



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Micael Alexandre Pires Ferreira

**OCORRÊNCIA DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS
DE ÁGUAS DO ALGARVE**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pelo Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira
Pereira e coorientada pela Professora Doutora Liliana João Gatões
da Silva apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra**

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Micael Alexandre Pires Ferreira

OCORRÊNCIA DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DO ALGARVE

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada
pelo Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira e coorientada
pela Professora Doutora Liliana João Gatões da Silva apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Antes de passar à exposição do meu trabalho, gostaria de agradecer às pessoas que, de uma forma direta ou indireta, desempenharam um papel fundamental para o desenvolvimento e para a escrita do mesmo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às pessoas que possibilitaram a realização desta dissertação, aos meus orientadores, o Professor Doutor André Pereira e a Professora Doutora Liliana Silva, não só pelo desafio proposto, mas também por toda a disponibilidade, simpatia, apoio e ajuda prestada quer na componente laboratorial, quer na componente escrita. Gostaria, também, de agradecer à minha colega Bárbara por toda a ajuda e disponibilidade, sobretudo em laboratório. Agradeço, também, aos profissionais do INIAV por terem retirado um pouco do seu tempo para auxiliarem na realização deste trabalho.

De seguida, gostava de agradecer aos meus amigos. Ao Ramalhão, ao Manel, ao Tomé, ao Victor e ao Piochi por terem feito esta caminhada comigo desde o início e por todos os momentos e conversas ao longo destes anos. Às minhas amigas Carolina, Inês, Maria, Bárbara e Sara pelo encorajamento e por toda a amizade demonstrada ao longo desta caminhada. Aos meus amigos Rodrigo e Peixoto por toda a amizade, por todas as conversas e por me apoiarem mesmo quando não sabiam que o estavam a fazer.

Um obrigado à Universidade de Coimbra por me ter acolhido, por todos os ensinamentos e momentos vividos ao longo destes maravilhosos anos.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos meus pais e irmãos por acreditarem em mim, por me terem permitido chegar até aqui e por sempre apoiarem as minhas decisões e até mesmo as minhas indecisões. Sem vocês este trabalho era completamente impossível.

Obrigado a todos!

RESUMO

A água é essencial para a vida de todos os seres vivos e é o principal elemento que constitui o nosso organismo. Com o aumento da necessidade de água e da sua qualidade, surgiram os sistemas de esgotos municipais e as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). Estas necessitam de ter um forte controlo ao longo das diversas etapas de tratamento, desde o afluente bruto ao efluente tratado.

Os fármacos são amplamente consumidos em todo mundo. Estes são, atualmente, classificados como contaminantes emergentes no meio ambiente. Alguns estudos apontam para que as águas residuais sejam a principal via de contaminação de fármacos do meio hídrico. Ainda que sejam detetados em baixas quantidades, a sua presença é motivo de preocupação. Tendo em conta que foram criados para causar efeitos biológicos, podem originar toxicidade e, conseqüentemente, impacto ambiental.

A presença de fármacos no meio aquático deve-se, sobretudo, ao elevado consumo destes compostos por parte da população, resultando, assim, na entrada contínua de medicamentos no meio ambiente. Uma vez que as ETARs não removem a totalidade de fármacos, foi criada a Diretiva 2013/39/EU, que determina monitorizações obrigatórias dos princípios ativos incluídos na “*watch list*”, onde se incluem alguns antibióticos.

Deste modo, o presente trabalho pretende avaliar a ocorrência de fármacos em três tipos diferentes de amostras de águas da região do Algarve: amostras de águas residuais tratadas, águas da ribeira do Cadouço (jusante e montante) e águas subterrâneas. Os fármacos selecionados para este estudo foram o anti-inflamatório diclofenac e os antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim. O diclofenac foi o composto detetado em maiores concentrações, tendo sido encontrado na concentração máxima de 1196.61 ng/L na amostra S003 (água residual tratada). De uma forma geral, os antibióticos foram detetados em concentrações baixas e inferiores àquelas observadas em outros estudos, sendo que no caso das águas subterrâneas, apenas foi identificada a ocorrência do antibiótico trimetoprim.

Futuramente, poderão ser realizados novos estudos de forma a que seja possível não só verificar a ocorrência de fármacos, mas também os efeitos que estes causam na saúde das pessoas e dos animais, mesmo em baixas concentrações.

Palavras-chave: Fármacos, águas residuais tratadas, águas subterrâneas, ocorrência, meio aquático, diclofenac, azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim.

ABSTRACT

Water is essential to the life of all living beings and is the main element that constitutes our organism. With the increasing need for water and its quality, municipal sewage systems and Wastewater Treatment Plants (WWTPs) have emerged. These need to have a strong control throughout the various stages of treatment, from raw effluent to treated effluent.

Pharmaceuticals are widely consumed throughout the world. They are currently classified as emerging contaminants in the environment. Some studies indicate that wastewater is the main route of contamination of the water environment by pharmaceuticals. Even if they are detected in low quantities, their presence is a cause for concern. Since they are designed to cause biological effects, they can lead to toxicity and, consequently, environmental impact.

The presence of pharmaceuticals in the aquatic environment is mainly due to the high consumption of these compounds by the population, thus resulting in their continuous entry into the environment. Since WWTPs do not remove all pharmaceuticals, the Directive 2013/39/EU was created, which determines mandatory monitoring of the active ingredients included in the "watch list", which includes some antibiotics.

Thus, this study aims to assess the occurrence of pharmaceuticals in three different types of water samples from the Algarve region: samples of treated wastewater, water from the Cadouço stream (downstream and upstream) and groundwater. The pharmaceuticals selected for this study were the anti-inflammatory diclofenac and the antibiotics azithromycin, ciprofloxacin, ofloxacin, sulfamethoxazole, sulfapyridine and trimethoprim. Diclofenac was the compound detected in higher concentrations, having been found at the maximum concentration of 1196.61 ng/L in sample S003 (treated wastewater). In general, antibiotics were detected at low concentrations and lower than those observed in other studies, and in the case of groundwater, only the occurrence of the antibiotic trimethoprim was observed.

In the future, new studies may be conducted in order to verify not only the occurrence of pharmaceuticals, but also the effects they cause on the health of people and animals, even at low concentrations.

Keywords: Pharmaceuticals, treated wastewater, groundwater, occurrence, aquatic environment, diclofenac, azithromycin, ciprofloxacin, ofloxacin, sulfamethoxazole, sulfapyridine, and trimethoprim.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
PARTE I – REVISÃO TEÓRICA.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. LEGISLAÇÃO	5
3. ENTRADA DOS FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	7
4. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES.....	11
4.1. Diclofenac.....	12
5. ANTIBIÓTICOS	15
5.2. Propriedades físico-químicas dos antibióticos	18
6. CONSUMO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS E DE ANTIBIÓTICOS.....	20
7. OCORRÊNCIA DE FÁRMACOS NO MEIO AQUÁTICO	22
8. ECOTOXICIDADE.....	26
8.1. Anti-inflamatórios.....	27
8.2. Antibióticos	28
9. MÉTODOS ANALÍTICOS	31
9.1. Extração em fase sólida.....	33
9.2. Cromatografia líquida.....	34
9.3. Detecção por espectrometria de massa.....	36
PARTE II – COMPONENTE EXPERIMENTAL	37
1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
1.1. Amostragem	38
1.2. Materiais e reagentes	38
1.3. Procedimento Experimental	39
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
2.1. Performance analítica	42
2.2. Ocorrência de anti-inflamatórios e antibióticos.....	42
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Principais fontes e vias de ocorrência dos fármacos no ambiente aquático	8
Figura 2 – Estrutura molecular dos principais metabolitos do diclofenac: I - 4'-hidroxiclofenac; II - 5'-hidroxiclofenac; III - 3'-hidroxiclofenac; IV - 4',5'-dihidroxiclofenac; V - 4'-hidroxi-5-clorodiclofenaco	13
Figura 3 – Estrutura molecular do diclofenac	13
Figura 4 – Ocorrência de fármacos em todo o Mundo	23
Figura 5 – Principais passos do procedimento de extração em fase sólida: I - Acondicionamento; 2 – Passagem da amostra; 3 – Lavagem; 4 – Eluição	34
Figura 6 – Figura esquemática da composição geral de um sistema cromatográfico.....	35
Figura 7 – Figura esquemática dos componentes de um espectrómetro de massa.....	36
Figura 8 – Filtração da amostra com o filtro de 0,45 µm (esquerda) e com o filtro de 0,22 µm (direita).....	39
Figura 9 – Extração em fase sólida (SPE), utilizando colunas OASIS HLB.	40
Figura 10 – Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo (INIAV)	41
Figura 11 – Concentração dos fármacos estudados em 17 amostras de águas residuais tratadas, da região do Algarve.....	44
Figura 12 – Concentração dos fármacos estudados nas amostras de água recolhidas a jusante e a montante da ribeira do Cadouço, da região do Algarve.....	46
Figura 13 – Concentração dos fármacos estudados em 11 amostras de águas subterrâneas, da região do Algarve.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Principais propriedades físico-químicas do diclofenac	14
Tabela 2 – Principais classes de antibióticos e exemplos de cada classe.	16
Tabela 3 – Estruturas moleculares dos antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim	18
Tabela 4 – Principais propriedades físico-químicas dos antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim	19
Tabela 5 – Número de embalagens vendidas entre os anos de 2017 e 2021	20
Tabela 6 – Ocorrência de fármacos em todo o Mundo.....	24
Tabela 7 – Parâmetros usados para expressar a toxicidade crônica e aguda	27
Tabela 8 – Metodologias analíticas para a determinação de fármacos em diferentes tipos de águas e os respectivos MDL e MQL	32
Tabela 9 – Gradiente ao longo do tempo de análise.....	41
Tabela 10 – Valores do LOD, LOQ, repetibilidade e reprodutibilidade	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AIE – Anti-inflamatório esteroide

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

AMP – Ampicilina

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

AZI – Azitromicina

CIP – Ciprofloxacina

CLA – Claritromicina

CLX – Cefalexina

COX – Enzima cicloxigenase

CTT – Clortetraciclina

DCF – Diclofenac

DOX – Doxiciclina

EC₅₀ – Concentração efetiva a 50%

EI – Ionização eletrónica

EKC – Curva Ambiental de *Kuznets*

ERY – Eritromicina

ESI – Ionização por *electrospray*

ETA – Estação de tratamento de águas

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

EUA – Estados Unidos da América

FAB – *Fast Atom Bombardment*

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LC – Cromatografia líquida

LC₅₀ – Concentração letal a 50%

LLE – Extração em fase líquida

LOD – Limite de deteção

LOEC – Menor concentração com efeito observado

LOEL – Nível mais baixo com efeito observado

LOQ – Limite de quantificação

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

MDL – Limite de detecção do método

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MQL – Limite de quantificação do método

MS – Espectrometria de massa

NOEC – Concentração sem efeito observado

NOEL – Nível sem efeito observado

NOR – Norfloxacin

OFL – Ofloxacin

OMS – Organização Mundial da Saúde

PEN – Penicilina

PIB – Produto interno bruto

pKa – Constante de acidez

PNEC – Concentração previsível sem efeitos

Q – Quadropolo

SDZ – Sulfadiazina

SMX – Sulfametoxazol

SPE – Extração em fase sólida

SPY – Sulfapiridina

TCN – Tetraciclina

TMP – Trimetoprim

ToF – Tempo de voo

UE – União Europeia

UHPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

UV – Ultravioleta

PARTE I – REVISÃO TEÓRICA

I. INTRODUÇÃO

A água é uma substância fundamental na vida de todos os seres vivos e no nosso ecossistema. Precisamos dela para sobreviver e para as necessidades mais básicas, como para o seu consumo, para a higiene diária, para cozinhar, entre outros fins, ou seja, não é possível imaginar a nossa vida sem a água. Contudo, o abastecimento de água potável em países menos desenvolvidos e a sua qualidade em países desenvolvidos tem atingido valores alarmantes. A diminuição da qualidade das águas (tais como as águas residuais, agrícolas e industriais) tem várias causas associadas, tanto naturais como antropogénicas. No entanto, a ação dos seres humanos é uma das maiores explicações para este declínio, sobretudo devido à libertação para o meio ambiente de contaminantes orgânicos e inorgânicos, como é o caso de xenobióticos, microplásticos, metais pesados, compostos de carbono, fosfatos e nitratos, afetando, desta forma, a cadeia alimentar de todos os níveis tróficos.¹⁻³ Assim, devido à ação do Homem, cada vez mais poluentes têm aparecido no meio aquático.

Desta forma, surgem no meio ambiente os chamados “contaminantes/poluentes emergentes”. Estes têm suscitado cada vez mais apreensão entre a comunidade científica, sendo, por isso, alvo de diversos estudos científicos. Os poluentes emergentes não são necessariamente novos compostos químicos, mas sim substâncias que, normalmente, não são monitorizadas ou que não têm legislação aplicável quanto à sua ocorrência e à quantidade segura. No entanto, mesmo estando presentes em concentrações muito baixas, demonstram potencial para provocar efeitos adversos no meio ambiente e, conseqüentemente, nos seres vivos. Um dos principais poluentes emergentes são os fármacos, sendo alvo de uma maior preocupação, devido ao seu grande consumo por parte das populações, à sua eliminação imprópria, tanto por parte das pessoas como por parte das indústrias, à sua remoção incompleta pelas ETARs, e à sua baixa biodegradabilidade, que faz com que sejam persistentes e se acumulem no ambiente.⁴⁻⁶ Esta preocupação leva a que cada vez um maior número de análises e estudos sejam realizados com o objetivo de determinar, quantificar e monitorizar a ocorrência de fármacos no meio ambiente, nomeadamente, no meio aquático. Por este motivo, surgiu na União Europeia (UE) a Diretiva 2013/39/UE. Nesta, é pela primeira vez mencionado que a contaminação das águas e dos solos, provocada pelos resíduos farmacêuticos, constitui um novo e grave problema ambiental. Para além disso, esta Diretiva identifica as substâncias prioritárias, os programas para a sua monitorização e estabelece a lista de vigilância (“*Watch List*”), na qual inicialmente estava incluído o anti-inflamatório diclofenac e o antibiótico azitromicina, que requer que todos os Estados Membros recolham dados

revelantes para servir de base e auxiliar medidas de priorização no futuro de modo a minimizar a contaminação aquática.⁷⁻⁹

Os avanços científicos e a procura de uma melhor qualidade de vida levam a um consumo cada vez maior de fármacos. Estes são imprescindíveis para a saúde pública, pois auxiliam o tratamento de enfermidades e aumentam a esperança média de vida das populações. De acordo com a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), os medicamentos são produtos farmacêuticos com propriedades curativas ou preventivas de doenças e dos seus sintomas, tanto em seres humanos, como em animais, exercendo uma ação farmacológica, metabólica ou imunológica, de modo a restaurar, modificar ou reparar funções fisiológicas.¹⁰

Os fármacos, depois de consumidos e metabolizados pelo organismo, são excretados para o meio ambiente através da urina e das fezes, sob a forma inalterada ou sob a forma de metabolitos.¹¹ De facto, depois de serem excretados, são dirigidos para os esgotos para mais tarde chegarem e serem tratados nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). Contudo, as ETARs demonstram ter uma capacidade de remoção de resíduos farmacêuticos insuficiente, tal como ficou provado em diversos estudos, sendo que, desta forma, estes compostos e os seus metabolitos entram no meio aquático.^{9,12} Já desde a década de 70 que a ocorrência destes resíduos é conhecida, pois no ano de 1976 foi descoberta a existência de ácido clofíbrico, um herbicida, em águas residuais domésticas não tratadas e em efluentes de ETARs nos Estados Unidos da América (EUA).¹³ No ano seguinte, foi detetada a ocorrência de ácido salicílico em afluentes e efluentes de ETARs.¹⁴ Vários estudos demonstraram que as ETARs são a principal fonte de contaminação aquática, no entanto, esta não é a única forma de contaminar as águas. Aquacultura, transbordo de esgotos, lixiviação de campos agrícolas, eliminação incorreta de medicamentos fora da validade ou não utilizados e drenagem de águas residuais de explorações pecuárias para rios e lagos são outras vias de contaminação do meio aquático.^{8,15-17}

Esta limitação na remoção dos fármacos, aliada ao facto destes serem concebidos para atuarem de uma forma biologicamente ativa no corpo dos organismos, leva a que os resíduos se acumulem no meio aquático, facilitando a sua entrada na cadeia alimentar e afetando os organismos a eles expostos. Para além disso, os fármacos também podem ocorrer no ambiente aquático como misturas, quer com outros fármacos, quer com outras substâncias, podendo, desta forma, ocorrer efeitos sinérgicos ou aditivos, que levam a um aumento da toxicidade e do risco ambiental para os organismos expostos.¹⁸

Vários estudos revelaram que a exposição a longo prazo a fármacos pode provocar diversos efeitos adversos nos organismos. A grande maioria destes estudos foi realizada em afluentes e efluentes de ETARs e, em menor número, em águas de superfície, águas subterrâneas e águas para consumo humano. Outros estudos realizados nos vários tipos de água identificaram a ocorrência, sobretudo, de anti-inflamatórios e antibióticos.^{4,8,9,19,20}

Apesar dos estudos realizados, ainda são pouco conhecidos os efeitos que a contaminação provocada pelos fármacos têm nos seres humanos, existindo pouca evidência das consequências que estes poluentes podem causar. Por sua vez, há um maior conhecimento quanto aos efeitos que os fármacos têm no meio aquático. Muitos peixes revelaram atrasos no seu crescimento, problemas de reprodução, anomalias nas funções branquiais, cardíacas e renais. Existem, ainda, relatos de bactérias que se tornaram resistentes a determinados antibióticos, fenómeno que pode vir a afetar o modo como estes são usados nos seres humanos.^{6,19,21-23}

Assim, atendendo à crescente preocupação da contaminação aquática provocada por resíduos farmacêuticos, a presente dissertação tem como objetivo determinar a ocorrência de anti-inflamatórios (diclofenac) e de antibióticos (azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim) em águas da região do Algarve, nomeadamente águas residuais tratadas, águas superficiais e águas subterrâneas, durante o verão. Para isso, foram utilizadas técnicas analíticas, tais como, a extração em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo (LC-ToF-MS).

2. LEGISLAÇÃO

Face ao aumento da poluição do meio aquático, provocada sobretudo por fármacos, e à crescente preocupação em preservar as nossas águas, a Comissão Europeia aprovou a Diretiva 2000/60/CE. Esta, que também ficou conhecida por Diretiva Quadro da Água, estabelece um quadro geral para a proteção das águas, tanto das subterrâneas como de superfície, criando, para esse efeito, normas que garantam a diminuição progressiva da poluição dos recursos hídricos e que impeçam o seu aumento. Para isso, a estratégia do diploma baseia-se na identificação de substâncias prioritárias, ou seja, que apresentam um risco significativo para o meio aquático. Estas substâncias estão identificadas no Anexo X da presente Diretiva, ficando definido que a Comissão Europeia deveria fazer uma revisão desta lista, no mínimo, de quatro em quatro anos. Esta diretiva foi transposta para a legislação nacional através da Lei 58/2005 de 29 de dezembro de 2005 (Lei da Água).^{8,24}

Enquanto a Diretiva 2000/60/CE estabelece e identifica uma lista de substâncias prioritárias, a Diretiva 2001/83/CE de 6 de novembro de 2001, alterada pela Diretiva 2004/27/CE de 31 de março de 2004, exige que seja realizada uma avaliação dos potenciais riscos ambientais sempre que se queira obter uma nova autorização para introdução no mercado de qualquer medicamento. Esta Diretiva foi transposta para a legislação nacional através do Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de agosto de 2006 e acrescenta que é necessário apresentar evidências que fundamentem medidas de segurança ou preventivas relativamente ao armazenamento dos medicamentos e, também, à sua eliminação.^{25,26}

A Diretiva Quadro da Água, posteriormente alterada pela Diretiva 2008/105/CE de 16 de dezembro de 2008, propõe a criação de uma lista de vigilância. Nesta, seriam colocadas várias substâncias com potencial para causar risco no ambiente aquático e substâncias utilizadas e descarregadas para o meio aquático, que fossem raramente monitorizadas. Também define que esta primeira lista deveria conter um número máximo de dez substâncias, sendo que entre elas se encontrava o anti-inflamatório diclofenac e o antibiótico do grupo dos macrólidos azitromicina.²⁷ Esta lista de vigilância (“*Watch List*”) ficou estabelecida na Diretiva 2013/39/UE de 12 de agosto de 2013 e pela Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão. Esta Diretiva, que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE, também define a obrigação que todos os Estados Membros da UE têm em monitorizar estas substâncias, de modo a realizar uma boa análise de risco ambiental. Caso exista informação suficiente e de alta qualidade, que permita realizar uma boa avaliação do risco ambiental de determinada substância, esta deve ser retirada da lista de vigilância na próxima atualização. Esse facto foi

observado depois de, em 2017, a Comissão Europeia analisar os dados de monitorização das substâncias presentes na primeira lista de vigilância, concluindo que foi reunida informação suficiente sobre o diclofenac, pelo que este deveria ser retirado da referida lista, facto que ficou estabelecido na Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão. Nesta Decisão, os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina são identificados como candidatos adequados a integrarem a lista.^{7,19,28-31}

Mais recentemente, a Decisão de Execução (EU) 2020/1161 da Comissão estabelece que, em relação aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, os dados de monitorização recolhidos desde 2018 não foram suficientes e de alta qualidade, pelo que estes fármacos deviam prosseguir na lista de vigilância. Além disso, identificaram-se como candidatos adequados a integrar a lista os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim.³²

A lista de vigilância é dinâmica, sendo, assim, crucial continuar a identificar e a monitorizar os fármacos com potencial para causar risco no ambiente aquático, de modo que seja possível recolher dados que ajudem, futuramente, na implementação de medidas preventivas e de controlo de riscos associados a estes.^{18,29}

3. ENTRADA DOS FÁRMACOS NO AMBIENTE

Todos os dias inúmeras quantidades de substâncias orgânicas e inorgânicas são libertadas para os ecossistemas aquáticos, contaminando e poluindo o ambiente. Entre estas substâncias podem destacar-se os fármacos. Esta poluição do meio aquático, provocada por fármacos, agravou-se nos últimos anos, sobretudo face à ampliação da sua produção, ao grande consumo ao longo de vários anos por parte da população mundial e, também, ao seu incorreto descarte.^{16,33,34} Ainda assim, o destino e o comportamento dos fármacos no ambiente não é completamente conhecido, pelo que, ao longo dos últimos anos, têm sido realizados cada vez mais estudos relativamente à ocorrência de fármacos no meio aquático. Desta forma, os fármacos passaram a ser um dos tipos de contaminantes emergentes que geram maior alarme entre a comunidade científica, devido ao risco de poluição dos ecossistemas aquáticos que estes possuem. De facto, ainda que em quantidades residuais (na ordem de grandeza dos ng/L a µg/L), recentemente, vários tipos de fármacos têm sido detetados nas águas, nomeadamente águas residuais, efluentes tratados e lamas de ETARs, águas de superfície, águas subterrâneas, e, inclusive, em água para consumo humano.^{8,35-37}

Os fármacos, que podem ser de uso humano e/ou veterinário, depois de serem consumidos, são eliminados e entram no meio ambiente através de várias vias, tal como está representado na Figura 1. Após a sua administração, os resíduos farmacêuticos não são totalmente absorvidos pelo organismo, pelo que, em parte, são metabolizados e excretados pelas fezes e pela urina para os esgotos domésticos de uma forma contínua. Dependendo do tipo de fármaco, até 90% deste pode ser excretado na forma inalterada. Desta forma, os efluentes das ETARs (que compreendem os efluentes hospitalares e domésticos) são uma das principais fontes de contaminação e de entrada dos resíduos farmacêuticos nos ecossistemas aquáticos. No entanto, existem outras vias e fontes de contaminação como é o caso da aquacultura, da lixiviação de campos agrícolas e de aterros sanitários, da eliminação incorreta de medicamentos não utilizados ou expirados, lamas das ETARs (por vezes usadas como fertilizantes), dos efluentes de algumas indústrias e da drenagem de águas residuais de explorações pecuárias para rios e lagos.^{8,9,15-17,34,38}

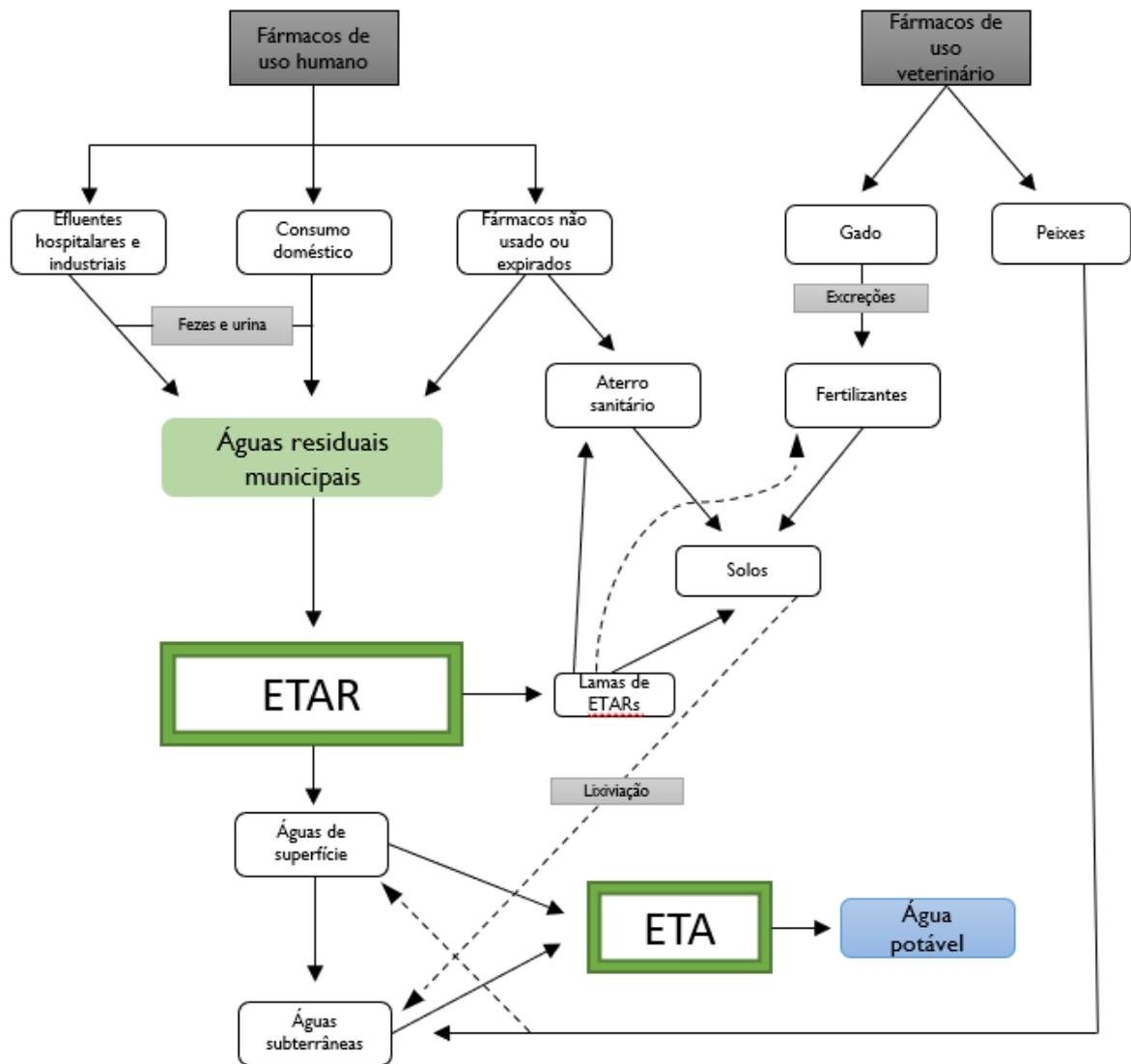


Figura 1 – Principais fontes e vias de ocorrência dos fármacos no ambiente aquático.³⁹

As ETARs são responsáveis pelo tratamento de águas residuais, ou seja, pela remoção, de vários compostos, sendo que para essa remoção ocorrer são realizados inúmeros processos biológicos, químicos e físicos. Alguns desses processos são o pré-tratamento, o tratamento primário, o tratamento secundário e o tratamento terciário.⁴⁰⁻⁴² Para além disso, a eficácia da remoção dos fármacos é afetada por outros fatores, como as propriedades físico-químicas dos fármacos, as condições climáticas (temperatura e intensidade da luz) e as condições operacionais utilizadas nas ETARs (como a temperatura de funcionamento, as condições redox, o tempo de retenção de sólidos e o tempo de retenção hidráulica).⁴³ No entanto, são diversas as evidências que nos levam a afirmar que as ETARs são a principal fonte de contaminação do meio aquático, pois os fármacos não são totalmente eliminados pelos processos que ocorrem nestas estações de tratamento. Além do mais, a parcial degradação

dos resíduos farmacêuticos e dos seus metabolitos, durante estes processos de tratamento, pode levar à formação de produtos de transformação.^{8,15,43,44}

Assim, a ocorrência de fármacos no meio aquático é verificada em todo o mundo há vários anos, não só em afluentes e efluentes de ETARs, mas também em águas superficiais (como rios e lagos), em águas subterrâneas e até mesmo em águas de consumo humano. Estes ocorrem mesmo em locais de baixa densidade populacional e em zonas onde não é esperado que ocorram. Um desses locais é a Antártida, em que a atividade humana, mesmo sendo baixa, é suficiente para que a ocorrência de fármacos seja verificada. Isto acontece não só pela falta de eficácia das ETARs, mas também devido às descargas diretas no mar.^{13,45}

Os efluentes hospitalares são uma outra grande fonte de contaminação do meio aquático provocada por fármacos, pois todos os dias são consumidos nos hospitais grandes quantidades de medicamentos e de água. Estes efluentes são, muitas vezes, descarregados nas redes públicas de esgotos sem qualquer tipo de tratamento prévio antes de chegar às ETARs, pelo que os resíduos farmacêuticos provenientes de instalações hospitalares vão ser detetados em águas de superfície. Apesar disso, poucos estudos têm sido conduzidos a respeito desta problemática, sendo que alguns desses estudos foram realizados em Espanha e em Portugal.^{4,22,23,46-48} Estudos realizados em Portugal suportam esta ideia de que os efluentes hospitalares são uma das principais fontes de contaminação ambiental provocada por fármacos e afirmam que são um dos principais contribuintes para a sua ocorrência em águas.⁴⁸ Por sua vez, um estudo realizado em Espanha afirma que os efluentes hospitalares são misturas complexas de substâncias, apresentando uma toxicidade 5 a 15 vezes superior aos efluentes urbanos. Desta forma, a entrada destas substâncias no ambiente aquático vai provocar efeitos tóxicos, sobretudo devido ao desenvolvimento e disseminação de microrganismos patogénicos multirresistentes a antibióticos.²³ Um outro estudo, também realizado em Espanha, chegou à conclusão de que os fármacos utilizados no tratamento de doenças oncológicas são uma das principais fontes de contaminação aquática.⁴⁷ Ainda assim, há artigos que afirmam que os hospitais são uma fonte de contaminação do meio aquático menos relevante, pelo que mais estudos nesta temática devem ser realizados.⁴⁹

Relativamente ao descarte de medicamentos não utilizados ou fora do prazo de validade, estes podem ser eliminados de duas formas, através do lixo doméstico, ou das canalizações. Na primeira forma, os fármacos vão chegar aos aterros sanitários, contaminando o meio aquático devido à lixiviação dos mesmos; já na segunda forma, os resíduos farmacêuticos vão chegar às ETARs, tal como acontece com os produtos de excreção, e uma vez mais os

processos de remoção destes vão ser insuficientes, contaminando, assim, os ecossistemas aquáticos.^{11,15,17}

Como referido, as lamas provenientes das ETARs são, muitas vezes, utilizadas como fertilizantes, tal como excreções de outros animais, levando à contaminação dos solos, que por sua vez, através da lixiviação, irá contaminar as águas, nomeadamente as subterrâneas e as superficiais.^{8,50} Por esse motivo, foram realizados diversos estudos, sendo que um deles foi efetuado em Portugal. Neste, os autores afirmam que foi detetada a ocorrência do antibiótico sulfametazina (uso veterinário), num rio, no entanto não foi detetado nem no afluente, nem no efluente da ETAR estudada. Assim, a causa indicada pelos autores para esta contaminação da água foi a produção animal e, conseqüentemente, o uso de estrume nos solos agrícolas, chegando e contaminando depois o rio devido à lixiviação.¹⁸

Para além de todos estes fatores, também é relevante referir que as fontes de contaminação são influenciadas por variações sazonais e por diferentes padrões geográficos de consumo de fármacos.⁸

4. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES

Desde os primórdios da sua existência, a humanidade procura encontrar formas de diminuir a dor, a inflamação e a febre. Assim, no ano de 1898, Felix Hofmann acabou por descobrir o ácido acetilsalicílico quando procurava encontrar uma cura para a artrite que atormentava o seu pai. Este ácido contém propriedades anti-inflamatórias.^{51,52}

Existem dois principais grupos de anti-inflamatórios, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroides (AIEs). Os AIEs foram os primeiros a serem utilizados em inflamações, tendo uma ação rápida e potente. Estes contêm hormonas esteroides, glicocorticoides ou corticosteroides. Por sua vez, os AINEs foram desenvolvidos para combater as limitações e os efeitos adversos que os AIEs provocam.^{53,54}

Os AINEs são uma classe de fármacos com várias finalidades terapêuticas, como a analgésica (ajuda a reduzir a dor), a anti-inflamatória (ajuda a modificar a reação inflamatória) e a antipirética (ajuda a controlar e reduzir as temperaturas elevadas). Nem sempre estes agentes terapêuticos se manifestam de igual forma e intensidade quanto às suas três finalidades descritas, no entanto, a grande maioria apresenta ação antipirética e analgésica, sendo a maior variação ao nível da ação anti-inflamatória.⁵⁴⁻⁵⁶

A versatilidade terapêutica, o facto de serem uma classe com fármacos não sujeitos a receita médica e a disponibilidade das mais diversas formas de medicamentos (parentérica e entérica) fazem com que estes compostos sejam dos mais consumidos em todo o mundo, sendo prescritos para dores musculoesqueléticas, febres, etc. e consumidos, muitas vezes, de forma abusiva. De facto, cerca de 70 milhões de AINEs são prescritos, anualmente, nos EUA, sendo que, se ainda considerarmos os medicamentos não sujeitos a receita médica, este valor sobe para os 30 mil milhões de medicamentos vendidos.^{54,57,58} Já em Portugal, segundo um relatório do INFARMED, o consumo de AINEs é de cerca de 6 587 590 de embalagens por ano.⁵⁹

O mecanismo de ação dos AINEs deve-se à sua capacidade de inibirem a enzima cicloxigenase (COX), responsável pela síntese de prostaglandinas. Por sua vez, estas possibilitam o normal funcionamento das células, uma vez que intervêm em importantes atividades fisiológicas do organismo.^{54,60,61} Esta enzima apresenta duas isoformas, que estão presentes em inúmeros tecidos, a cicloxigenase I (COX-1) (fisiologicamente constitutiva) tem a função de manutenção plaquetária e renal e, também, a de citoproteção da mucosa gástrica; por sua vez, a cicloxigenase 2 (COX-2) (fisiologicamente indutiva) regula diversas atividades inflamatórias. Desta forma, a classificação dos AINEs vai variar consoante a sua seletividade

para inibir cada isoforma.^{54,61-63} Alguns autores acreditam existir uma terceira isoforma, a cicloxigenase 3 (COX-3).⁶³

Os efeitos adversos mais frequentes associados ao consumo de AINEs são problemas no trato gastrointestinal, como é o caso de diarreias, vômitos, dispepsia, hemorragia da mucosa gástrica e náuseas, e reações ao nível cutâneo, como erupções, fotossensibilidade e urticária. Em alguns casos mais graves e de pessoas mais sensíveis podem, ainda, ocorrer reações renais. O consumo prolongado deste tipo de fármacos pode causar síndrome nefrótica.⁵⁴ Outros autores, defendem que podem, também, ocorrer sintomas ao nível do sistema nervoso central e redução da atividade plaquetária.⁵⁶

Os AINEs que apresentam um maior valor de consumo entre as populações são o naproxeno, o ibuprofeno e o diclofenac, pelo que estes são, também, dos contaminantes aquáticos mais amplamente detetados.⁶⁴⁻⁶⁶

4.1. Diclofenac

O diclofenac (DCF) é um AINE derivado do ácido fenilacético e que possui ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética.⁶⁷ Este é um fármaco amplamente consumido em todo mundo, sendo utilizado na medicina desde a década de 70, altura em que foi apresentado no mercado japonês, em 1974, com o nome comercial Voltaren®. Em 1988, este fármaco foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como o primeiro fármaco anti-inflamatório não esteroide, sendo que atualmente está presente em mais de 120 países em todo o mundo.^{41,68}

O DCF é um potente inibidor da enzima COX, apresentando uma forte seletividade pela COX-2, pelo que a síntese de prostaglandinas vai ser interrompida. Assim, este medicamento é usado para aliviar a dor, ligeira a moderada, diminuir a inflamação em doenças reumáticas, músculo-esqueléticas, ou outras e como antipirético. Pode ser administrado por via oral, retal e intramuscular.^{69,70}

Quanto à farmacocinética, o DCF liga-se à albumina plasmática (cerca de 99%) e acumula-se no líquido sinovial (líquido nas cavidades das articulações sinoviais).⁵⁶ Este sofre metabolismo hepático e é eliminado após ser biotransformado em metabolitos conjugados (produtos hidroxilados). Esses metabolitos estão representados na Figura 2, sendo que o principal é o 4-hidroxiciclofenac, que é metabolizado no fígado (metabolismo hepático) por

enzimas do citocromo P450 da subfamília CYP2C. Os metabolitos são excretados via urinária (65%) e via biliar (35%).^{56,69,70}

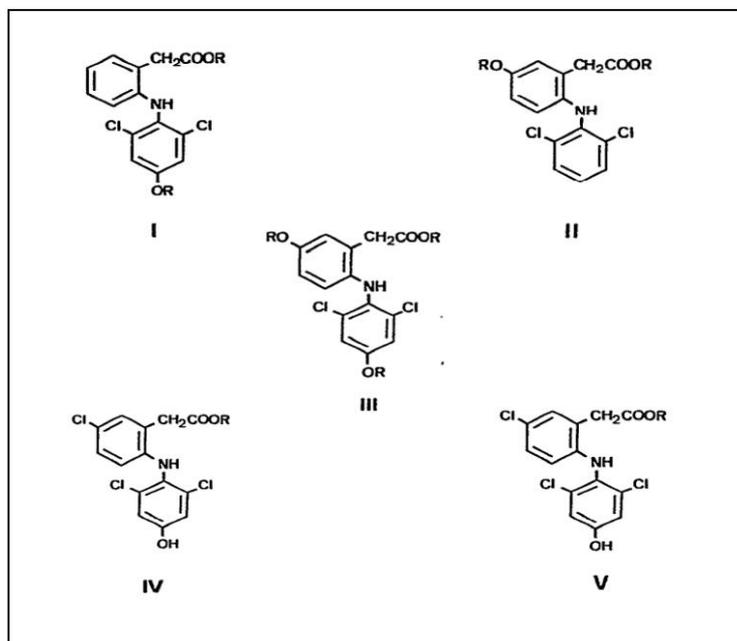


Figura 2 – Estrutura molecular dos principais metabolitos do diclofenac: I - 4'-hidroxiclofenac; II - 5'-hidroxiclofenac; III - 3'-hidroxiclofenac; IV - 4',5'-dihidroxiclofenac; V - 4'-hidroxi-5-clorodiclofenaco.^{71,72}

A estrutura molecular do DCF pode ser encontrada na Figura 3. Na Tabela I, estão caracterizadas as propriedades físico-químicas deste fármaco.

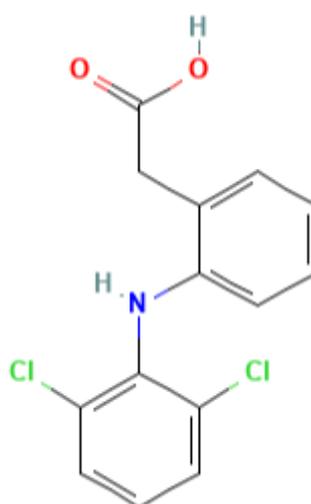


Figura 3 – Estrutura molecular do diclofenac.⁷³⁻⁷⁵

Uma das propriedades apresentadas na Tabela I é o coeficiente de partição octanol-água, Kow, que é um importante indicador da tendência que os compostos têm em se ligar à matéria orgânica, ajudando a descobrir qual o destino que estes têm no meio ambiente.⁷³ Desta forma, como o DCF tem um elevado potencial de bioacumulação, é facilmente absorvido pelos organismos aquáticos que estejam em águas contaminadas. É importante referir que a bioconcentração e a bioacumulação acontecem, geralmente, no interior dos organismos vivos.

Tabela I – Principais propriedades físico-químicas do diclofenac.⁷³⁻⁷⁵

Propriedade	Caraterização
Número CAS	15307-86-5
Fórmula Molecular	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Peso Molecular	296.1 g/mol
Log Kow	4.51
pKa	4.15
Solubilidade na água	2.37 mg/L (a 25 °C)

O DCF é encontrado em diversos tipos de águas, tanto subterrâneas, como residuais ou até de consumo humano. De facto, foram vários os estudos que demonstraram a ocorrência deste fármaco em águas em todo o mundo.^{76,77} Em Portugal e Espanha, também foi detetada a ocorrência deste fármaco no meio aquático.^{40,78}

Ainda que o DCF seja um dos medicamentos mais consumidos no mundo, este tem associados vários efeitos colaterais, sendo que o uso prolongado deste fármaco pode levar a complicações graves. Entre os principais efeitos colaterais estão os danos no trato gastrointestinal, nos sistemas hepático, cardiovasculares e renal.⁵⁵

5. ANTIBIÓTICOS

A primeira vez que a palavra antibiótico foi utilizada foi em 1941 pelo bioquímico Selman Waksman. Este definiu antibiótico como qualquer pequena molécula criada a partir de um microrganismo, que inibe ou suprime o crescimento de outros microrganismos.^{79,80} Ainda assim, a descoberta dos antibióticos é da autoria do cientista Alexander Fleming, devido a um acaso, no ano de 1928. Fleming, ao regressar das suas férias, observou que umas culturas de *Staphylococcus aureus*, que tinha estado a estudar, estavam contaminadas por uma colónia de fungos e que, nos locais onde esse fungo estava presente, a bactéria parecia não crescer. Mais tarde, depois de muitos estudos, decidiu intitular o princípio ativo deste fungo de penicilina. Esta descoberta, auxiliada pelo também cientista Paul Ehrlich, é vista como um dos maiores feitos da medicina do século XX, uma vez que o seu uso tanto em medicina humana, como em medicina veterinária, permitiu reduzir drasticamente a taxa de mortalidade das populações, sendo uma “arma” poderosa contra várias doenças infecciosas como a sífilis, a tuberculose, a gonorreia, entre outras.^{81,82}

Atualmente, os antibióticos são vistos pela comunidade científica como compostos naturais (por exemplo, penicilina e tetraciclina), sintéticos (por exemplo, sulfonamidas e quinolonas) ou semissintéticos (por exemplo, amoxicilina e claritromicina), sendo que todos eles têm a função de combater agentes bacterianos. Assim, a nível terapêutico, alguns têm atividade bacteriostática e outros têm atividade bactericida. Os antibióticos bacteriostáticos são aqueles que bloqueiam o crescimento bacteriano, como é o caso da clindamicina e do cloranfenicol, que atuam inibindo a síntese proteica, o que irá ajudar a eliminar mais facilmente o agente infeccioso do organismo. Já os bactericidas são aqueles que causam danos irreparáveis ou que levam à morte dos microrganismos, como é o caso das penicilinas, que inibem a síntese da parede celular, provocando a lise e, conseqüente, morte celular das bactérias, ou das quinolonas que afetam o metabolismo do ADN (inibe a síntese de ácido nucleico), levando à sua fragmentação.⁸³⁻⁸⁵

Com a crescente procura de melhorar as condições de saúde e de vida das populações, os antibióticos tornaram-se umas das classes de fármacos mais consumidas em Portugal e no mundo, não só na medicina humana, mas também na medicina veterinária.⁸⁶ Não obstante, o uso crescente deste tipo de medicamentos trouxe um novo problema e uma nova preocupação para a comunidade científica, a resistência que certas bactérias adquiriram relativamente à ação dos antibióticos. Desta forma, observa-se que determinados antibióticos, que no passado eram altamente eficazes contra o agente infeccioso, hoje já não o são, devido

à resistência que os microrganismos foram adquirindo ao longo dos anos, face ao elevado consumo destes fármacos. Um dos principais motivos para o aumento desta resistência antimicrobiana foi a entrada e a disseminação dos fármacos, nomeadamente, os antibióticos, no meio ambiente, sendo, por isso, relevante realizar estudos sobre a ocorrência de fármacos no ambiente (sobretudo no meio aquático) e formas de os remover eficazmente dos ecossistemas.^{79-82,85,87} Os antibióticos podem ser agrupados tanto pela sua estrutura química, como pelo seu mecanismo de ação. Assim, existem várias classes de antibióticos, sendo que as principais são as tetraciclina, os beta-lactâmicos, as sulfonamidas, as quinolonas, os macrólidos e o trimetoprim. Na Tabela 2, estão representadas as principais classes de antibióticos.^{80,81,86,88-90}

Tabela 2 – Principais classes de antibióticos e exemplos de cada classe.

Classe	Antibióticos (abreviatura)
Beta-lactâmicos	Ampicilina (AMP) Cefalexina (CLX) Penicilina (PEN)
Macrólidos	Azitromicina (AZM) Claritromicina (CLA) Eritromicina (ERY)
Quinolonas	Ciprofloxacina (CIP) Norfloxacina (NOR) Ofloxacina (OFL)
Sulfonamidas	Sulfadiazina (SDZ) Sulfametoxazol (SMX) Sulfapiridina (SPY)
Tetraciclina	Clortetraciclina (CTT) Doxiciclina (DOX) Tetraciclina (TCN)
Trimetoprim	Trimetoprim (TMP)

Neste trabalho, os antibióticos estudados foram a azitromicina, a ciprofloxacina, a ofloxacina, o sulfametoxazol, a sulfapiridina e o trimetoprim.

Depois dos antibióticos serem administrados, dependendo das propriedades químicas do composto, 5 a 90% da dose pode ser excretada sob a forma de composto inalterado ou

de metabolitos. Desta forma, vão entrar grandes quantidades deste tipo de fármacos no meio aquático, sobretudo através das ETARs.⁸⁷ No caso dos antibióticos estudados, a azitromicina tem uma taxa de excreção de 12%, sendo a excreção biliar uma das principais vias de eliminação deste composto.^{73,75,91} A ciprofloxacina, que é parcialmente metabolizada no fígado, pela modificação do grupo piperazinil para pelo menos 4 metabolitos (desetilenociprofloxacina, a sulfociprofloxacina, a oxociproloxacina e a formilciprofloxacina), tem uma taxa de excreção de cerca de 70%.^{73,75,91} A ofloxacina é principalmente eliminada pelo rim, sendo que 65 a 80% da dose administrada deste fármaco é excretada na sua forma inalterada através da urina e, para além disso, 4 a 8% é eliminada pelas fezes, podendo, ainda, haver excreção biliar.^{73,75} O metabolismo do sulfametoxazol ocorre predominantemente por N4-acetilação, sendo, também, identificado o conjugado glucuronido. Cerca de 20% deste fármaco aparece na urina na forma inalterada, 50 a 70% na forma de derivado acetilado e 15 a 20% como conjugado glucuronido.^{73,75} Por sua vez, 15% da sulfapiridina é excretada na sua forma não alterada na urina.⁹² No caso do antibiótico trimetoprim, cerca de 80% é excretado na sua forma inalterada na urina.^{73,75}

5.2. Propriedades físico-químicas dos antibióticos

Na Tabela 3, estão representadas as estruturas moleculares de cada um dos antibióticos selecionados. A Tabela 4 reúne as principais características físico-químicas dos antibióticos estudados neste trabalho.

Tabela 3 – Estruturas moleculares dos antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim.⁷³⁻⁷⁵

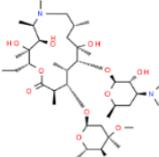
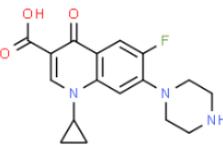
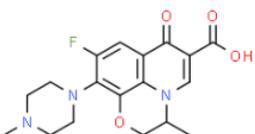
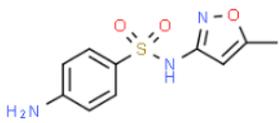
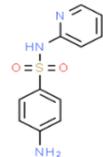
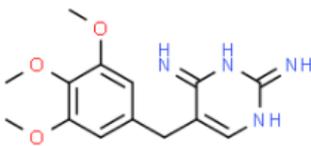
Antibióticos	Estrutura molecular
AZM	
CIP	
OFL	
SMX	
SPY	
TMP	

Tabela 4 – Principais propriedades físico-químicas dos antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim.⁷³⁻⁷⁵

Antibiótico	Número CAS	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	log Kow	pKa	Solubilidade
AZM	83905-01-5	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	749.0	4.02	8.74	2.37 mg/L (a 25°C)
CIP	85721-33-1	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	331.34	0.28	6.09	1350 mg/L
OFL	82419-36-1	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361.4	-0.39	5.97 - 9.28	28300 mg/L
SMX	723-46-6	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.28	0.89	1.6 - 5.7	610 mg/L (a 37°C)
SPY	144-83-2	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249.29	0,35	8.43	268 mg/L (a 25°C)
TMP	738-70-5	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290.32	0.91	7.12	400 mg/L (a 25°C)

6. CONSUMO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS E DE ANTIBIÓTICOS

A presença de fármacos no meio ambiente parece ter uma boa correlação com a quantidade que é consumida pelos seres humanos, o que permite identificar os compostos que possam representar risco para os ecossistemas aquáticos.⁹³ No entanto, a aquisição destes dados pode ser complexa e pouco confiável, pois não só existe falta de informação quanto ao consumo de fármacos, como também, muitas vezes, as estatísticas realizadas não incluem medicamentos hospitalares ou medicamentos não sujeitos a receitas médicas (MNSRM).⁹⁴ Não obstante, é esperado que o consumo de fármacos aumente, o que irá levar a uma maior ocorrência de fármacos no ambiente. Existem múltiplos motivos para este facto, no entanto, o aumento dos padrões de vida das populações, do número de pessoas idosas e, consequentemente, da quantidade de fármacos consumidos por esta faixa etária, parecem ser as principais causas para o aumento da utilização de medicamentos em todo o mundo.⁴⁹ De facto, na EU existem cerca 3000 diferentes substâncias, o que ajuda a corroborar e a compreender o porquê do aumento do consumo de medicamentos.⁴¹

Em Portugal, o INFARMED publica anualmente estatísticas sobre as quantidades de fármacos e substâncias ativas vendidas em todo o país. Relativamente ao número de embalagens de fármacos, a Tabela 5 ajuda a perceber a evolução do número de embalagens vendidas entre os anos de 2017 e 2021, tanto de MNSRM, como os restantes medicamentos de ambulatório.⁹⁵⁻⁹⁹

Tabela 5 – Número de embalagens vendidas entre os anos de 2017 e 2021.

Fármaco/Ano	2017	2018	2019	2020	2021
MNSRM	40 941 780	42 586 132	43 293 957	39 857 969	38 425 560
Ambulatório	248 197 781	252 399 564	260 461 141	254 898 737	258 446 005

Ao analisar os dados da Tabela 5 verifica-se que número total de embalagens vendidas tem vindo a aumentar ao longo dos anos, à exceção de 2020, onde houve um pequeno decréscimo.

No relatório mais recente disponível, as primeiras seis posições dos grupos farmacoterapêuticos mais consumidos em Portugal são, por ordem decrescente, o aparelho cardiovascular, sistema nervoso central, aparelho digestivo, hormonas e medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas, aparelho locomotor e medicamentos anti-infecciosos,

sendo que nestes dois últimos grupos estão incluídos os AINEs e os antibióticos, respetivamente.¹⁰⁰

O relatório do INFARMED de 2014 é o mais recente que nos permite analisar com maior detalhe os grupos terapêuticos e os fármacos em estudo. Neste, verifica-se que naquele ano foram consumidas 6 587 590 embalagens de AINEs e 7 630 329 de antibacterianos. Para além disso, este relatório disponibilizou um ranking das 100 substâncias ativas com o maior número de embalagens vendidas, estando presentes vários dos fármacos em estudo, como é o caso do diclofenac (27º posição e 1 054 952 de embalagens consumidas), da azitromicina (30º posição e 1 043 921 de embalagens consumidas) e da ciprofloxacina (79º posição e 515 926 consumidas). Neste ranking estavam, ainda, presentes muitas outras substâncias detetadas nos vários tipos de águas.⁵⁹

Assim, através dos dados aqui apresentados, é possível afirmar que existe um elevado consumo de fármacos em Portugal e que este tem vindo a aumentar ao longo dos anos.

7. OCORRÊNCIA DE FÁRMACOS NO MEIO AQUÁTICO

A ocorrência de resíduos farmacêuticos no meio aquático foi observada, pela primeira vez, na década de 70 e, face aos avanços e inovações dos instrumentos e das técnicas analíticas, desde essa altura que têm sido detetadas quantidades vestigiais de vários fármacos.^{13,14,101} Na literatura, é muitas vezes referida e discutida a hipótese da Curva Ambiental de *Kuznets* (EKC). Esta diz que, por norma, a ocorrência de fármacos e dos seus metabolitos no ambiente aquático está associada ao produto interno bruto (PIB) *per capita* de cada país, sendo apresentada na forma de U invertido, isto é, quando a economia de um determinado país cresce, a poluição por fármacos também irá crescer, pois vai haver um aumento do consumo de medicamentos. No entanto, quando o país atinge o maior ponto de crescimento económico, a poluição começa a melhorar, uma vez que a qualidade e quantidade de ETARs vai ser muito maior e a população vai ter maiores índices de educação ambiental.¹⁰²

A concentração dos resíduos farmacêuticos no meio aquático é, também, fortemente influenciada por outros fatores, como é o caso da variação sazonal e da variação geográfica.²⁹ Ainda assim, a ocorrência de fármacos no meio aquático tem uma expressão global, acontecendo em todas as partes do Globo. Todos os continentes do planeta têm registos de ocorrência e deteção de fármacos no ambiente aquático, tal como está representado na Figura 4. Mesmo a Antártida, um continente onde a ocorrência pode parecer altamente improvável, uma vez que a ação humana neste continente é reduzida, apresenta deteções destes compostos. Os medicamentos cardiovasculares, analgésicos e antibióticos são o tipo de fármacos mais comuns e populares na Europa e na América do Norte. A ocorrência é maior e mais evidente em países desenvolvidos, pois têm melhores recursos e tratamentos médicos, tratamentos agrícolas mais avançados e modernos e, também, mais pesquisas sobre fármacos. No entanto, países menos desenvolvidos como os do continente africano e da América do Sul, também têm grande concentrações de fármacos nos recursos hídricos. No continente asiático, os fármacos que apresentam maiores concentrações no meio aquático são os antibióticos, como é o caso da ciprofloxacina, da ofloxacina e da eritromicina.^{45,91,103-106}

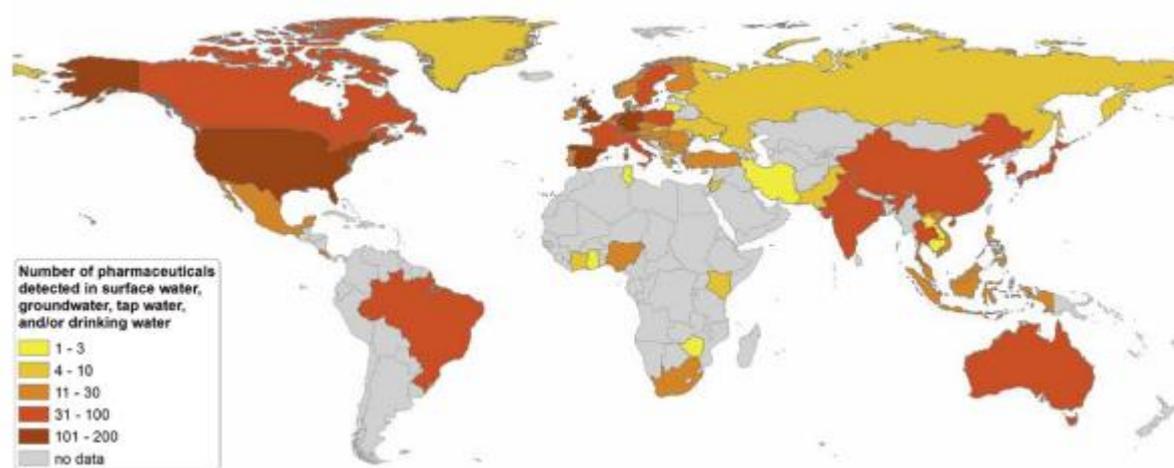


Figura 4 – Ocorrência de fármacos em todo o Mundo.¹⁰⁴

Atualmente, os medicamentos são utilizados globalmente para tratar e prevenir doenças, tanto em seres humanos, como em animais. A nível mundial, os anti-inflamatórios (diclofenac, paracetamol, entre outros) foram os compostos mais frequentemente detetados, representando 31% dos registos, tendo uma concentração mediana de 230 ng/L. Por sua vez, o segundo lugar é ocupado pelo grupo dos antibióticos (azitromicina, ofloxacina, trimetoprim, entre outros), com uma frequência de deteção de cerca de 21%, mas com uma concentração mediana mais elevada, de 8128 ng/L.¹⁰⁷

Assim, cada vez mais estudos têm sido realizados com o intuito de observar a ocorrência de resíduos farmacêuticos no meio aquático. Num desses estudos, realizado em Portugal, foi estabelecida uma associação entre o número de embalagens vendidas e a taxa de excreção de certos fármacos (as concentrações foram medidas em afluentes e efluentes de ETARs) e chegou-se à conclusão de que os AINEs eram, não só aqueles que apresentaram o maior número de embalagens vendidas, mas também a classe de fármacos mais detetada nos efluentes das ETARs estudadas, tendo uma taxa de excreção entre 5-39%.⁸ Vários outros estudos corroboram estes resultados, indicando os anti-inflamatórios como uma das classes de medicamentos mais detetada em águas, sendo o diclofenac uma dos exemplos mais citados.^{9,12}

Outro estudo realizado em águas potáveis (da torneira) na Polónia relatou que de entre 26 compostos analisados, 20 estavam presentes, sendo que os antibióticos foram o grupo com maior representatividade, nomeadamente os antibióticos azitromicina, eritromicina e claritromicina.¹⁹

Na Índia, a ciprofloxacina foi o fármaco detetado em maiores concentrações em águas superficiais.¹⁰⁸ Por sua vez, num estudo realizado na China, verificou-se que os antibióticos da

classe das quinolonas (uma vez mais, a ciprofloxacina) e das tetraciclinas são os mais detetados em águas subterrâneas.¹⁰⁹ Esta informação é comprovada por outros estudos, que afirmam, ainda, que as sulfonamidas são, também, uma das classes de antibióticos mais detetadas em águas subterrâneas.^{110,111}

Na Tabela 6, estão representadas as concentrações dos fármacos em estudo (diclofenac, azitromicina, trimetoprim, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina) no meio aquático de localizações em todo o mundo.

Tabela 6 – Ocorrência de fármacos em todo o Mundo.

Fármacos	Tipos de água	Localização	Concentração (ng/L)	Referências
DCL	Água de superfície	Portugal	25.13 - 51.24	31
	Efluente de ETAR	Coreia do Sul	8.8 - 127	112
	Água Subterrânea	Espanha	15 - 55	113
AZM	Água de superfície	Portugal	221 - 2819	114
	Efluente de ETAR	Portugal	93.7 - 297	115
	Água subterrânea	China	0.2 - 0.7	113
CIP	Água de superfície	França	6.6	116
	Efluente de ETAR	Portugal	127 - 1396	115
	Água subterrânea	Índia	44 - 14000	117

Tabela 6 – Ocorrência de fármacos em todo o Mundo. (continuação)

Fármacos	Tipos de água	Localização	Concentração (ng/L)	Referências
OFL	Água de superfície	França	6.9	116
	Efluente de ETAR	Portugal	110-366	115
	Água subterrânea	Espanha	10.2 - 367	113
SMX	Água de superfície	França	11.7	116
	Efluente de ETAR	Portugal	340 - 679	115
	Água subterrânea	China	28.7 - 124.5	113
SPY	Água de superfície	Itália	<12 - 121	64
	Efluente de ETAR	Canadá	81	118
	Água subterrânea	Espanha	0,07 – 72.45	119
TMP	Água de superfície	França	22.7	116
	Efluente de ETAR	Portugal	66.6 - 299	115
	Água subterrânea	EUA	≤ 0.7	113

Ainda que as concentrações detetadas sejam muito baixas, os resíduos farmacêuticos não deveriam ser libertados na água, pois não há conhecimento suficiente sobre todos os efeitos adversos que estes podem ter, quando presentes no meio ambiente. Desta forma, é necessário rever as práticas governamentais de eliminação de fármacos, sendo igualmente importante aumentar a consciencialização social sobre esta temática.

8. ECOTOXICIDADE

De um modo geral, os fármacos são desenvolvidos e programados para atuarem num determinado alvo específico de seres humanos ou de animais, pelo que podem provocar efeitos adversos e prejudiciais quando atuam em organismos que não os específicos, mesmo em baixas concentrações. Um outro sério problema para os organismos vivos são os efeitos sinérgicos de biopotenciação da toxicidade, que podem acontecer quando as substâncias dos produtos farmacêuticos são misturadas.^{120,121} Para além disto, a biomagnificação (acumulação progressiva de substâncias e aumento da sua concentração ao longo da cadeia alimentar) e a bioacumulação (capacidade da substância se concentrar nos organismos vivos) também podem ocorrer e possibilitar um aumento da toxicidade para os organismos. Desta forma, a contaminação do meio aquático pode originar toxicidade em organismos aquáticos, que mais tarde podem ter efeitos nocivos em espécies terrestres e até no Homem.^{122,123}

Os riscos ecotoxicológicos associados à ocorrência de fármacos no meio aquático estão muito longe de ser conhecidos.¹²⁴ Assim, devido à contaminação aquática provocada pelos fármacos e pelos seus metabolitos, torna-se necessário fazer uma avaliação do impacto toxicológico que estes têm nas pessoas, nos animais e no ambiente. Logo, para que os estudos realizados sobre a toxicidade dos fármacos sejam o mais real possível, estes são realizados em organismos aquáticos, pois estão constantemente expostos a estes contaminantes e acredita-se que o modo de ação é semelhante ao que ocorre nos seres humanos.^{120,125,126} Contudo, e como já foi referido, estes estudos têm de ter em conta que, atualmente, os organismos do meio aquático se encontram sujeitos a diversos fatores, como pesticidas, biocidas e muitos outros produtos químicos industriais, podendo estes ter um efeito sinérgico ou antagonista relativamente aos produtos farmacêuticos. Todos estes fatores apresentados podem ter uma forte interferência no metabolismo, na reprodução, na fisiologia e no comportamento dos organismos vivos do meio aquático.^{127,128}

Os estudos ecotoxicológicos que têm sido realizados servem para avaliar quais os efeitos da exposição dos organismos a xenobióticos, sendo que estes podem ser estudos sobre a toxicidade aguda ou sobre a toxicidade crónica. Os estudos de toxicidade aguda consistem em testes curtos, que permitem avaliar os principais efeitos e a mortalidade dos organismos devido a uma exposição, num curto espaço de tempo. Por sua vez, os estudos de toxicidade crónica são testes prolongados, que possibilitam realizar uma avaliação dos prováveis efeitos tóxicos das substâncias face a uma exposição repetida ou contínua e que abrangem variáveis a médio e longo prazo (como a reprodução, o comportamento e o crescimento), permitindo

calcular uma estimativa do risco ambiental de um determinado xenobiótico.¹²⁹⁻¹³² A Tabela 7 reúne os principais parâmetros para expressar a toxicidade aguda e a toxicidade crônica.

Tabela 7 – Parâmetros usados para expressar a toxicidade crônica e aguda.¹²⁹⁻¹³²

Parâmetros	Toxicidade	
	Aguda	Crônica
LC50	x	
EC50	x	
NOEL		x
NOEC		x
LOEL		x
LOEC		x

8.1. Anti-inflamatórios

Relativamente aos anti-inflamatórios, apesar destes serem detetados em baixas concentrações no ambiente (na ordem dos ng/L a µg/L), a sua atividade biológica faz com que estes possam apresentar toxicidade para os organismos vivos.¹³³

Uma vez que a maior parte dos anti-inflamatórios provoca, de forma não específica, a inibição das prostaglandinas, as funções fisiológicas controladas por estas podem sofrer diversos efeitos adversos, como, por exemplo, a nível gástrico, renal, hepático e cardiovascular. Uma vez que são vários os organismos (tanto vertebrados como invertebrados) que produzem prostaglandinas, torna-se possível obter boas correlações da toxicidade observada nestes com a observada noutros organismos vivos, como o ser humano.^{41,55,134,135} Um bom exemplo é o caso dos peixes, onde as prostaglandinas têm influência nos mecanismos de reprodução, podendo, desta forma, atuar como desreguladores endócrinos, possibilitando a ocorrência de efeitos adversos, visto que podem antagonizar ou até mimetizar os efeitos hormonais, modificar os níveis dos seus recetores ou, ainda, alterar o seu modelo de síntese e metabolismo.^{41,136}

Vários estudos revelaram que o AINE que apresenta maior toxicidade no meio aquático é o diclofenac.^{41,66,130} Segundo um desses estudos, as concentrações que provocaram efeitos variaram entre 1 µg/L e 80 mg/L, isto dependendo das espécies, da duração da exposição e do parâmetro utilizado.¹³⁷

Em ensaios de toxicidade aguda, realizados em *Daphnia magna* (pequenos crustáceos), os valores de EC₅₀ variaram entre 22-80 mg/L. A *Daphnia magna* é muito utilizada em estudos de toxicidade, uma vez que são considerados intermediários entre o consumidor primário e níveis tróficos superiores. Por sua vez, em ensaios de toxicidade crônica para o diclofenac, foram detetados valores de LOEC acima dos 2000 µg/L.¹³⁷ Através destes estudos e observações, foi calculada uma concentração previsível sem efeitos (PNEC) de 116µg/L para o diclofenac, que é cerca de mil vezes superior daquela que é, por norma, quantificada no meio ambiente.^{137,138} Estes estudos revelaram, também, que o diclofenac apresenta toxicidade para diversos organismos vivos aquáticos, provocando vários efeitos adversos, como o aumento da peroxidação lipídica e da atividade mitocondrial, alteração da capacidade de osmorregulação, danos em ovos e embriões de peixes e efeitos crônicos no DNA de fetos. Foi, ainda, registada uma bioacumulação de diclofenac em mexilhões e peixes, sendo que a concentração era superior nestes do que na água. Foi observado que, no caso do peixe truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), um LOEC de 1µg/L está na origem de problemas hepáticos (como alterações na ultraestrutura hepática e no glicogénio hepático). Outro exemplo, agora no meio terrestre, de um alvo do diclofenac são os abutres, nomeadamente os seus rins. Estes, ao se alimentarem de carcaças contaminadas com diclofenac, ficam expostos a doenças renais que podem ser fatais (insuficiência renal aguda). No Paquistão, a população de abutres-de-rabadilha-branca teve uma queda de 95% devido à contaminação de carcassas com diclofenac.^{137,139} Para além destes efeitos colaterais, foi, também, constatado que nas águas residuais o diclofenac promove uma rápida fototransformação, formando vários produtos de transformação, que podem apresentar riscos para os organismos aquáticos.¹³⁷ No caso dos seres humanos, foram observados danos no fígado, ao estimularem alterações degenerativas e inflamatórias, bem como no trato gastrointestinal.^{41,140,141}

8.2. Antibióticos

Para além dos anti-inflamatórios, outras classes de fármacos foram, igualmente, avaliadas e estudadas relativamente à sua toxicidade e ao risco que representam para os organismos dos ecossistemas aquáticos e, eventualmente, para os seres humanos, como é o caso dos antibióticos. Estes têm sido uma das classes farmacológicas que causam maior preocupação na

comunidade científica, pois para além dos riscos ecotoxicológicos diretos, a sua ocorrência no meio ambiente pode influenciar e potenciar o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos e o desenvolvimento de agentes patogénicos.^{80,81,85,142,143} Estes fármacos são normalmente encontrados no meio aquático em concentrações subterapêuticas, pelo que o meio hídrico não só favorece a disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos, mas também é uma das principais vias de entrada no ecossistema de genes com resistência aos antimicrobianos. Esta resistência a antibióticos, através da transferência horizontal de genes, acaba por ser patogénica para o ser humano, aumentando a preocupação relativamente a questões de saúde humana e de estabilidade dos ecossistemas. A OMS (Organização Mundial da Saúde) considera, de facto, esta questão como uma ameaça crescente para a saúde pública a nível mundial.^{45,117,144}

Como se mostrou anteriormente, diversos estudos demonstram a ocorrência de antibióticos em vários tipos de águas. Além disso, parecem existir evidências de que, no meio aquático, a resistência pode ser adquirida mais rapidamente do que no meio terrestre.^{19,142,145}

A agricultura é uma das vias de contaminação do meio aquático por resíduos farmacêuticos, pelo que também é uma das causas para o aumento da resistência antimicrobiana, principalmente se pensarmos nos diversos fármacos que são utilizados em animais e em aquacultura, ou seja, antibióticos de uso veterinário. Uma agravante a este facto é a utilização das excreções dos animais para a fertilização dos terrenos agrícolas.^{16,145,146} Apesar de serem conhecidas por reduzir o número de bactérias em águas residuais, as ETARs são, também, responsáveis por aumentar o número de estirpes resistentes aos antibióticos, uma vez que durante o tratamento de águas residuais são criadas condições que possibilitam a transferência horizontal de genes resistentes a estes fármacos, pois existem altos níveis de oxigénio, de nutrientes e de bactérias. Alguns estudos, revelam, ainda, que esta classe de fármacos pode induzir no mexilhão de água doce imunotoxicidade em baixas concentrações, entre 20 e 1100 ng/L.^{102,128}

Uma vez que pouco se sabe em relação ao efeito crónico da exposição a baixas concentrações de fármacos a longo prazo, é necessário realizar mais estudos sobre a toxicidade crónica, pois a grande maioria dos estudos efetuados foca-se na toxicidade aguda. É igualmente importante, não só alargar o número de espécies observadas, pois existem muitas em que os efeitos tóxicos são completamente desconhecidos, mas também estudar a mesma espécie em várias regiões, incluindo as mais extremas, como a Antártida.^{45,147} Ainda assim, muitos medicamentos demonstraram causar efeitos adversos em espécies aquáticas, sendo que a classe dos antibióticos e dos anti-inflamatórios são aquelas que apresentam os maiores

valores de persistência, bioacumulação e toxicidade. Assim, estas duas classes representam um maior risco para o meio ambiente e para o equilíbrio dos ecossistemas, pelo que necessitam de uma maior atenção quer por parte da comunidade científica, quer por parte das populações.⁴

9. MÉTODOS ANALÍTICOS

Devido ao grande uso de produtos farmacêuticos, surgiu, também, a preocupação com a crescente contaminação ambiental provocada pelos resíduos que estes fármacos deixam. Desta forma, tornou-se necessário desenvolver técnicas e metodologias que ajudem na determinação e quantificação, a nível residual, destes compostos.

Os fármacos e os seus metabolitos encontram-se no ambiente em concentrações muito baixas, na ordem de grandeza dos ng/L a µg/L, o que requer procedimentos analíticos muito seletivos, específicos e sensíveis, de modo que seja possível a sua extração, deteção e, conseqüentemente, a quantificação.^{37,148} À medida que a tecnologia avança, o número de metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de resíduos farmacêuticos em águas é cada vez maior.¹⁴⁹

Primeiro que tudo, é necessário definir a amostragem, sendo este um passo essencial na verificação da ocorrência de fármacos e dos seus resíduos no meio ambiente. De seguida, é necessário fazer a separação da matriz dos analitos que queremos determinar. Desta forma, inicialmente, procede-se à extração das amostras, eliminando interferentes e pré-concentrando a matriz, visto que como já foi referido, as concentrações são relativamente baixas. Assim, neste passo usa-se, normalmente, a extração em fase sólida (SPE), que é uma das técnicas de extração mais utilizadas atualmente, uma vez que possibilita a purificação, concentração e a preparação rápida das amostras, antes de se realizar a análise cromatográfica. Concluída a etapa de extração, torna-se crucial a determinação e quantificação dos analitos que extraímos e que pretendemos analisar. Por norma, as técnicas que são usadas quando queremos determinar os fármacos que ocorrem no meio aquático são baseadas em técnicas cromatográficas, destacando-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC), mais especificamente a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), sendo que estas são, normalmente, acopladas a espectrometria de massa (MS), espectrometria de massa em tandem (MS-MS) ou espectrometria de massa com analisador por tempo de voo (ToF-MS).^{148,150-157}

Na Tabela 8, apresentam-se diferentes metodologias analíticas para a determinação dos fármacos em estudo em diferentes tipos de águas.

Tabela 8 – Metodologias analíticas para a determinação de fármacos em diferentes tipos de águas e os respectivos MDL e MQL.

Tipo de amostra	Fármaco	Técnica de extração	Método analítico	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	Referência
Águas residuais	Atenolol	SPE	HPLC-MS/MS	4.7	15.7	4
	Diclofenac			4.3	14.3	
	Ofloxacina			3.7	12.5	
	Trimetoprim			0.6	2.2	
Águas superficiais	Diltiazem	SPE	UHPLC-MS/MS	0.5	1.0	158
	Propranolol			0.1	0.5	
	Sulfametoxazol			0.1	0.5	
	Sulfapiridina			0.5	2.0	
Águas subterrâneas	Azitromicina	SPE	LC-MS/MS	0.5	2.0	159
	Ciprofloxacina			2.0	5.0	
Águas superficiais	Ciprofloxacina	SPE	LC-MS/MS	2.5	5.0	159
	Eritromicina			1.0	5.0	

9.1. Extração em fase sólida

Como referido anteriormente, a SPE é uma técnica de pré-tratamento de amostras muito utilizada em química, permitindo extrair e concentrar um ou mais analitos de uma determinada amostra. Este é um método analítico semelhante à extração líquido-líquido (LLE), pois ambas as técnicas se baseiam na separação dos vários solutos (analitos e interferentes) de uma amostra, através de duas fases diferentes. No entanto, na LLE, a separação ocorre através de dois líquidos imiscíveis, enquanto no SPE, a separação é observada entre uma fase sólida (um material adsorvente) e uma fase líquida, que normalmente é a amostra.¹⁶⁰⁻¹⁶³

O SPE é utilizado desde os anos 50, sendo que o seu uso tem vindo a crescer devido às vantagens que esta técnica apresenta (sobretudo relativamente à LLE).^{161,164} Algumas dessas vantagens são a rapidez do processo, a sua versatilidade (limpa e concentra), a sua simplicidade de execução, a sua reprodutibilidade, o menor consumo de solventes orgânicos, o baixo custo e uma grande disponibilidade de adsorventes, podendo, ainda, ser automatizada.^{148,161,163,165}

O processo de extração pode ser dividido, de um modo geral, em quatro passos: acondicionamento (e ativação), passagem da amostra, secagem e eluição, tal como está representado na Figura 5. No primeiro passo, começa-se por adicionar um solvente apropriado às colunas (ativação), o que permite a solvatação dos compostos e, de seguida, adiciona-se o mesmo solvente dos analitos (acondicionamento), que normalmente é a água. Nesta etapa, não se deve deixar secar o adsorvente. O segundo passo consiste na passagem da amostra pelas colunas com o auxílio de uma bomba de vácuo. Os analitos de interesse vão ficar retidos no adsorvente e os interferentes vão ser descartados. No terceiro passo, faz-se a lavagem das colunas com um solvente adequado, pois no passo anterior podem ter ficado interferentes retidos nos adsorvente. É importante referir que o solvente escolhido não deve ter força suficiente para retirar os analitos de interesse. Por fim, no quarto passo, realiza-se a eluição, passo esse que pretende quebrar a interação entre os analitos que queremos analisar e o adsorvente, sendo que, para isso, é necessário adicionar um solvente apropriado, que permita recuperar os compostos a analisar.^{148,161,166}

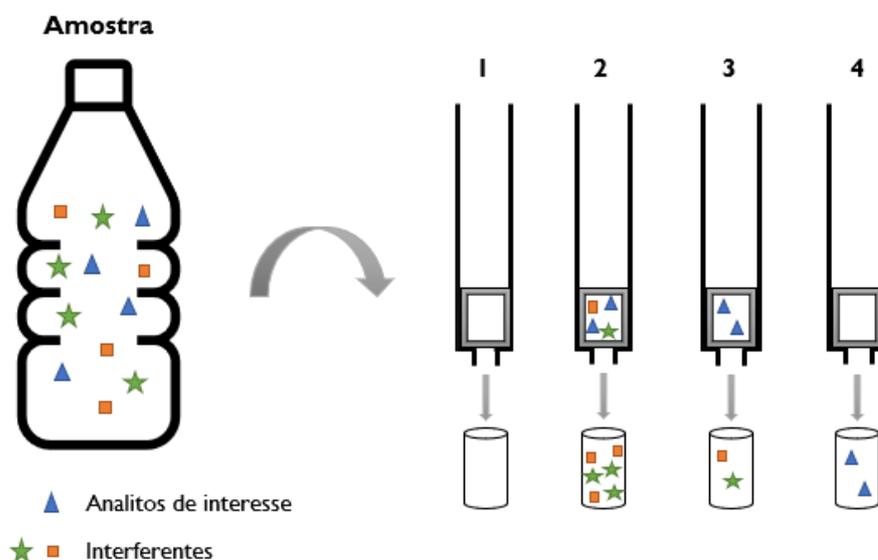


Figura 5 – Principais passos do procedimento de extração em fase sólida: 1 - Acondicionamento; 2 – Passagem da amostra; 3 – Lavagem; 4 – Eluição.^{148,161}

A maior dificuldade da técnica de SPE prende-se com a seleção da melhor coluna e, conseqüentemente, do melhor adsorvente, pois é através desta escolha que vai ser possível recuperar os analitos de interesse. Esta dificuldade resulta do facto de ser necessário compreender os mecanismos de interação entre os compostos que queremos utilizar e o adsorvente, sendo, também, necessário conhecer as propriedades de ambos. Existe uma grande multiplicidade de adsorventes, sendo os principais os poliméricos, os apolares e os de troca iónica.^{37,148,158}

De acordo com a Tabela 8, a técnica de SPE é muito utilizada na extração não só dos fármacos em estudo, mas também de fármacos de outras classes. É, de facto, uma das técnicas de extração preferidas de muitos autores.

9.2. Cromatografia líquida

A cromatografia líquida é um método de eleição em química analítica. Esta é uma técnica utilizada para proceder à separação dos vários compostos de uma mistura, fazendo passar continuamente a mistura por duas fases. Uma dessas fases move-se (fase móvel) em relação à outra (fase estacionária), sempre de uma forma contínua. Ou seja, uma substância, ao passar por uma coluna com uma dada fase estacionária, é arrastada por uma fase móvel (eluente).¹⁵²

De modo a satisfazer a procura de uma separação rápida e eficiente, novos tipos de cromatografia líquida têm surgido nos últimos anos, como o HPLC e, mais recentemente, o UHPLC. A técnica de HPLC faz uso de elevadas pressões para forçar o solvente a atravessar uma coluna cromatográfica repleta de partículas microporosas, sob um fluxo constante, permitindo obter uma maior separação dos solutos introduzidos no sistema de cromatografia. Este sistema é constituído por um solvente, uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de tratamento de dados, tal como está representado na Figura 6. O UHPLC baseia-se nos mesmos princípios que o HPLC, sendo que a principal diferença está no diâmetro das partículas que formam a fase estacionária e que é inferior a 2 μm ; por sua vez, no HPLC as partículas têm tamanhos entre 3 e 5 μm . Para além disso, o UHPLC permite obter melhor velocidade, resolução cromatográfica e sensibilidade da análise, o que vai possibilitar uma menor utilização de solvente, tendo vindo a ser cada vez mais utilizada por investigadores científicos, nomeadamente para a pesquisa de fármacos em águas (sobretudo antibióticos e anti-inflamatórios).^{155,156,167-169}

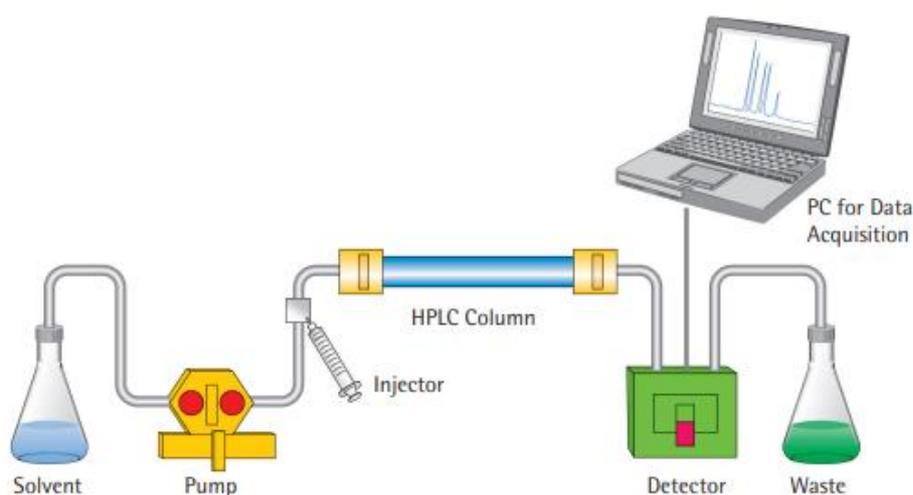


Figura 6 – Figura esquemática da composição geral de um sistema cromatográfico.¹⁷⁰

Pela análise da Tabela 8, podemos observar que em muitos estudos a cromatografia líquida é o método analítico usado para verificar a ocorrência de fármacos em vários tipos de águas, nomeadamente o HPLC e o UHPLC.

9.3. Deteção por espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica que se baseia na ionização em fase gasosa das moléculas da substância a analisar, sendo que os iões vão ser separados pela sua razão massa-carga (m/z). É uma técnica que permite, não só medir com precisão a massa molecular de átomos e moléculas convertendo-os em iões carregados, mas também determinar a estrutura de uma molécula. Esta é uma técnica muito utilizada pela comunidade científica, devido à sua versatilidade, precisão e sensibilidade. Um espectrómetro de massa é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detetor e um sistema de dados, tal como está representado na Figura 7.¹⁷¹⁻¹⁷³

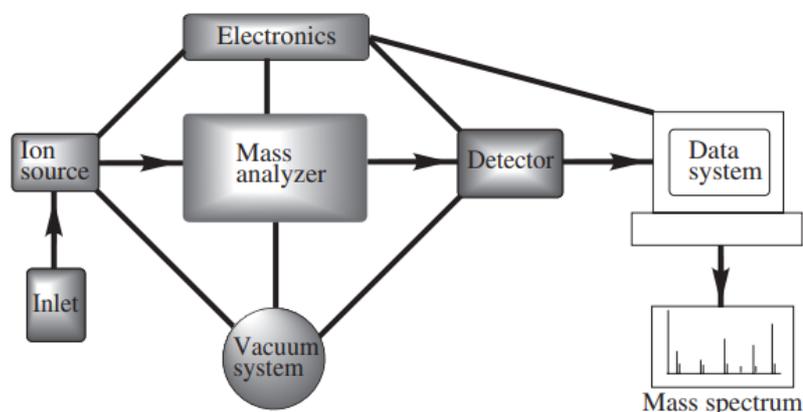


Figura 7 – Figura esquemática dos componentes de um espectrómetro de massa.¹⁷²

Os métodos de ionização mais comumente usados em LC-MS são a ionização química, ionização eletrónica (EI), o APCI (“*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*”), o MALDI (“*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*”), o FAB (“*Fast Atom Bombardment*”) e o ESI (ionização por *electrospray*). Esta última foi usada neste estudo, sendo, também, utilizada noutros estudos, pois é uma ferramenta sensível, fiável, robusta e fácil de usar. Concluída a ionização, é necessário proceder à separação dos iões e à medição das intensidades. Para isso, é necessário utilizar um analisador, sendo os mais comuns o de setor magnético, quadropolo (Q), armadilha iónica e o tempo de voo (ToF). De seguida, faz-se a deteção, sendo que os detetores mais frequentes são o detetor copo de *Faraday*, multiplicadores de eletrões e pós-aceleração. Por fim, através do sistema de dados, obtêm-se os espectros de massa das substâncias em estudo, sendo utilizado para esse efeito um computador.¹⁷¹⁻¹⁷⁴

Mais uma vez, pela análise da Tabela 8, é possível depreender que a espectroscopia de massa é o método de deteção mais usual entre os investigadores.

PARTE II – COMPONENTE EXPERIMENTAL

I. MATERIAIS E MÉTODOS

I.1. Amostragem

Foram recolhidas 17 amostras de águas residuais tratadas de diferente ETARs (submetidas a desinfecção UV), 11 amostras de águas subterrâneas e 2 amostras da Ribeira do Cadouço, todas da região do Algarve, durante a época de verão. Esta recolha foi realizada pelas autoridades nacionais, para garantir procedimentos de amostragem corretos. Posteriormente, retirou-se um litro de água para proceder à análise, que depois foi armazenada em recipientes de polietileno de alta densidade, que haviam sido antecipadamente lavados com água bi-destilada. De seguida, as amostras foram acidificadas até pH 3 com ácido fórmico (CH_2O_2) e transportadas em condições de refrigeração até ao laboratório da faculdade, local onde foram armazenadas a uma temperatura de -20°C até à sua análise.

I.2. Materiais e reagentes

Materiais utilizados:

- ✓ Bomba de vácuo modelo *Vacuum pump v-700* (Buchi (Flawil, Suíça))
- ✓ Bomba de vácuo modelo *Vacuum pump N035AN.18* (KNF Neuberger (Friburgo, Alemanha))
- ✓ Colunas *OASIS HLB* (*Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA))
- ✓ Filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ (*Whatman Schleicher and Schuell* (USA))
- ✓ Filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ (*Whatman* (Dassel, Germany))
- ✓ UHPLC “*Shimadzu Nexere X2*”
- ✓ ToF-MS “*ToF-MS 5600 – Sciex*”
- ✓ Coluna cromatográfica “*Zorbax Eclipse Plus C18*”

Reagentes utilizados:

- ✓ Água bidestilada obtida de um sistema MilliporeMilli Q system (Bedford, MA, USA)
- ✓ Água para HPLC obtida de um sistema MilliporeMilli Q system (Bedford, MA, USA)
- ✓ Metanol (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA))
- ✓ Azoto (Sociedade Portuguesa do Ar Líquido “ARLIQUIDO”, LDA (Algés, Portugal))
- ✓ Padrão interno (Sulfameter) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA))
- ✓ Ácido fórmico (Merck (Darmstadt, Germany))

I.3. Procedimento Experimental

Inicialmente, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. De seguida, verificou-se o pH. As amostras que apresentaram um pH superior ao pretendido, foram acidificadas até pH 3, com o auxílio de ácido fórmico.

Uma vez que se tratam de amostras complexas, antes de se efetuar a extração, é necessário realizar uma etapa de preparação. Assim, foram efetuadas duas filtrações com filtro de membrana, a vácuo, primeiro com um filtro de 0,45 μm e, de seguida, com um filtro de 0,22 μm (Figura 8). No final das filtrações, foram medidos e analisados 500 mL de cada amostra filtrada.



Figura 8 – Filtração da amostra com o filtro de 0,45 μm (esquerda) e com o filtro de 0,22 μm (direita).

Posteriormente, às amostras foram adicionados 500 μL de sulfameter, um padrão interno, adicionado antes da extração, para que sofra todas as alterações que as amostras vão sofrer ao longo das próximas etapas. Desta forma, por comparação com o sulfameter vamos quantificar a presença (ou ausência se for o caso) de fármacos nas águas.

De seguida, procedeu-se ao passo de extração em fase sólida (Figura 9), tendo sido utilizadas, para isso, colunas OASIS HLB (200 mg, 10 mL/min de fluxo máximo). Apesar de não ser um passo obrigatório, inicialmente, estas colunas foram acondicionadas (ativadas) com 2 mL de metanol e 2 mL de água para HPLC, permitindo que todos os processos fossem mais rápidos. Posteriormente, fizeram-se passar, em cada coluna, 500 mL de cada uma das

amostras. Em seguida, as colunas foram lavadas com 6 mL de metanol:água (10:90), para arrastar todos os possíveis interferentes que possam ter permanecido na coluna. Logo depois, secaram-se as colunas durante 15 min. Após esse período de tempo, fez-se a eluição, colocando 6 mL de metanol em cada coluna, para arrastar os compostos em estudo.

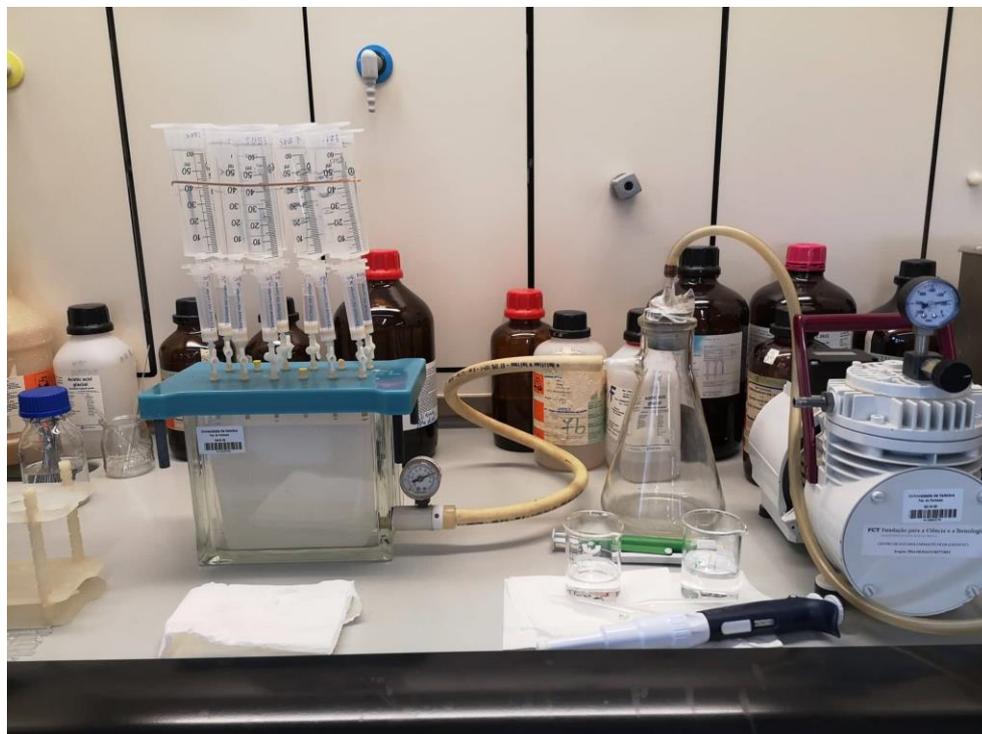


Figura 9 – Extração em fase sólida (SPE), utilizando colunas OASIS HLB.

Posteriormente, o eluato foi evaporado até à secura, sob uma corrente suave de azoto (gás inerte), a 40°C e logo após os extratos estarem secos, foram armazenados a -20°C até a análise cromatográfica.

Efetuada a extração, passou-se à análise cromatográfica. Esta análise foi realizada no INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária), tendo sido usado um sistema UHPLC “Shimadzu Nexere X2” acoplado a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo (ToF-MS) “ToF-MS 5600 – Sciex”. Neste sistema, foi utilizada uma coluna cromatográfica “Zorbax Eclipse Plus C18” (tamanho da partícula de 1,8 µm, 2.1 mm i.d. x 50 mm), tendo sido mantida a uma temperatura de 40°C. Este sistema está representado na Figura 10.



Figura 10 – Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo (INIAY).

As amostras obtidas no final do passo de extração foram, posteriormente, dissolvidas (reconstituídas) em 0,5 mL de uma solução de metanol:água (10:90), filtradas e injetadas. Para isso, foi usado um volume de injeção de 10 μ L, com um fluxo de 0,5 mL/min.

Relativamente ao gradiente, foram utilizados dois sistemas, uma fase móvel A, constituída por 0,1% de ácido fórmico e uma fase móvel B, constituída por acetonitrilo. Na Tabela 9, está representado gradiente ao longo do tempo.

Tabela 9 – Gradiente ao longo do tempo de análise.

Tempo (min)	Gradiente A (%)	Gradiente B (%)
0	97	3
2	97	3
5	40	60
9	0	100
10	97	3
11	97	3

Por fim, a espectrometria de massa foi realizada no modo de ionização com um *electrospray* positivo e com uma gama de massas de 100-920 Da.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Performance analítica

A performance da metodologia analítica utilizada possibilita assegurar que os resultados obtidos são verdadeiros.¹⁶⁶

Uma vez que a etapa da análise cromatográfica foi realizada no INIAV, o método foi, também, validado pelos profissionais deste laboratório. Desta forma, foram obtidos os valores do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), repetibilidade e reprodutibilidade, representados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores do LOD, LOQ, repetibilidade e reprodutibilidade.

Fármacos	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Repetibilidade (%)	Reprodutibilidade (%)
Diclofenac	0.03	0.10	5.9%	8.8%
Azitromicina	0.03	0.09	11.5%	14.4%
Ciprofloxacina	6.94	23.12	3.2%	4.7%
Ofloxacina	1.98	6.61	1.4%	2.6%
Sulfametoxazol	0.05	0.18	2.5%	3.7%
Sulfapiridina	0.91	3.04	3.3%	3.3%
Trimetoprim	1.61	5.36	4.3%	6.4%

Pela análise da Tabela 10, verifica-se que os valores do LOD variaram entre 0.03 ng/L e 6.94 ng/L, enquanto que os valores do LOQ variaram entre 0.10 ng /L e 23.12 ng/L. Estes valores estão de acordo com os obtidos por outros autores, tal como está representado na Tabela 8.

2.2. Ocorrência de anti-inflamatórios e antibióticos

Águas Residuais Tratadas

Relativamente às amostras de águas residuais tratadas, analisando a Figura 11, observa-se que o fármaco que ocorre, sucessivamente, em maiores concentrações é o anti-inflamatório diclofenac. De facto, a concentração mínima encontrada para este fármaco foi de 92.14 ng/L

(amostra E013) e a máxima foi de 1196.61 ng/L (amostra S003), tendo uma concentração média de 165.91 ng/L.

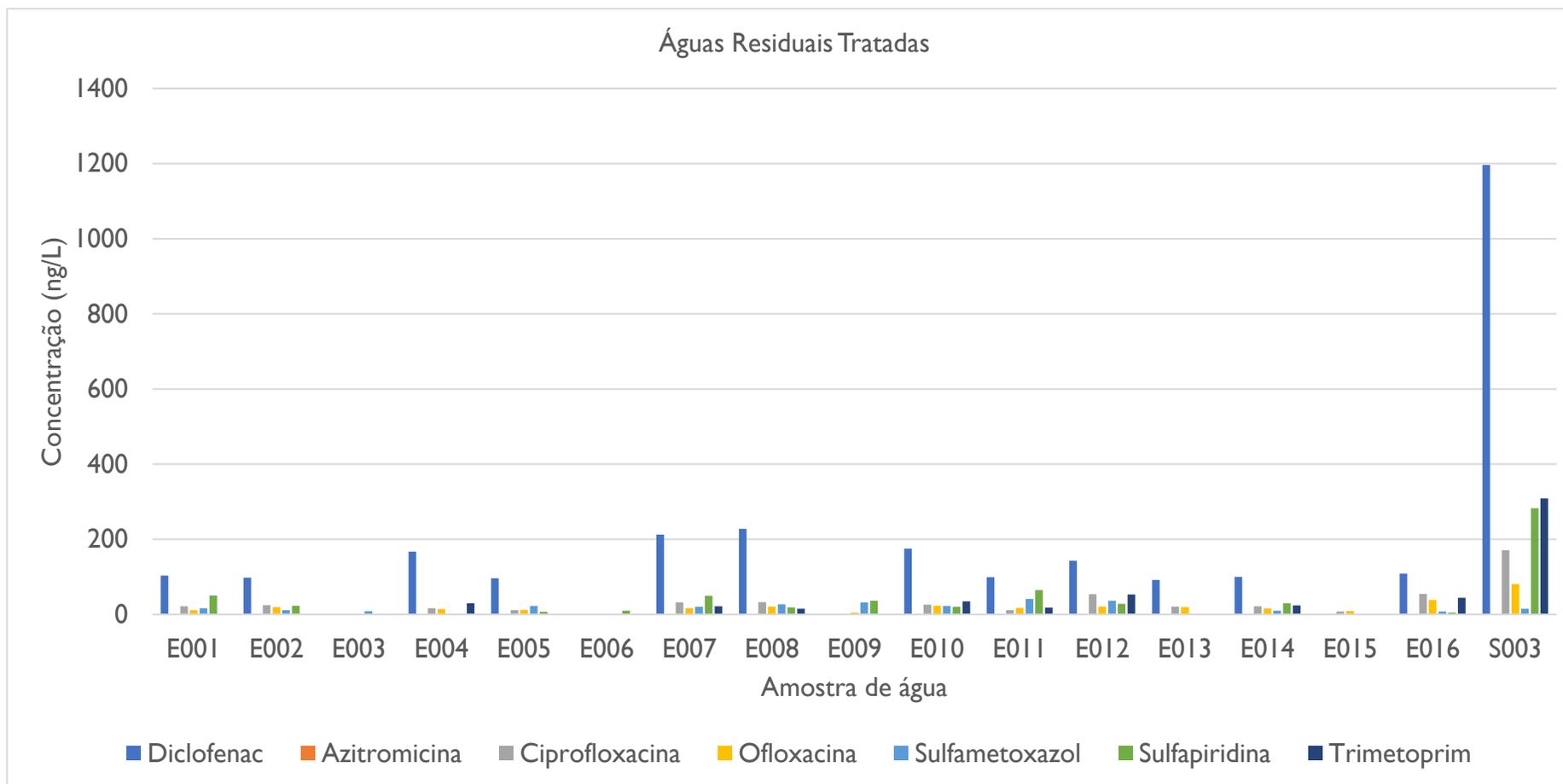


Figura 11 – Concentração dos fármacos estudados em 17 amostras de águas residuais tratadas, da região do Algarve.

Estes dados estão diretamente relacionados com o padrão de consumo dos portugueses. Segundo um relatório do INFARMED, o diclofenac foi a segunda substância ativa mais vendida em Portugal (considerando apenas medicamentos não sujeitos a receita médica; valor percentual de embalagens vendidas), no ano de 2021, facto que pode ajudar a explicar as concentrações encontradas para este fármaco.⁹⁹

Comparando os resultados obtidos com outros estudos, verifica-se que a concentração média de diclofenac nas nossas amostras (165.91 ng/L) é ligeiramente superior à concentração média encontrada num estudo realizado em efluentes de 90 ETARs urbanas europeias (49 ng/L).¹⁷⁵ Num outro estudo, foi, mais uma vez, observada uma concentração média para este fármaco ligeiramente inferior àquela que obtivemos, tendo esta sido de 42.9 ng/L.¹¹⁵ Este facto é ainda mais evidente quando olhamos individualmente para as amostras, uma vez que a amostra S003 apresenta valores de concentração muito acima das médias encontradas neste e nos estudos citados.

Quanto aos antibióticos, obtiveram-se concentrações médias de 29.77 ng/L para a ciprofloxacina, 19.10 ng/L para a ofloxacina, 15.96ng/L para o sulfametoxazol, 36.72 ng/L para a sulfapiridina e 34.37 para o trimetoprim. Estes valores são relativamente baixos e, quando comparados com outros estudos, verifica-se que são bastante inferiores aos valores médios encontrados tanto no estudo realizado em efluentes de 90 ETARs urbanas europeias, quanto ao estudo efetuado em efluentes de ETAR em Portugal.^{115,175}

Para além disso, a análise da Figura 11 permite afirmar que a amostra S003 foi aquela em que se obteve concentrações mais elevadas para vários dos fármacos estudados, sendo por isso uma possível fonte de contaminação do meio aquático.

Águas Superficiais

No caso das amostras de água da Ribeira do Cadouço (jusante e montante), os resultados alcançados estão representados na Figura 12.

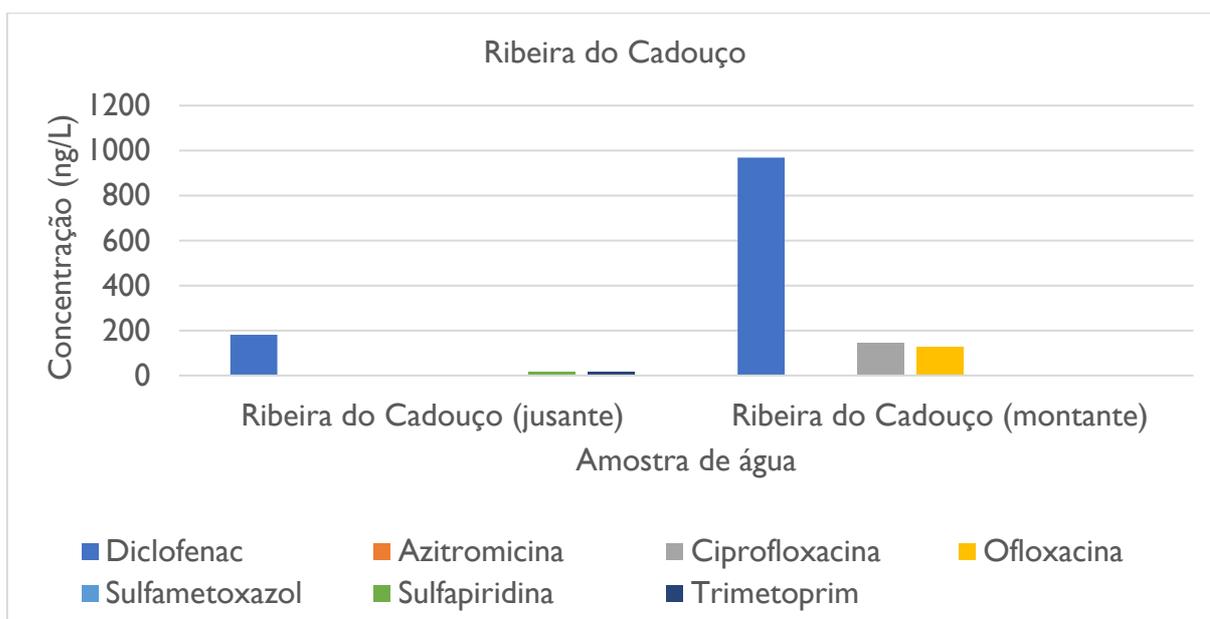


Figura 12 – Concentração dos fármacos estudados nas amostras de água recolhidas a jusante e a montante da ribeira do Cadouço, da região do Algarve.

Mais uma vez se observa que o diclofenac foi o fármaco com a concentração mais elevada, tendo um valor mínimo de 180.56 ng/L (jusante), um máximo de 968.68 ng/L (montante) e um médio de 574.62 ng/L. O valor médio da concentração é bastante superior ao das amostras anteriores, algo que não deveria acontecer, uma vez que a concentração dos fármacos tende a diminuir do afluente da ETAR para a efluente e desta para as águas da superfície. Para além disso, seria expectável que a jusante as concentrações fossem superiores do que a montante, tal como um estudo realizado em Portugal demonstrou.³¹ Também temos de ter em consideração que, no caso das águas residuais tratadas, foram recolhidas 17 amostras, enquanto que na ribeira do Cadouço foram apenas 2 amostras e, para além disso, observa-se que o valor máximo na ribeira é menor do que o valor máximo encontrado nas águas residuais tratadas. Ainda assim, estes valores são elevados, sobretudo quando comparados com os valores de um estudo realizado em águas de superfície portuguesas, o qual obteve uma concentração mínima de 25.13 ng/L e máxima de 51.24 ng/L para o diclofenac.³¹ No entanto, é importante realçar que este foi o segundo fármaco mais consumido em Portugal, no ano de 2021, o que pode ajudar a compreender estes resultados.

No caso dos antibióticos, a jusante foram apenas observados a sulfapiridina e o trimetoprim, ambos em concentrações muito baixas (14.24 ng/L e 14.31, respetivamente). Já a montante foram encontrados a ciprofloxacina e a ofloxacina (144.95 ng/L e 125.91 ng/L, respetivamente). Mais uma vez se verifica que a jusante as concentrações são inferiores do

que a montante. Ainda assim, quando comparamos estes valores com os que foram obtidos num estudo realizado em Portugal, verificamos, novamente, que as concentrações encontradas no nosso trabalho são inferiores às do estudo, com exceção da ofloxacina, cujo resultado obtido é bastante próximo do que é descrito na literatura (120 ng/L).^{64,114}

Águas Subterrâneas

No que concerne ao gráfico das águas subterrâneas (Figura 13), verifica-se que apenas um dos fármacos estudados foi encontrado nas amostras, nomeadamente nas amostras Sub 7, Sub 8, Sub 9 e Sub 10. Esse fármaco foi o trimetoprim, tendo sido encontrado em baixas concentrações.

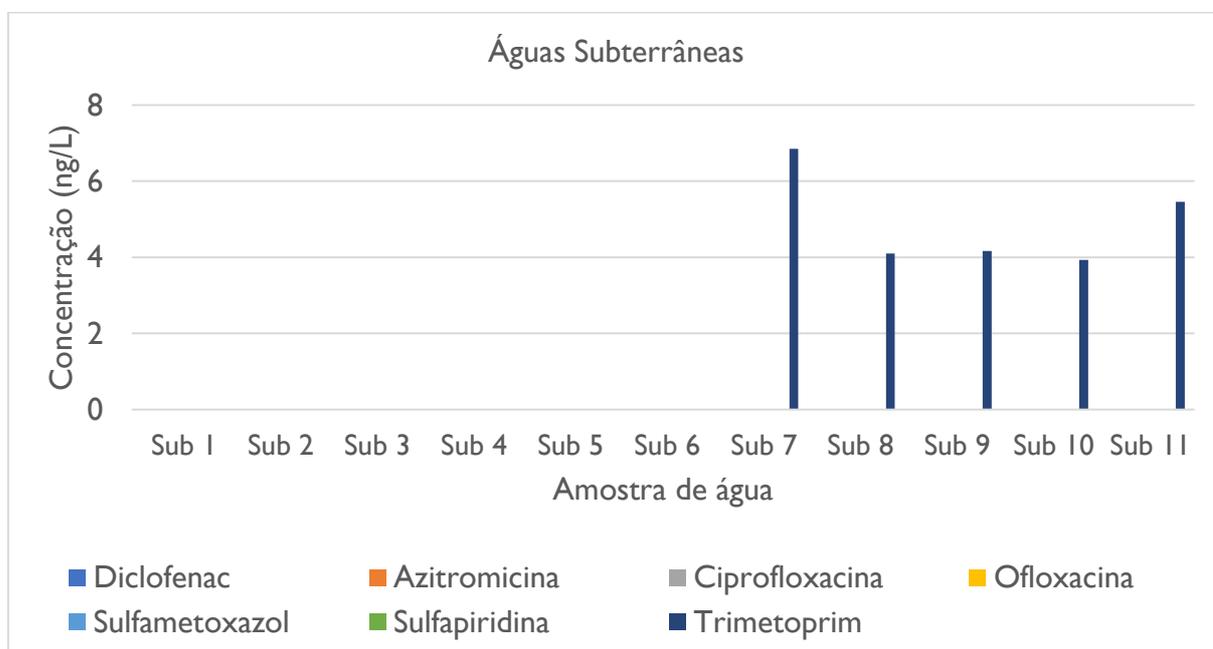


Figura 13 – Concentração dos fármacos estudados em 11 amostras de águas subterrâneas, da região do Algarve.

De facto, a concentração de trimetoprim mais elevada foi de 6.85 ng/L, tendo sido encontrada na amostra Sub 7, a mais baixa foi de 3.93 ng/L (amostra Sub 10) e a concentração média foi de 2.23 ng/L, isto se tivermos em consideração as amostras em que não foi encontrado este fármaco. Analisando comparativamente os resultados obtidos para este fármaco com os resultados obtidos para este mesmo fármaco de um estudo efetuado em Espanha, verifica-se que os valores são muito próximos, estando, por isso, estes resultados de acordo com a literatura.¹¹³

Ainda que seja esperado que a ocorrência de resíduos farmacológicos em águas subterrâneas seja em concentrações baixas ou praticamente inexistentes, esta ainda acontece. Alguns estudos obtiveram, não só concentrações para o trimetoprim, mas também para outros fármacos, alguns deles em concentrações significativas, como é o caso das análises efetuadas na Índia.^{113,117,119} Desta forma, face aos valores de concentração encontrados nas amostras de águas subterrâneas algarvias, é legítimo afirmar que estes resultados foram bastante positivos.

Excetuando o diclofenac, as concentrações encontradas, nas várias amostras de águas algarvias (Figuras 11, 12 e 13), são relativamente baixas, estando a grande maioria abaixo das médias registadas noutros estudos. Este facto pode estar diretamente associado à baixa densidade populacional na zona do Algarve no momento e no local em que se realizou a recolha das amostras. Estas foram recolhidas entre os meses de junho e setembro de 2021. O Algarve é uma zona maioritariamente turística, sobretudo de turismo balnear (verão), pelo que o início e boa parte da recolha de amostras coincidiu com esta época balnear, no entanto, face à pandemia da COVID-19, houve menos pessoas a deslocarem-se para a zona. Desta forma, uma densidade populacional mais baixa do que o normal pode ter contribuído para os valores de concentração obtidos. No caso do diclofenac, como foi referido, este foi o segundo fármaco mais vendido em Portugal, no ano de 2021, pelo que os valores da sua concentração não foram tão afetados pelas causas acima referidas.

Um outro fator que pode contribuir para uma menor concentração de fármacos nas águas é a variação sazonal, pois durante o verão as concentrações destes tendem a diminuir, uma vez que muitos destes compostos se degradam face ao calor sentido durante esta época do ano. Para além disso, no verão, a procura por antibióticos e anti-inflamatórios é, normalmente, inferior. Estudos realizados na região do Algarve demonstraram que a primavera apresentava uma menor concentração de fármacos nas águas, quando comparado com o verão, algo que não seria exatável, mas que era facilmente explicado devido ao aumento drástico da população algarvia durante a época balnear, pelo que também mais medicamentos são consumidos. No entanto, como foi referido, no ano de 2021, a densidade populacional do Algarve durante o verão foi muito inferior à registada em anos anteriores, pelo que também há um menor consumo de fármacos, levando a que as concentrações obtidas no nosso estudo sejam inferiores.^{8,29,31}

CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho era verificar a ocorrência de fármacos em amostras de águas residuais tratadas, águas da ribeira do Cadouço (jusante e montante) e águas subterrâneas, todas elas pertencentes à região do Algarve. Assim, foi selecionado para o estudo o anti-inflamatório diclofenac e os antibióticos azitromicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, sulfapiridina e trimetoprim.

O fármaco que foi detetado em maiores concentrações foi o diclofenac. Nas amostras de águas residuais tratadas teve uma concentração mínima de 92.14 ng/L (amostra E013), uma máxima de 1196.61 ng/L (amostra S003) e uma concentração média de 165.91 ng/L. No entanto, o que contribui para que se tenham obtido valores mais altos de concentração para este composto foi a amostra S003. No caso das amostras de água da ribeira do Cadouço, mais uma vez o diclofenac foi o composto encontrado em maior concentração, apresentando um valor a jusante de 180.56 ng/L e a montante de 968.68 ng/L. Ainda assim, estes valores eram expectáveis, visto que estão de acordo com o padrão de consumo dos portugueses, pois segundo o INFARMED, o diclofenac foi a segunda substância ativa mais vendida em Portugal, no ano de 2021.

Já os antibióticos foram encontrados, de uma forma geral, em baixas concentrações. No caso das águas subterrâneas, o único fármaco detetado foi o trimetoprim, apenas detetado em cinco amostras, tendo uma concentração média de 2.23 ng/L. Neste tipo de águas, nem mesmo o diclofenac foi encontrado. Visto que as águas subterrâneas são um dos principais reservatórios e fontes de abastecimento das sociedades e tendo em conta que o Algarve é uma região que sofre com problemas de seca, devido às alterações climáticas, a baixa ocorrência de fármacos nestas águas é um facto extremamente importante. Também nas amostras de águas residuais tratadas e de águas da ribeira do Cadouço, os antibióticos foram detetados em baixas concentrações. No entanto, a amostra S003, uma vez mais, foi aquela em que se encontraram as maiores concentrações de antibióticos, pelo que é possível que a ETAR da amostra S003 seja uma das principais fontes de contaminação ambiental desta região.

Estas baixas concentrações encontradas para os antibióticos podem ser explicadas pelo facto de as amostras terem sido recolhidas durante o verão de 2021, ano que também ficou marcado pela pandemia da COVID-19, o que levou menos turistas para o Algarve, região essa com uma baixa densidade populacional e que vive, principalmente, do turismo balnear. Para além disso, o facto das amostras terem sido recolhidas na época do verão, também ajuda a

explicar que as concentrações sejam mais baixas, pois, nesta altura do ano, o calor vai provocar uma maior degradação dos fármacos.

Assim, ainda que de uma forma geral os resultados tenham sido bastante positivos, mais estudos devem ser realizados, pois não se tem um conhecimento preciso acerca das complicações que a ocorrência destes fármacos, no meio aquático, tem para a saúde dos seres humanos e de muitos dos animais, mesmo em baixas concentrações. Para além disso, agora que a densidade populacional na época de verão tem voltado à normalidade no Algarve, devem ser realizadas novas análises às águas desta região, de modo a que seja possível confirmar os resultados adquiridos nesta dissertação e retirar conclusões sem a influência pandémica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHOPRA, Sunil; KUMAR, Dharmender – **Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation.** Heliyon. 6, 6 (2020) e04087. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
2. WOLLMANN, Felix et al. – **Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches.** Engineering in Life Sciences. 19, 12 (2019) 860-871. doi:10.1002/elsc.201900071.
3. MUÑOZ, Ivan et al. – **Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture.** TrAC Trends in Analytical Chemistry. 28, 6 (2009) 676-694. doi:10.1016/j.trac.2009.03.007.
4. MENDOZA, A. et al. – **Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard.** Environmental Research. 140 (2015) 225–241. doi:10.1016/j.envres.2015.04.003.
5. GEISSEN, Violette et al. – **Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management.** International Soil and Water Conservation Research. 3, 1 (2015) 57–65. doi:10.1016/j.iswcr.2015.03.002.
6. KLANČAR, Anita et al. – **Levels of Pharmaceuticals in Slovene municipal and hospital wastewaters: A preliminary study.** Arh Hig Rada Toksikol. 67, 2 (2016) 106–115. doi:10.1515/aiht-2016-67-2727.
7. PARLAMENTO EUROPEU – **Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013 que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L 226 (2013) 1-17.
8. PEREIRA, André M. P. T. et al. – **Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: Geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment.** Environmental Research. 136 (2015) 108–119. doi:10.1016/j.envres.2014.09.041.
9. COLLADO, N. et al. – **Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system.** Environmental Pollution. 185 (2014) 202-212. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.040.
10. INFARMED – **Medicamentos de uso humano.** Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2016. [Acedido a 20 de julho de 2022].

Disponível na Internet: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano.

11. GURKE, Robert et al. – **Development of a SPE-HPLC-MS/MS method for the determination of most prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples.** *Journal of Chromatography B.* 990 (2015) 23-30. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.03.008.
12. CAMACHO-MUÑOZ, Dolores et al. – **Concentration evolution of pharmaceutically active compounds in raw urban and industrial wastewater.** *Chemosphere.* 111 (2014) 70-79. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.03.043.
13. MELO, Silene Alessandra Santos et al. – **Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados.** *Química Nova.* 32, 1 (2009) 188-197. doi:10.1590/S0100-40422009000100034.
14. HIGNITE, Charles; AZARNOFF, Daniel L. – **Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluente.** *Life Sciences.* 20, 2 (1977) 337-341. doi:10.1016/0024-3205(77)90329-0.
15. MORAIS, Sérgio Alberto; DELERUE-MATOS, Cristina; GABARRELL, Xavier – **An uncertainty and sensitivity analysis applied to the prioritisation of pharmaceuticals as surface water contaminants from wastewater treatment plant direct emissions.** *Science of the Total Environment.* 490 (2014) 342-350. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.082.
16. HU, Feng-Yang et al. – **Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC-MS/MS.** *Journal of Chromatography B.* 949-950 (2014) 79-86. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.008.
17. ZHOU, Haidong et al. – **Temporal and spatial features of selected wastewater-marking pharmaceuticals and potential mechanisms of their removal from urban rivers.** *Environmental Science and Pollution Research.* 24, 18 (2017) 15712-15726. doi:10.1007/s11356-017-9184-1.
18. PAÍGA, Paula et al. – **Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation.** *Science of the Total Environment.* 573 (2016) 164-177. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.089.
19. GIEBUŁTOWICZ, Joanna et al. – **Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland).**

- Environmental Science and Pollution Research. 25, 6 (2018) 5788-5807. doi:10.1007/s11356-017-0861-x.
20. REIS-SANTOS, Patrick et al. – **Screening of human and veterinary pharmaceuticals in estuarine waters: A baseline assessment for the Tejo estuary.** Marine Pollution Bulletin. 135 (2018) 1079-1084. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.08.036.
 21. VERLICCHI, P. et al. – **Comparison of measured and predicted concentrations of selected pharmaceuticals in wastewater and surface water: A case study of a catchment area in the Po Valley (Italy).** Science of the Total Environment. 470-471 (2014) 844-854. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.026.
 22. EL-OGRI, Fouzia et al. – **A survey of wastewaters generated by a hospital in Marrakech city and their characterization.** Desalination and Water Treatment. 57, 36 (2016) 17061-17074. doi:10.1080/19443994.2016.1138328.
 23. NEGREIRA, Noelia; DE ALDA, Miren López; BARCELÓ, Damià – **Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk.** Science of the Total Environment. 497-498 (2014) 68-77. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.101.
 24. PARLAMENTO EUROPEU – **Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água.** Jornal Oficial. L 327 (2000) 0001-0073.
 25. PARLAMENTO EUROPEU – **Directiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001 que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano.** Jornal Oficial. L 311 (2001) 0067-0128.
 26. PARLAMENTO EUROPEU – **Directiva 2004/27/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004 que altera a Directiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano.** Jornal Oficial. L 136 (2004) 0034-0057.
 27. PARLAMENTO EUROPEU – **Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e**

- 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE.** Jornal Oficial da União Europeia. L 348 (2008) 84-97.
28. **PARLAMENTO EUROPEU – Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial da União Europeia. L 78 (2015) 40-42.
29. PEREIRA, André M.P.T. et al. – **Assessing environmental risk of pharmaceuticals in Portugal: An approach for the selection of the Portuguese monitoring stations in line with Directive 2013/39/EU.** Chemosphere. 144 (2016) 2507-2515. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.100.
30. **PARLAMENTO EUROPEU – Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de junho de 2018 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, e que revoga a Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão.** Jornal Oficial da União Europeia. L 141 (2018) 9-12.
31. PEREIRA, André M.P.T. et al. – **Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk.** Science of the Total Environment. 609 (2017) 1182-1191. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.200.
32. **PARLAMENTO EUROPEU – Decisão de Execução (EU) 2020/1161 da Comissão de 4 de agosto de 2020 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial da União Europeia. L 257 (2020) 32-35.
33. ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. – **Microalgae and wastewater treatment.** Saudi Journal of Biological Sciences. 19, 3 (2012) 257-275. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005.
34. JONES, Oliver A.H.; VOULVOULIS, Nick; LESTER, John N. – **Perspectives Potential impact of pharmaceuticals on environmental health.** Bulletin of the World Health Organization. 81, 10 (2003) 768-9. doi:10.1590/S0042-96862003001000015.
35. YANG, Gordon C.C. et al. – **Performance and mechanisms for the removal of phthalates and pharmaceuticals from aqueous solution by graphene-containing ceramic composite tubular membrane coupled with the**

- simultaneous electrocoagulation and electrofiltration process.** Chemosphere. 155 (2016) 274-282. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.060>.
36. BOIX, Clara et al. – **High resolution mass spectrometry to investigate omeprazole and venlafaxine metabolites in wastewater.** Journal of Hazardous Materials. 302 (2016) 332-340. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.09.059.
 37. ZORITA, Saioa et al. – **Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction.** Analytica Chimica Acta. 626, 2 (2008) 147-154. doi:10.1016/j.aca.2008.07.051.
 38. CAMACHO-MUÑOZ, Dolores; KASPRZYK-HORDERN, Barbara – **Multi-residue enantiomeric analysis of human and veterinary pharmaceuticals and their metabolites in environmental samples by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 407, 30 (2015) 9085-9104. doi:10.1007/s00216-015-9075-6.
 39. IKEHATA, Keisuke; JODEIRI NAGHASHKAR, Naeimeh; GAMAL EL-DIN, Mohamed – **Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review.** Ozone: Science and Engineering. 28, 6 (2006) 353-414. doi:10.1080/01919510600985937.
 40. GRACIA-LOR, Emma et al. – **Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia.** Chemosphere. 87, 5 (2012) 453-462. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.
 41. FENT, Karl; WESTON, Anna A.; CAMINADA, Daniel – **Ecotoxicology of human pharmaceuticals.** Aquatic Toxicology. 76, 2 (2006) 122-159. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009.
 42. DEBLONDE, Tiphanie; COSSU-LEGUILLE, Carole; HARTEMANN, Philippe – **Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature.** International Journal of Hygiene and Environmental Health. 214, 6 (2011) 442-448. doi:10.1016/j.ijheh.2011.08.002.
 43. GOLOVKO, Oksana et al. – **Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant.** Environmental Science and Pollution Research. 21, 12 (2014) 7578-7585. doi:10.1007/s11356-014-2654-9.

44. AZUMA, Takashi et al. – **A method for evaluating the pharmaceutical deconjugation potential in river water environments.** Chemosphere. 180 (2017) 476-482. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.040.
45. GONZÁLEZ-ALONSO, Silvia et al. – **Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region.** Environmental Pollution. 229 (2017) 241-254. doi:10.1016/j.envpol.2017.05.060.
46. HERRMANN, Manuel et al. – **The significance of different health institutions and their respective contributions of active pharmaceutical ingredients to wastewater.** Environment International. 85 (2015) 61-76. doi:10.1016/j.envint.2015.07.020.
47. CHONOVA, Teofana et al. – **Separate treatment of hospital and urban wastewaters: A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities.** Science of the Total Environment. 542, Part A, (2016) 965-975. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.161.
48. SEIFRTOVÁ, M. et al. – **Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 391, 3 (2008) 799-805. doi:10.1007/s00216-008-2020-1.
49. KÜMMERER, Klaus – **Pharmaceuticals in the environment.** Annual Review of Environment and Resources. 35, 1 (2010) 57-75. doi:10.1146/annurev-environ-052809-161223.
50. BIEL-MAESO, Miriam; CORADA-FERNÁNDEZ, Carmen; LARA-MARTÍN, Pablo A. – **Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE).** Chemosphere. 185 (2017) 1001-1010. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.094.
51. VIEGAS-JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. – **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova. 29, 2 (2006) 326-337. doi:10.1590/S0100-40422006000200025.
52. LUENGO, Marcos B. – **Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças.** Revista Eletrónica de Farmácia. 2, 2 (2005) 64-72. doi:10.5216/ref.v2i2.1954.

53. YATOO, Mohd. I. et al. – **Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review**. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery. 12, 1 (2018) 39-58. doi:10.2174/1872213X12666180115153635.
54. RANG, H. P. et al. – **Rang & Dale: Farmacologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. ISBN 978-85-352-6500-2.
55. GAN, Tong J. – **Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile**. Current Medical Research and Opinion. 26, 7 (2010) 1715-1731. doi: 10.1185/03007995.2010.486301.
56. BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. – **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 13ª Ed. New York: McGraw Hill / Medical, 2018. ISBN 978-1-25-958473-2.
57. GREEN, Gary A. – **Understanding NSAIDs: From Aspirin to COX-2**. Clinical Cornerstone. 3, 5 (2001) 50-60. doi:10.1016/s1098-3597(01)90069-9.
58. BRATTWALL, Metha; TURAN, Ibrahim; JAKOBSSON, Jan – **Musculoskeletal pain: prescription of NSAID and weak opioid by primary health care physicians in Sweden 2004-2008 - a retrospective patient record review**. Journal of Pain Research. 3 (2010) 131-135. doi:10.2147/jpr.s12052.
59. INFARMED – **Estatística do Medicamento e Produtos de Saúde**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2014. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1229727/Estat%C3%ADstica+do+Medicamento+2014/988074f4-4f89-4a7c-9055-844cb88e93fd?version=1.2>.
60. MENDONÇA, L. L. F. et al. – **Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility**. Rheumatology. 39, 8 (2000) 880-882. doi:10.1093/rheumatology/39.8.880.
61. VANE, J. R.; BOTTING, R. M. – **Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action**. Inflammation Research. 47 (1998) 78-87. doi:10.1007/s000110050284.
62. KUMMER, Carmen Luize; COELHO, Tereza Cristina R. B. – **Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais**. Revista Brasileira de Anestesiologia. 52, 4 (2002) 498-512. doi:10.1590/S0034-70942002000400014.
63. WILLOUGHBY, Derek A.; MOORE, Adrian R.; COLVILLE-NASH, Paul R. – **COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory**

- disease.** Lancet. 355, 9204 (2000) 646-648. doi:10.1016/S0140-6736(99)12031-2.
64. SANTOS, Lúcia H.M.L.M. et al. – **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** Journal of Hazardous Materials. 175, 1-3 (2010) 45-95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.
65. PAROLINI, M. – **Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review.** Science of the Total Environment. 740 (2020) 140043. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140043.
66. CLEUVERS, Michael – **Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 59, 3 (2004) 309-315. doi:10.1016/S0147-6513(03)00141-6.
67. SARAVANAN, Manoharan et al. – **Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (Cyprinus carpio) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses.** Journal of Hazardous Materials. 195 (2011) 188-194. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.029.
68. LIMA, Rosa Silva et al. – **Uso indiscriminado de diclofenaco de potássio pela população idosa na cidade de Anápolis, no estado de Goiás, Brasil em 2014.** Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 44, 2 (2015) 179-188. doi:10.15446/rcciquifa.v44n2.56292.
69. ALTMAN, Roy et al. – **Advances in NSAID development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology.** Drugs. 75, 8 (2015) 859-877. doi:10.1007/s40265-015-0392-z.
70. TODD, Peter A.; SORKIN, Eugene M. – **Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy.** Drugs. 35, 3 (1988) 244-85. doi:10.2165/00003495-198835030-00004.
71. SCHNEIDER, W.; DEGEN, P. H. – **Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxy metabolites by capillary column gas chromatography with electron-capture detection.** Journal of Chromatography. 217 (1981) 263-271. doi:10.1016/s0021-9673(00)88081-4.
72. ZHANG, Yongjun; GEISSEN, Sven-Uwe; GAL, Carmen – **Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies.** Chemosphere. 73, 8 (2008) 1151-1161. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.086.

73. PUBCHEM – **National Library of Medicine**. EUA: National Center for Biotechnology Information, 2022. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
74. CHEMSPIDER – **Search and share chemistry**. Royal Society of Chemistry, 2022. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <http://www.chemspider.com/>.
75. DRUGBANK – **Database for Drug and Drug Target Info**. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://go.drugbank.com/>.
76. HEBERER, Thomas – **Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: A Review of Recent Research Data**. Toxicology Letters. 131, 1-2 (2002) 5-17. doi:10.1016/S0378-4274(02)00041-3.
77. SIM, Won-Jin et al. – **Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures**. Chemosphere. 82, 2 (2011) 179-186. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.026.
78. 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. 62, 12 (2010) 2862-2871. doi:10.2166/wst.2010.985.
79. CLARDY, Jon; FISCHBACH, Michael A.; CURRIE, Cameron R. – **The natural history of antibiotics**. Current Biology. 19, 11 (2009) R437-R441. doi:10.1016/j.cub.2009.04.001.
80. KÜMMERER, Klaus – **Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I**. Chemosphere. 75, 4 (2009) 417-434. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.
81. CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia – **Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario**. Environment International. 94 (2016) 736-757. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025.
82. GAYNES, Robert – **The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use**. Emerging Infectious Diseases. 23, 5 (2017) 849-853. doi:0.3201/eid2305.161556.
83. BERNATOVÁ, Silvie et al. – **Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using raman spectroscopy**. Molecules. 18, 11 (2013) 13188-13199. doi:10.3390/molecules181113188.
84. GUARDABASSI, Luca; KRUSE, Hilde – **Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais**. In: GUARDABASSI, Luca; LARS B.

- JENSEN, Lars B.; KRUSE, Hilde. Guia de antimicrobianos em veterinária. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. ISBN 9788536322308, p. 17-30.
85. KÜMMERER, K. – **Significance of antibiotics in the environment.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52, 1 (2003) 5-7. doi:10.1093/jac/dkg293.
 86. VAN BOECKEL, Thomas P. et al. – **Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data.** The Lancet Infectious Diseases. 14, 8 (2014) 742-750. doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
 87. DINH, QuocTuc et al. – **Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network.** Science of the Total Environment. 575, 1 (2017) 758-766. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.118.
 88. VÄLITALO, Pia et al. – **Toxicological impacts of antibiotics on aquatic microorganisms: A mini-review.** International Journal of Hygiene and Environmental Health. 220, 3 (2017) 558-569. doi:10.1016/j.ijheh.2017.02.003.
 89. HUTCHINGS, Matt; TRUMAN, Andrew; WILKINSON, Barrie – **Antibiotics: past, present and future.** Current Opinion in Microbiology. 51 (2019) 72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
 90. MOHR, Kathrin I. – **History of antibiotics research.** Current Topics in Microbiology and Immunology. 398 (2016) 237-272. doi:10.1007/82_2016_499.
 91. PEREIRA, André et al. – **Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: Part I—Source, fate and occurrence.** Molecules. 25, 5 (2020) 1026. doi:10.3390/molecules25051026.
 92. GÖBEL, Anke et al. – **Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment.** Environmental Science & Technology. 39, 11 (2005) 3981-3989. doi:10.1021/es048550a.
 93. ALMEIDA, Anabela et al. – **Human and veterinary antibiotics used in Portugal—A ranking for ecosurveillance.** Toxics. 2, 2 (2014) 188–225. doi:10.3390/toxics2020188.
 94. GRUNG, Merete et al. – **Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 71, 2 (2008) 328-340. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.015.
 95. INFARMED – **Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM): monitorização das vendas fora das farmácias.** Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2017. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet:

- <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2210525/janeiro+a+dezembro/53e03bcd-4530-42ed-9114-d00190d0c4dd?version=1.0>.
96. INFARMED – **Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM): monitorização das vendas fora das farmácias**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2018. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2771828/janeiro+-dezembro/e03f7070-e8b8-0bd4-0e53-d2ed436ae882?version=1.0>.
 97. INFARMED – **Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM): monitorização das vendas fora das farmácias**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2019. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3106715/janeiro-dezembro/17c3fac2-587c-be6d-7f08-7195ab0aef93?version=1.0>.
 98. INFARMED – **Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM): monitorização das vendas fora das farmácias**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2020. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3701917/janeiro-dezembro/6263e9fa-7a8d-5237-3863-d60d4f952d6b?version=1.0>.
 99. INFARMED – **Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM): monitorização das vendas fora das farmácias**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2021. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/4361298/janeiro-dezembro/cb2c65f9-b067-5ed0-a9f3-48df43c1920f?version=1.0>.
 100. INFARMED – **Estatística do Medicamento e Produtos de Saúde**. Portugal: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2020. [Acedido a 22 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1229727/Estat%C3%ADstica+do%C2%A0+Medicamento+2020/59d07725-acd8-adc6-d866-2949dabc2f57?version=1.0>.
 101. SIMAZAKI, Dai et al. – **Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health**. *Water Research*. 76 (2015) 187-200. doi:10.1016/j.watres.2015.02.059.
 102. SEGURA, Pedro A. et al. – **Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries**. *Environment International*. 80 (2015) 89-97. doi:10.1016/j.envint.2015.04.001.

103. AUS DER BEEK, Tim et al. – **Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives**. Environmental Toxicology and Chemistry. 35, 4 (2016) 823-835. doi:10.1002/etc.3339.
104. WEBER, Frank-Andreas et al. – **Pharmaceuticals in the environment - the global perspective. Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM**. Dessávia-Rosslau: German Environment Agency, 2014. [Acedido a 1 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals_in_the_environment_0.pdf.
105. MURATA, Ayako et al. – **Nationwide monitoring of selected antibiotics: Distribution and sources of sulfonamides, trimethoprim, and macrolides in Japanese rivers**. Science of the Total Environment. 409, 24 (2011) 5305-5312. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.014.
106. AUS DER BEEK, Tim et al. – **Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)**. Dessávia-Rosslau: German Environment Agency, 2016. ISSN 1862-4804.
107. HUGHES, Stephen R.; KAY, Paul; BROWN, Lee E. – **Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems**. Environmental Science and Technology. 47, 2 (2013) 661-677 doi:10.1021/es3030148.
108. VELPANDIAN, Thirumurthy et al. – **Un-segregated waste disposal: an alarming threat of antimicrobials in surface and ground water sources in Delhi**. Environmental Science and Pollution Research. 25, 29 (2018) 29518-29528. doi:10.1007/s11356-018-2927-9.
109. YAO, Linlin et al. – **Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: A case study at Jiangnan Plain, central China**. Ecotoxicology and Environmental Safety. 135 (2017) 236-242. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.006.
110. LIU, Xiaohui et al. – **Occurrence and fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in typical urban water of Beijing, China**. Environmental Pollution. 246 (2019) 163-173. doi:10.1016/j.envpol.2018.12.005.
111. HUANG, Fuyang et al. – **Recognition of typical antibiotic residues in environmental media related to groundwater in China (2009–2019)**. Journal of Hazardous Materials. 399 (2020) 122813. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122813.

112. KIM, Sang D. et al. – **Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters.** *Water Research*. 41, 5 (2007) 1013-1021. doi:10.1016/j.watres.2006.06.034.
113. SUI, Qian et al. – **Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review.** *Emerging Contaminants*. 1, 1 (2015) 14-24. doi:10.1016/j.emcon.2015.07.001.
114. FERNANDES, Maria João et al. – **Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal.** *Chemosphere*. 239 (2020) 124729. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124729.
115. SANTOS, Lúcia H. M. L. M. et al. – **Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals.** *Science of the Total Environment*. 461-462 (2013) 302-316. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.
116. TLILI, Ines et al. – **Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application.** *Science of the Total Environment*. 563-564 (2016) 424-433. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.101.
117. FICK, Jerker et al. – **Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production.** *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. Environmental Toxicology and Chemistry*. 28, 12 (2009) 2522-2527. doi:10.1897/09-073.1.
118. MIAO, Xiu-Sheng et al. – **Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada.** *Environmental Science and Technology*. 38, 13 (2004) 3533-3541. doi:10.1021/es030653q.
119. GARCÍA-GALÁN, Maria Jesús et al. – **Simultaneous occurrence of nitrates and sulfonamide antibiotics in two ground water bodies of Catalonia (Spain).** *Journal of Hydrology*. 383, 1-2 (2010) 93-101. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.06.042.
120. ZIYLAN, Asu; INCE, Nilsun H. – **The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes.** *Journal of Hazardous Materials*. 187, 1-3 (2011) 24-36. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.01.057.
121. NUNES, Bruno – **A presença de fármacos no ambiente.** *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 1, 1 (2011) 43-54.

122. ZENKER, Armin et al. – **Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment.** Journal of Environmental Management. 133 (2014) 378-387. doi:10.1016/j.jenvman.2013.12.017.
123. FU, Qiuguo et al. – **Biotransformation Changes Bioaccumulation and Toxicity of Diclofenac in Aquatic Organisms.** Environmental Science and Technology. 54, 7 (2020) 4400-4408. doi:10.1021/acs.est.9b07127.
124. GONZALEZ-REY, Maria; BEBIANNO, Maria João – **Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*?** Environmental Pollution. 173 (2013) 200-209. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.018.
125. EVGENIDOU, Eleni N.; KONSTANTINOOU, Ioannis K.; LAMBROPOULOU, Dimitra A. – **Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review.** Science of the Total Environment. 505 (2015) 905-926. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.10.021.
126. CRANE, Mark, WATTS, Chris; BOUCARD, Tatiana – **Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals.** Science of the Total Environment. 367, 1 (2006) 23-41. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.04.010.
127. KÜMMERER, Klaus – **Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks.** 3^a Ed. Springer-Verlag, 2008. ISBN 978-3-540-74663-8.
128. BOXALL, Alistair B. A. – **The environmental side effects of medication.** EMBO reports. 5, 12 (2004) 1110-1116. doi:10.1038/sj.embor.7400307.
129. COSTA, Carla Regina et al. – **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação.** Química Nova. 31, 7 (2008) 1820-1830. doi:10.1590/S0100-40422008000700038.
130. DE OLIVEIRA, Laira L. Damasceno et al. – **Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*.** Drug and Chemical Toxicology. 39, 1 (2016) 13-21. doi:10.3109/01480545.2015.1029048.
131. 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. 68, 2 (2004) 141-150. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.014.
132. GROS, M. et al. – **Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes.** Environment International. 36, 1 (2010) 15-26. doi:10.1016/j.envint.2009.09.002. doi:10.1016/j.envint.2009.09.002.

133. LA FARRE, Marinell et al. – **Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri***. *Journal of Chromatography A*. 938, 1-2 (2001) 187-197. doi:10.1016/s0021-9673(01)01154-2.
134. LANZA, Frank L.; CHAN, Francis K. L.; QUIGLEY, Eamonn M. M. – **Guidelines for prevention of NSAID-related ulcer complications**. *American Journal of Gastroenterology*. 104, 3 (2009) 728-738. doi:10.1038/ajg.2009.115.
135. GRIFFIN, Marie R. – **Epidemiology of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Associated Gastrointestinal Injury**. *The American Journal of Medicine*. 104, 3 (1998) 23S-29S. doi: 10.1016/s0002-9343(97)00207-6.
136. CORCORAN, Jenna; WINTER, Matthew J.; TYLER, Charles R. – **Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish**. *Critical Reviews in Toxicology*. 40, 4 (2010) 287-304. doi:10.3109/10408440903373590.
137. VIENO, Niina; SILLANPÄÄ, Mika – **Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A review**. *Environment International*. 69 (2014) 28-39. doi:10.1016/j.envint.2014.03.021.
138. FERRARI, Benoît et al. – **Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 3 (2003) 359-370. doi:10.1016/s0147-6513(02)00082-9.
139. OAKS, J. Lindsay et al. – **Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan**. *Nature*. 427, 6975 (2004) 630-633. doi:10.1038/nature02317.
140. BANKS, Alpha T. et al. – **Diclofenac-Associated Hepatotoxicity: Analysis of 180 Cases Reported to the Food and Drug Administration as Adverse Reactions**. *Hepatology*. 22, 3 (1995) 820-827. doi:10.1016/0270-9139(95)90303-8.
141. BJORKMAN, David – **Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Associated Toxicity of the Liver, Lower Gastrointestinal Tract, and Esophagus**. *The American Journal of Medicine*. 105, 5A (1998) 17S-21S. doi:10.1016/s0002-9343(98)00276-9.
142. CAUCCI, Serena et al. – **Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow**. *FEMS Microbiology Ecology*. 92, 5 (2016) fiw060. doi:10.1093/femsec/fiw060.

143. TUŠEVLJAK, N. et al. – **Antimicrobial use and resistance in aquaculture: Findings of a globally administered survey of aquaculture-allied professionals.** *Zoonoses and Public Health.* 60, 6 (2013) 426-436. doi:10.1111/zph.12017.
144. RIZZO, L. et al. – **Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review.** *Science of the Total Environment.* 447 (2013) 345-360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
145. CABELLO, Felipe C. – **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment.** *Environmental Microbiology.* 8, 7 (2006) 1137-1144. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x.
146. KHAN, Nadeem A. et al. – **Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging-pollutants- A critical review.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* 122 (2020) 115744. doi:10.1016/j.trac.2019.115744.
147. KOSMA, Christina I.; LAMBROPOULOU, Dimitra A.; ALBANIS, Triantafyllos A. – **Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment.** *Science of the Total Environment.* 466-467 (2014) 421-438. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.044.
148. JARDIM, Isabel – **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas Resumo.** *Scientia Chromatographica.* 2, 1 (2010) 13-25.
149. GROS, Meritxell; PETROVIÉ, Mira; BARCELÓ, Damià – **Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 386, 4 (2006) 941-952. doi:10.1007/s00216-006-0586-z.
150. DE ALDA, María 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.* 1000, (2003) 503-526. doi:10.1016/S0021-9673(03)00509-0.
151. TERNES, Thomas – **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 20, 1-2 (2001) 419-434. doi:10.1016/S0165-9936(01)00078-4.

152. SABIR, Azim; MOLOY, Mitra; BHASIN, Parminder – **HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW**. International Research Journal of Pharmacy. 4, 4 (2016) 39-46. doi:10.7897/2230-8407.04407.
153. LÓPEZ-ROLDÁN, Ramón 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. 80, 11 (2010) 1337-1344. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.042.
154. MADIKIZELA, Lawrence; CHIMUKA, Luke – **Simultaneous determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography**. Water SA. 43, 2 (2017) 264-274. doi:10.4314/wsa.v43i2.10.
155. QUESADA, Silvia; PASCHOAL, Jonas; REYES, Felix – **A simple method for the determination of fluoroquinolone residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) employing LC-MS/MS QToF**. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. 30, 5 (2013) 813-825. doi:10.1080/19440049.2013.791750.
156. NOVÁKOVÁ, Lucie; MATYSOVÁ, Ludmila; SOLICH, Petr – **Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis**. Talanta. 68, 3 (2006) 908-918. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.035.
157. HARRIS, Daniel – **Quantitative Chemical Analysis**. 8^a Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010. ISBN 978-1-4292-1815-3.
158. KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. – **Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography A. 1161, 1-2 (2007) 132-145. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.074.
159. MIRZAEI, Roya et al. – **An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design**. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 15, 21 (2017). doi:10.1186/s40201-017-0282-2.

160. ÖTLES, Semih; KARTAL, Canan – **Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples.** *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.* 15, 1 (2016) 5-15. doi:10.17306/J.AFS.2016.1.1.
161. CAMEL, Valérie – **Solid phase extraction of trace elements.** *Spectrochimica Acta Part B.* 58 (2003) 1177-1233. doi:10.1016/S0584-8547(03)00072-7.
162. PŁOTKA-WASYLKA, Justyna et al. – **New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 47, 5 (2017) 373-383 doi:10.1080/10408347.2017.1298987.
163. CALDERILLA, Carlo et al. – **Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 108 (2018) 370-380. doi:10.1016/j.trac.2018.09.011.
164. BRAUS, Harry; MIDDLETON, F.; WALTON, Graham – **Organic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters.** *Analytical Chemistry.* 23, 8 (1951) 1160-1164. doi:10.1021/ac60056a031.
165. BISCEGLIA, Kevin et al. – **Quantification of drugs of abuse in municipal wastewater via SPE and direct injection liquid chromatography mass spectrometry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 398, 6 (2010) 2701-2712. doi:10.1007/s00216-010-4191-9.
166. 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.* 399, 2 (2011) 807-822. doi:10.1007/s00216-010-4297-0.
167. TALEUZZAMAN, M. et al. - **Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review.** *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry.* 2, 6 (2015) 1056. ISSN 2381-8913.
168. GUMUSTAS, Mehmet et al. – **UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters.** *Chromatographia.* 76 (2013) 1365-1427. doi:10.1007/s10337-013-2477-8.
169. FREITAS, Andreia et al. – **Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.* 31, 5 (2014) 817-826. doi:10.1080/19440049.2014.891764.

170. TÖPPNER, Katrin; HANSEN, Dirk; HERBIG, Elmar – **Ultrapure Water for HPLC Analysis**. G.I.T. Laboratory Journal. 17 (2014).
171. HO, C. S. et al. – **Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications**. Clin Biochem Rev. 24, 1 (2003) 3-12.
172. DASS, Chhabil – **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-471-68229-5.
173. DE HOFFMANN, Edmund; STROOBANT, Vincent – **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3^a Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
174. VOGESER, Michael; SEGER, Christoph – **A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments**. Clinical Biochemistry. 41, 9 (2008) 649-662. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.02.017.
175. LOOS, Robert – **EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents**. Water Research. 47, 17 (2013) 6475-6487. doi:10.1016/j.watres.2013.08.024.