  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Esta ETAR pode constituir um dos principais pontos de contaminação de água de superfície, através da descarga dos efluentes com concentrações consideráveis de compostos farmacêuticos para o ambiente hídrico. A ETAR 5, pode também, constituir uma zona crítica de descarga de efluentes por apresentar também, uma das mais baixas taxa de remoção, podendo contaminar águas de superfície e águas subterrâneas.

A descarga de efluentes contaminados com resíduos de compostos farmacêuticos para o ambiente podem apresentar um risco elevado, com efeitos de toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos, acumulação no ecossistema, além de constituir uma ameaça para a saúde pública. Como já foi referido anteriormente, a exposição a estes compostos pode interferir de forma significativa na fisiologia, metabolismo, comportamento e reprodução das diferentes espécies aquáticas.

Consequentemente, estes dados são importantes para melhor estudar os riscos dos efeitos ambientais do medicamento tendo como objectivo a protecção do ambiente e da saúde humana.

Ainda não há evidências suficientes que comprovem a existência de efeitos tóxicos para saúde do Homem. Um estudo realizado por Webb *et al.* 2003, no que diz respeito, ao consumo de água contaminada com resíduos de medicamentos, verificou que a ingestão diária de 2 litros de água, durante 70 anos (esperança média de vida), não atinge a dose mínima terapêutica diária, confirmando que os níveis de exposição são baixos e a probabilidade de risco é praticamente inexistente. Contudo, existe uma especial preocupação para grupos população de risco, como as crianças, as grávidas e os idosos, para as quais esta exposição deve ser tida em consideração.

A consciencialização da presença de fármacos no ambiente é muito importante para a implementação de medidas de precaução para a minimização da libertação destes compostos para o ambiente.



## 6. Conclusão

Este estudo permitiu a realização de um mapeamento, a nível nacional, da presença de diclofenac, de ibuprofeno e de paracetamol nos diferentes afluentes e efluentes de 15 ETARs, em Portugal.

Dos resultados obtidos, o paracetamol foi o fármaco que apresentou teores mais elevados nos afluentes, com uma concentração máxima de 48,878  $\mu\text{g/L}$ , seguindo-se o ibuprofeno e o diclofenac com concentrações de 5,944 e 0,2327  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Estes valores eram expectáveis, uma vez que, seguem o padrão dos dados de consumo, de acordo com INFARMED I.P. (2011). Nos efluentes, verificou-se a existência de uma grande variabilidade nas concentrações detectadas. O ibuprofeno foi o composto farmacêutico que apresentou uma concentração mais elevada, de aproximadamente de 0,995  $\mu\text{g/L}$ , seguindo-se o paracetamol com teores máximos de 0,530  $\mu\text{g/L}$  e o diclofenac com 0,0901  $\mu\text{g/L}$ . A remoção média, para os três compostos em estudo variaram entre 63 e 99,8%, verificando-se uma grande variabilidade.

Tendo em conta as elevadas concentrações detectadas nos efluentes das ETARs 5 e 7, podemos inferir que estas representam focos importantes de contaminação para o meio hídrico.

Os resultados obtidos são muito importantes para melhor avaliar os riscos dos efeitos ambientais dos medicamentos e para a implementação de medidas de minimização de libertação de fármacos, de forma, a proteger o ambiente e a saúde pública.

Futuramente, será necessária a realização de mais estudos de monitorização para continuar a dar cumprimento à nova Directiva 2013/39/UE. Será, também necessário, alargar estes estudos a outros grupos farmacoterapêuticos, avaliar o seu impacto nas bacias hidrográficas e avaliar a ecotoxicidade crónica, para os diferentes níveis tróficos.



## 7. Referências

ALDA, M. J. *et al.* - Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of chromatography. A.** . ISSN 0021-9673. 1000:1-2 (2003) 503–26.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V - Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **The Science of the total environment.** . ISSN 0048-9697. 333:1-3 (2004) 167–184. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.062.

BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. - Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. **Environmental Health Perspectives.** . ISSN 0091-6765. 113:12 (2005) 1705–1711. doi: 10.1289/ehp.8315.

BOXALL, A. B. A. - The environmental side effects of medication. **EMBO reports.** 5:12 (2004) 1110–1116. doi: 10.1038/sj.embor.7400307.

BRAMER, S. E. Van - **Introduction to Mass Spectrometry** [Em linha], atual. 1998. [Consult. 12 maio. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>.

BRANDHOF, E.-J. VAN DEN; MONTFORTS, M. - Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology and environmental safety.** . ISSN 1090-2414. 73:8 (2010) 1862–6. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.031.

CASTIGLIONI, S. *et al.* - Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. **Environmental science & technology.** . ISSN 0013-936X. 40:1 (2006) 357–363.

CHRISTEN, V. *et al.* - Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands).** . ISSN 1879-1514. 96:3 (2010) 167–81. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.11.021.

CLAESSENS, M. *et al.* - Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. **Marine pollution bulletin.** . ISSN 1879-3363. 71:1-2 (2013) 41–50. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.039.

CLARA, M. *et al.* - Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. **Water research.** . ISSN 0043-1354. 39:19 (2005) 4797–807. doi: 10.1016/j.watres.2005.09.015.

CLEUVERS, M. - Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters.** . ISSN 03784274. 142:3 (2003) 185–194. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00068-7.

CLEUVERS, M. - Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and environmental safety.** . ISSN 0147-6513. 59:3 (2004) 309–15. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00141-6.



CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. - Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **The Science of the total environment**. . ISSN 0048-9697. 367:1 (2006) 23–41. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.010.

CUKLEV, F. *et al.* - Diclofenac in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**. . ISSN 1552-8618. 30:9 (2011) 2126–34. doi: 10.1002/etc.599.

DAVID, A; PANCHARATNA, K. - Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of applied toxicology**. . ISSN 1099-1263. 29:7 (2009) 597–602. doi: 10.1002/jat.1446.

DIRETIVA 2013/39/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO DE 12 DE AGOSTO DE 2013 - **Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água** [Em linha], atual. 2013. [Consult. 9 abr. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN>.

FENT, K.; WESTON, A. A; CAMINADA, D. - Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**. . ISSN 0166-445X. 76:2 (2006) 122–159. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009.

FRAM, M. S.; BELITZ, K. - Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. **The Science of the total environment**. . ISSN 1879-1026. 409:18 (2011) 3409–17. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.05.053.

GRACIA-LOR, E. *et al.* - Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere**. . ISSN 1879-1298. 87:5 (2012) 453–62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.

GROS, M. *et al.* - Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment international**. . ISSN 1873-6750. 36:1 (2010) 15–26. doi: 10.1016/j.envint.2009.09.002.

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R. - Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. **Chemosphere**. . ISSN 0045-6535. 73:3 (2008) 353–9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.062.

HAN, G. H.; HUR, H. G.; KIM, S. D. - Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**. . ISSN 0730-7268. 25:1 (2006) 265–271.

HEBERER, T. - Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**. . ISSN 0378-4274. 131:1-2 (2002) 5–17.



HEBERER, T.; REDDERSEN, K.; MECHLINSKI, A. - From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research a journal of the International Association on Water Pollution Research**. . ISSN 0273-1223. 46:3 (2002) 81–8.

HENSCHER, K. P. *et al.* - Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**. . ISSN 0273-2300. 25:3 (1997) 220–5. doi: 10.1006/rtph.1997.1102.

HILTON, M. J.; THOMAS, K. V - Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 1015:1-2 (2003) 129–141. doi: 10.1016/S0021-9673(03)01213-5.

HO, C. S. *et al.* - Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**. . ISSN 0159-8090. 24:1 (2003) 3–12.

INFARMED I.P. - **Resumo das características do medicamento** [Em linha], atual. 2008. [Consult. 21 jan. 2014]. Disponível em WWW:URL:[http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=40758&tipo\\_documento=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=40758&tipo_documento=rcm).

INFARMED I.P. - **Estatística do medicamento 2011** [Em linha], atual. 2011. [Consult. 10 jan. 2014]. Disponível em WWW:URL:[http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO\\_DO\\_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTATISTICA\\_DO\\_MEDICAMENTO/EstMed-2011.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTATISTICA_DO_MEDICAMENTO/EstMed-2011.pdf).

INFARMED I.P. - **Resumo das características do medicamento** [Em linha], atual. 2013. [Consult. 20 jan. 2014]. Disponível em WWW:URL:[http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=56576&tipo\\_documento=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=56576&tipo_documento=rcm).

JONES, O. A; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. - Potential impact of pharmaceuticals on environmental health. **Bulletin of the World Health Organization**. . ISSN 0042-9686. 81:10 (2003) 768–9.

KIM, S. D. *et al.* - Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water research**. . ISSN 0043-1354. 41:5 (2007) 1013–21. doi: 10.1016/j.watres.2006.06.034.

KIM, Y. *et al.* - Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment international**. 33:1 (2007) 370–375. doi: 10.1016/j.envint.2006.11.017.

KÜMMERER, K. - **Pharmaceuticals in the Environment. Sources Fate, Effects and Risks**. 3. ed. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2008. ISBN 978-3-540-74663-8.



LI, B. *et al.* - Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta.** . ISSN 1873-4324. 645:1-2 (2009) 64–72. doi: 10.1016/j.aca.2009.04.042.

LIN, A. Y.-C.; YU, T.-H.; LATEEF, S. K. - Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. **Journal of hazardous materials.** . ISSN 1873-3336. 167:1-3 (2009) 1163–9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.01.108.

LOOS, R. *et al.* - EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. **Water research.** . ISSN 1879-2448. 47:17 (2013) 6475–87. doi: 10.1016/j.watres.2013.08.024.

LÓPEZ-ROLDÁN, R. *et al.* - Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. **Chemosphere.** . ISSN 1879-1298. 80:11 (2010) 1337–1344. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.042.

LÓPEZ-SERNA, R. *et al.* - Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Talanta.** . ISSN 1873-3573. 83:2 (2010) 410–424. doi: 10.1016/j.talanta.2010.09.046.

MASTROIANNI, N.; ALDA, M. L. De; BARCELÓ, D. - Emerging organic contaminants in aquatic environments: state-of-the-art and recent scientific contributions. **Contribution to science.** 6:2 (2010) 193–197. doi: 10.2436/20.7010.01.96.

MCPOLIN, B. Y. O. - **An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis** [Em linha], atual. 2009. [Consult. 16 abr. 2014]. Disponível em WWW:URL:[http://www.mournetrainingservices.co.uk/Preview\\_book\\_introduction\\_HPLC.pdf](http://www.mournetrainingservices.co.uk/Preview_book_introduction_HPLC.pdf).

MOMPELAT, S.; BOT, B. LE; THOMAS, O. - Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment international.** . ISSN 1873-6750. 35:5 (2009) 803–814. doi: 10.1016/j.envint.2008.10.008.

NALLANI, G. C. *et al.* - Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Chemosphere.** . ISSN 1879-1298. 84:10 (2011) 1371–7. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.008.

NUNES, B. *et al.* - Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. **Environmental science and pollution research international.** . ISSN 1614-7499. 2014) 1–11. doi: 10.1007/s11356-014-3059-5.

OAKS, J. L. *et al.* - Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature.** . ISSN 1476-4687. 427:6975 (2004) 630–3. doi: 10.1038/nature02317.





OKUDA, T. *et al.* - Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. **Environment international**. . ISSN 1873-6750. 35:5 (2009) 815–820. doi: 10.1016/j.envint.2009.01.006.

ORLANDO, R. M. *et al.* - **Pré-Tratamento de Amostras** [Em linha], atual. 2009. [Consult. 15 maio. 2014]. Disponível em WWW:URL:[http://fug.edu.br/revista\\_3/pdf/pretratamentoamostras.pdf](http://fug.edu.br/revista_3/pdf/pretratamentoamostras.pdf).

PAÍGA, P. *et al.* - Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal. **Environmental science and pollution research international**. . ISSN 1614-7499. 20:4 (2013) 2410–20. doi: 10.1007/s11356-012-1128-1.

PARK, J.; KIM, M. H.; CHOI, K. - Environmental risk assessment of pharmaceuticals: Model application for estimating pharmaceutical exposures in the Han River basin. **Korea Environment Institute**. 1:1 (2007) 127–181.

POUNDS, N. *et al.* - Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). **Ecotoxicology and environmental safety**. . ISSN 1090-2414. 70:1 (2008) 47–52. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.07.003.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. - An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Science of the Total Environment**. 9:1 (2007) 306–314. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.038.

RADJENOVIĆ, J.; PETROVIĆ, M.; BARCELÓ, D. - Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. **Water research**. . ISSN 0043-1354. 43:3 (2009) 831–41. doi: 10.1016/j.watres.2008.11.043.

REGINA, C. *et al.* - A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e Métodos de avaliação. **Química Nova**. 31:7 (2008) 1820–1830.

REGINA, W. *et al.* - Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**. 24:2 (2001) 172–175.

ROBERTS, P. H.; THOMAS, K. V - The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **The Science of the total environment**. . ISSN 0048-9697. 356:1-3 (2006) 143–153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.04.031.

SALGADO, R. *et al.* - Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research**. . ISSN 0273-1223. 62:12 (2010) 2862–71. doi: 10.2166/wst.2010.985.



SANTOS, J. L. *et al.* - Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). **Journal of hazardous materials**. . ISSN 1873-3336. 164:2-3 (2009) 1509–1516. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.073.

SANTOS, L. H. M. L. M. *et al.* - Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of hazardous materials**. . ISSN 1873-3336. 175:1-3 (2010) 45–95. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.

SANTOS, L. H. M. L. M.; GROS, M.; *et al.* - Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **The Science of the total environment**. . ISSN 1879-1026. 461-462:1 (2013a) 302–316. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.

SANTOS, L. H. M. L. M.; PAÍGA, P.; *et al.* - Development of a simple analytical method for the simultaneous determination of paracetamol, paracetamol-glucuronide and p-aminophenol in river water. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**. . ISSN 1873-376X. 930:1 (2013b) 75–81. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.032.

SARAVANAN, M. *et al.* - Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. **Journal of hazardous materials**. . ISSN 1873-3336. 195:2011) 188–94. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.029.

SCHWAIGER, J. *et al.* - Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**. . ISSN 0166-445X. 68:2 (2004) 141–50. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014.

SIM, W.-J. *et al.* - Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**. . ISSN 1879-1298. 82:2 (2011) 179–186. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.026.

SINGH, R. - HPLC method development and validation- an overview. **J Pharm Educ Res**. 4:1 (2013).

SIVAKUMAR, T.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. - Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of Domperidone and Pantoprazole in pharmaceutical dosage forms. **Acta Chromatographica**. 1:18 (2007) 130–142.

SOUSA, M. A *et al.* - Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**. . ISSN 1618-2650. 399:2 (2011) 807–822. doi: 10.1007/s00216-010-4297-0.

TERNES, T. A. - Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. **Water research**. 32:11 (1998).



TRIEBSKORN, R. *et al.* - Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**. . ISSN 0166-445X. 68:2 (2004) 151–66. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.015.

WEBB, S. *et al.* - Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 142:3 (2003) 157–167. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00071-7.

YIRUHAN *et al.* - Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. **Environmental Pollution**. . ISSN 1873-6424. 158:7 (2010) 2350–8. doi: 10.1016/j.envpol.2010.03.019.

ZOCOLO, G. J. - **Princípios e Aplicações da Cromatografia Apoio Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida** [Em linha], atual. 2012. [Consult. 12 maio. 2014]. Disponível em  
WWW:URL:[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc\\_araraquara\\_2012\\_site.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc_araraquara_2012_site.pdf).

# Anexos



## Anexo I

ETAR	Data da recolha da amostra	Fluxo (m <sup>3</sup> /dia)	Fluxo (L/dia/1000 hab)	Afluente				Efluente			
				pH	CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	TSS (mg L <sup>-1</sup> )	pH	CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	TSS (mg L <sup>-1</sup> )
1	23-07-2013	4728	112692	8,0	700	1275	644	7,3	36	94	22
2	23-07-2013	225	22500	7,8	1700	4230	3777	7,3	12	68	9
3	23-07-2013	5673	98237	8,2	–	–	–	8,0	–	–	–
4	23-07-2013	5151	113817	–	280	843	294	–	45	112	72
5	22-07-2013	14884	58241	7,5	480	896	512	7,1	9	30	10
6	11-07-2013	29690	98967	7,2	680	720	470	7,5	6	42	13
7	14-08-2013	18180	85352	–	370	510	200	7,5	50	110	42
8	23-07-2013	634	92555	7,4	306	729	360	7,4	16	74	26
9	22-07-2013	60000	85714	–	–	–	–	–	–	–	–
10	22-07-2013	50000	232558	–	–	–	–	–	–	–	–
11	23-07-2013	140000	185185	–	–	–	–	–	–	–	–
13	23-07-2013	6001	100017	–	389	510	231	7,6	7	52	16
14	23-07-2013	822	94483	–	848	1380	597	7,1	18	<3	<10
14	23-07-2013	12554	253376	–	–	900	–	–	–	39	–
15	19-07-2013	8146	264773	7,5	400	700	600	7,7	11	38	8

Tabela 14. Características das Estações de Tratamento de Águas Residuais