



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Vladislav Bobkov

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Problemática da ocorrência de antibióticos no meio aquático” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Paula Pedroso Soares e do Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Vladislav Bobkov

Relatório de Estágio e Monografia intitulada "Problemática da ocorrência de antibióticos no meio aquático" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação do Professor Doutor André Monteiro Pais Teixeira Pereira e da Dra. Ana Paula Pedroso Soares apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020

Eu, Vladislav Bobkov, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015249693, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Problemática da Ocorrência de Antibióticos no Meio Aquático” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 13 de Julho de 2020.

Vladislav Bobkov

## **Agradecimentos**

*Aos meus pais por me terem dado a oportunidade de embarcar nesta aventura;*

*À minha irmã por estar sempre presente para me alegrar;*

*Aos meus avós por sempre terem acreditado em mim;*

*Aos meus amigos, velhos e novos, pelos momentos inesquecíveis que passámos;*

*À Lucy por me apoiar em todos os momentos;*

*Às minhas duas primeiras professoras em Portugal, Eva e Anabela, por terem sido incansáveis  
comigo;*

*Ao Professor Doutor André Pereira por me ter guiado ao longo desta monografia;*

*À Dra. Ana Paula pela oportunidade que me deu de estagiar na sua farmácia;*

*À Farmácia Monteiro e à sua equipa pela integração e partilha de conhecimentos;*

*À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por ter sido a minha segunda casa nestes  
cinco anos;*

*A Coimbra, cidade que me acolheu e que guardo para sempre no meu coração;*

*A todos aqueles que, de uma maneira ou outra, fizeram parte do meu percurso.*

*O meu muito obrigado!*

## Índice

### Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Análise SWOT</b> .....	<b>9</b>
<b>Pontos Fortes</b> .....	<b>9</b>
Localização, funcionamento e horário .....	9
Caraterísticas da farmácia.....	9
Integração na equipa .....	10
Aprovisionamento, armazenamento e gestão de <i>stocks</i> .....	10
Utentes fidelizados e qualidade do serviço.....	11
Preparação de medicação para os lares de idosos.....	11
EasySlim® .....	12
Diversidade de funções .....	12
<b>Pontos Fracos</b> .....	<b>13</b>
Faixa etária dos utentes .....	13
Falhas no funcionamento do robô .....	13
Hesitação dos utentes perante um funcionário novo .....	13
Falta de conhecimentos nas áreas de Dermocosmética e Preparações de Uso Veterinário (PUV).....	14
Preparação de manipulados.....	14
<b>Oportunidades</b> .....	<b>14</b>
Vendas pela <i>Internet</i> .....	14
Promover ações de sensibilização e educação do utente .....	15
Oferecer melhores preços nos MNSRM, suplementos alimentares e cosméticos .....	15
<b>Ameaças</b> .....	<b>15</b>
Venda de MNSRM fora das farmácias .....	15
Esgotamento de medicamentos a nível nacional .....	16
Alterações constantes do Preço de Venda ao Público (PVP).....	16
Homeopatia .....	17
Falta de farmacêuticos nas pequenas cidades do Centro.....	17
<b>Casos Clínicos</b> .....	<b>17</b>
<b>Considerações Finais</b> .....	<b>18</b>

## **Parte II – “Problemática da ocorrência de antibióticos do meio aquático”**

Resumo .....	21
Abstract .....	21
Lista de Abreviaturas .....	22
Introdução .....	23
Vias de contaminação do meio aquático .....	24
Antibióticos – prescrição e consumo .....	25
Metabolismo e farmacocinética .....	29
Tratamento das águas residuais.....	31
Metodologias analíticas para a deteção e quantificação dos antibióticos.....	37
Ocorrência.....	37
Toxicidade dos antibióticos no meio aquático .....	41
Notas conclusivas .....	47
Referências .....	48

# **Parte I**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

Os medicamentos são o domínio do farmacêutico. As suas funções são essenciais em todo o percurso do medicamento: produção, controlo de qualidade, distribuição e dispensa. Com a tendência europeia de envelhecimento da população e da procura crescente dos medicamentos, o farmacêutico assume cada vez mais um papel imprescindível na sociedade ao ter um impacto positivo na saúde e na qualidade de vida.

São os conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) que permitem ao farmacêutico desempenhar com rigor as responsabilidades que lhe são atribuídas. A sua formação académica é vasta e multidimensional, pois não só oferece as bases, como também explora muitas áreas específicas da ciência. Isso confere-lhe as capacidades técnicas e o conhecimento científico para ser um profissional polivalente, preparado para os desafios do mercado de trabalho.

Ao seguir o ramo de farmácia comunitária, o farmacêutico recém-formado deverá possuir conhecimentos para dispensar Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e ter presentes em mente as suas indicações terapêuticas, os riscos associados ao seu uso e as suas contraindicações. Deverá estar capacitado para aconselhar corretamente o medicamento mais adequado à enfermidade do doente quando este se dirigir à farmácia. Ainda assim, a sua formação não é estanque e a presença diária na farmácia é uma aprendizagem contínua, tal como a atualização dos conhecimentos científicos ao consultar artigos e revistas destinadas a tal. A conduta do farmacêutico deve seguir o seu código deontológico que impõe preocupações de moralidade, ética e hábitos de trabalho.

Tal como exigido pelas Normas Orientadoras, este relatório de estágio encontra-se redigido sob forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) do estágio realizado entre 6 de janeiro e 31 de junho de 2020 na Farmácia Monteiro, em Santa Comba Dão. O objetivo desta análise é perceber os pontos fortes e fracos da farmácia comunitária, assim como as oportunidades e as ameaças inerentes a este ramo.



## **Análise SWOT**

### **Pontos Fortes**

#### **Localização, funcionamento e horário**

A Farmácia Monteiro localiza-se em Santa Comba Dão e está situada na Avenida General Humberto Delgado. A sua abertura remonta a julho de 2003, depois de se transferir do Bairro da Estação do Vimieiro. A localização da farmácia é vantajosa, pois está situada na maior e cumulativamente mais movimentada avenida da cidade. A farmácia está inserida num prédio e está rodeada de áreas residenciais e estabelecimentos comerciais. Está também perto de um banco e da Casa da Cultura de Santa Comba Dão. A proprietária, assim como Diretora Técnica e minha Orientadora é a Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Pedroso Soares. A equipa da farmácia é constituída também pela farmacêutica substituta, Dr.<sup>a</sup> Sandra, pela Dr.<sup>a</sup> Cyntia, pelo Dr. Francisco, pelas técnicas de farmácia Emília e Vanessa, e pelos técnicos auxiliares de farmácia João, Rui e Susana. Durante o meu tempo de estágio fui o único estagiário a fazer parte da equipa.

A farmácia funciona das 09h00 às 20h00 nos dias úteis, e das 09h00 às 13h00 aos sábados. É um horário que permite ao utente a ida à farmácia a uma hora conveniente, independentemente da sua ocupação. Na cidade de Santa Comba Dão existem três farmácias, mas apenas uma está de serviço durante as noites, alternando de semana a semana. Assim, nas semanas de serviço a farmácia tem as portas abertas das 09h00 até às 22h00, funcionando em regime de postigo nas demais horas.

#### **Caraterísticas da farmácia**

Do lado de fora, a Farmácia Monteiro tem excelentes acessos e uma grande zona de estacionamento. No “*frontoffice*”, a farmácia foi remodelada recentemente, pelo que tem um design moderno e sofisticado. O espaço está bem organizado, é amplo e com boa iluminação, o que facilita ao utente a visualização da grande variedade de produtos “*over the counter*”. Há uma série de lineares que estão organizados conforme os produtos, acessórios, dispositivos médicos, cosméticos ou MNSRM. Antes da pandemia, à entrada estava uma máquina de senhas que permitia uma fluidez do atendimento e evita os conflitos entre os utentes. Depois da pandemia a máquina das senhas foi retirada e foi posto um móvel com desinfetante de gel alcoólico. À disposição do utente estão 6 balcões individualizados, reduzidos para 3 em tempo de pandemia, e uma sala de atendimento confidencial. A farmácia

possui uma caixa automática, pelo que a receção do dinheiro é sempre correta, assim como o troco não vem nem por defeito nem por excesso.

No “*backoffice*” está a sala de encomendas onde são rececionados e inseridos no sistema todos os produtos. A farmácia possui um robô onde são colocadas a maior parte das caixas de medicamentos, com uma capacidade aproximadamente de 10 000 unidades. Além disso estão presentes armários onde são guardados os medicamentos que vêm em grande quantidade, medicamentos com caixas grandes que não é racional colocar no robô e também os medicamentos cujas formas das embalagens não permitem que lá sejam guardados. A farmácia contempla uma divisão para a preparação de manipulados, um escritório e uma sala de reuniões onde também decorrem as formações. A Farmácia Monteiro é privilegiada no sentido de possuir uma cave com uma série de armários e deslizantes nos quais estão armazenados imensos produtos, o que facilita a gestão de *stocks* e utiliza eficientemente o espaço. Nessa cave está também a sala do servidor informático e o arquivo.

### **Integração na equipa**

Um aspeto que eu considero ser importante num local de trabalho é a presença de uma equipa prestável e humilde. Foram essas as características que encontrei na equipa da Farmácia Monteiro, que me acolheu com carinho. Sempre se mostraram disponíveis para tirar todas as minhas dúvidas, e prontamente partilharam conhecimentos, davam dicas e sugestões sobre como deveria fazer uma determinada tarefa. A minha Orientadora, Dr.<sup>a</sup> Ana Paula, sempre esteve pronta para me ajudar e guiou sequencialmente o meu estágio. A Dr.<sup>a</sup> Sandra, Dr.<sup>a</sup> Cyntia, Dr. Francisco, e os técnicos Emília, João, Rui, Susana e Vanessa também foram crucias para a minha aprendizagem.

A empatia demonstrada pela equipa da farmácia ajudou-me a ganhar confiança para fazer o atendimento, e a desconfiança dos utentes perante um estagiário rapidamente passava quando estes me viam integrado na equipa.

### **Aprovisionamento, armazenamento e gestão de *stocks***

Na minha perspetiva, o aprovisionamento, armazenamento e a eficiente gestão de *stocks* são a base do sucesso de qualquer farmácia, e estas foram as primeiras tarefas que me foram atribuídas. A farmácia trabalha essencialmente com três distribuidores: Plural, Empifarma e

Cooprofar. No caso da Plural, por ser uma cooperativa grossista da região, as encomendas vêm duas vezes por dia: às 09h00 e às 14h00. Isto permite a um utente encomendar um medicamento de manhã e levantá-lo à tarde, o que é muito cómodo. Por esta razão, a Plural é a escolha preferencial para efeitos de armazenamento.

O armazenamento diário é efetuado com base nos stocks mínimos e máximos definidos para cada medicamento. No momento de fazer a encomenda diária, o responsável verifica sempre se os medicamentos em falta estão esgotados no armazenista principal, e verifica a disponibilidade nos outros armazenistas.

Depois do armazenamento, a gestão de stocks é igualmente importante. Para controlar os stocks é necessário imprimir as tabelas de stocks e confirmar as quantidades dos medicamentos, assim como comparar os stocks totais e os do robô para garantir o funcionamento ininterrupto da farmácia.

### **Utentes fidelizados e qualidade do serviço**

Uma farmácia é um local de saúde pública, mas também é uma empresa que tem despesas. Na conjuntura económica do país é um risco ser empregador, pelo que as empresas procuram formas de fidelizar os clientes. No caso da Farmácia Monteiro é oferecido um serviço de excelência e um atendimento atencioso ao utente, assim como serviços de reserva e entrega de medicamentos sem taxas. A combinação destes fatores leva a que esta seja a farmácia mais frequentada de Santa Comba Dão, e seja comum ver os mesmos utentes várias vezes por semana.

### **Preparação de medicação para os lares de idosos**

A Farmácia Monteiro tem acordos contratuais com dois lares de idosos do concelho de Santa Comba Dão: o de Lar de São Joaquinho e o da Lar da Santa Casa da Misericórdia de Santa Comba Dão. Estes acordos pressupõem a aquisição e a preparação semanal da medicação para os idosos desses lares. Tive a oportunidade de fazer esta tarefa durante o meu estágio e considero isto um ponto importantíssimo pois permitiu-me não só aprender a preparar *blisters* de medicação semanal, contabilizar dosagens e perceber posologias, mas também me invocou um enorme sentido de responsabilidade.

## EasySlim®

Outro ponto forte da farmácia é existir um acordo contratual com o programa EasySlim®. Este é um programa de ajuda no emagrecimento com ou sem os suplementos EasySlim®, existindo também a hipótese de fazer consultas de nutrição clínica tradicional. Através de uma agenda eletrónica é feita a marcação, e todas as quintas feiras a farmácia conta com a presença de uma nutricionista que oferece um atendimento personalizado aos utentes.

### Diversidade de funções

O meu estágio foi sequencial e tive a oportunidade de exercer muitas tarefas. Durante o meu estágio tive a oportunidade de:

- Rececionar encomendas, efetuar armazenamento, gerir stocks.
- Marcar, procurar e ceder produtos reservados.
- Efetuar encomendas e devoluções.
- Contatar fornecedores e cooperativas.
- Confirmar as receitas e outros documentos e organizá-los por lotes e/ou organismos.
- Organizar os documentos do arquivo.
- Presenciar várias formações.
- Fazer atendimento ao público.
- Preparar a medicação para lares de idosos.
- Regularizar notas de crédito.
- Preparar alguns medicamentos manipulados.

O facto de ter ficado no “*backoffice*” durante os primeiros dois meses de estágio, e só depois passar para o “*frontoffice*” e começar a fazer atendimento ao balcão ajudou a familiarizar-me com o Sifarma 2000®, com os nomes comerciais de muitos medicamentos, de estudar melhor os princípios ativos com mais saída e a decorar as suas indicações e contraindicações. Também considero importante e vantajoso ter sido o único estagiário durante esses meses, pois dessa maneira tive a oportunidade de realizar as mesmas tarefas mais vezes e familiarizar-me com procedimentos, conceitos e produtos.

## **Pontos Fracos**

### **Faixa etária dos utentes**

A população que frequenta a Farmácia Monteiro é na sua grande maioria idosa, visto que Santa Comba Dão é uma pequena cidade do interior com a conseqüente problemática demográfica. Isto leva a uma “automatização” do trabalho do farmacêutico, pois na maior parte das vezes o atendimento resume-se a pedir a receita e a ceder os medicamentos, já que a população mais idosa raramente se interessa pelos produtos da farmácia além da sua medicação habitual ou crónica. Nas grandes cidades é mais frequente ver população jovem que procura a farmácia não só para comprar medicamentos, mas também para encontrar produtos de pediatria, dermocosmética e veterinária.

### **Falhas no funcionamento do robô**

Como todo o processo de atendimento e de dispensa dos medicamentos está associado ao robô da farmácia, as falhas no funcionamento do mesmo são críticas. Durante o meu tempo de estágio o robô apresentou uma série de erros. Frequentemente apareciam erros relativos à disposição incorreta das embalagens nas prateleiras, que provavelmente são causados pela calibração incorreta e que obrigam a abrir o robô e a retirar todos os medicamentos dessa fila ou prateleira. Os medicamentos têm de ser retirados cuidadosamente sem tocar nas outras prateleiras, sob o risco de aparecerem posteriormente mais erros. Este procedimento demora alguns minutos e o atendimento no “*frontoffice*” fica parado durante esse tempo. Além do tempo perdido, muitas vezes as embalagens ficavam danificadas impossibilitando a sua venda.

### **Hesitação dos utentes perante um funcionário novo**

Como a Farmácia Monteiro tem uma equipa fixa que pouco muda ao longo dos anos e é raro haver estagiários, os utentes mostravam-se muitas vezes reticentes em ser atendidos por uma pessoa nova. O facto de os utentes dizerem que preferem esperar para serem atendidos por uma pessoa que já conhecem era desencorajador não por esse efeito, mas porque cada atendimento é uma oportunidade de aprender.

## **Falta de conhecimentos nas áreas de Dermocosmética e Preparações de Uso Veterinário (PUV)**

Durante o meu tempo de estágio tive várias ocasiões em que os utentes me questionavam sobre os produtos ou medicamentos relacionados com a Dermocosmética e PUV, e eu via-me obrigado a questionar os outros farmacêuticos por não saber a resposta. Na minha opinião, nos cinco anos de aprendizagem de MICEF deveria haver maior ênfase nessas áreas.

## **Preparação de manipulados**

Na Farmácia Monteiro tive poucas oportunidades de preparar medicamentos manipulados. Os medicamentos manipulados que preparei foram essencialmente suspensões de antibióticos, nos quais era necessário apenas adicionar água. No entanto apercebi-me em conversa com os trabalhadores da farmácia que a preparação de manipulados está simplesmente a entrar em desuso.

## **Oportunidades**

### **Vendas pela *Internet***

Num mundo cada vez mais digital, a compra e venda de produtos pela Internet é uma oportunidade para a Farmácia de acompanhar o progresso e fidelizar novos clientes pela diferença e facilidade de entrega dos medicamentos. Atualmente a venda pela Internet é um serviço que muitas farmácias já praticam, ainda que por vezes em plataformas rudimentares, mas que é extremamente útil para os utentes que não se podem dirigir à farmácia, ou simplesmente não querem dirigir-se à farmácia. Por ser uma farmácia com um grande número de trabalhadores, a Farmácia Monteiro tem a capacidade de praticar este serviço diariamente. Primeiramente seria necessário a criação de uma plataforma própria que estivesse associada ao Serviço Nacional de Saúde (SNS) de modo a validar as receitas, seleccionar os medicamentos pretendidos, e efetuar a compra. Criar um apoio virtual ao cliente, de modo a que o farmacêutico consiga aconselhar o utente via *webcam* ou *chat*. Os métodos de pagamento poderiam ser variados, desde Multibanco (MB) ou PayPal, até ao pagamento à cobrança. Isto exige naturalmente um investimento por parte da farmácia, mas

que na minha perspetiva é necessário, pois atualmente as compras online são cada vez mais populares.

### **Promover ações de sensibilização e educação do utente**

A Farmácia Monteiro poderia promover ações de sensibilização e educação por forma a criar uma maior ligação e laços de empatia com os utentes, assim como melhorar a qualidade de vida dos mesmos. Durante o meu tempo de estágio deparei-me com idosos que não tomavam corretamente os medicamentos, mesmo tendo a posologia escrita na caixa ou na receita. Isto é uma situação grave, pois a medicação não tomada ou tomada incorretamente pode agravar a doença, ou ainda provocar efeitos adversos graves. Promover ações de sensibilização sobre a necessidade da toma correta dos medicamentos e sobre um estilo de vida saudável são duas sugestões. O facto de a farmácia contar com a presença semanal de uma nutricionista é uma mais valia nesse aspeto.

### **Oferecer melhores preços nos MNSRM, suplementos alimentares e cosméticos**

Com o crescente consumismo na sociedade, as próprias pessoas procuram onde gastar o dinheiro. Ao aumentar a gama de produtos da farmácia, ao diversificar os serviços prestados e ao instituir uma política de preços adequada à competição e à conjuntura económica do país, a farmácia poderá sair economicamente beneficiada. Além disso, poderá ganhar a imagem de um estabelecimento com preços acessíveis e não elevados, que é transversal a todas as farmácias portuguesas. Tendo em conta que os MNSRM dão cada vez menor margem de lucro, a aposta nos MNSRM, suplementos alimentares e cosméticos pode ser sensata.

### **Ameaças**

#### **Venda de MNSRM fora das farmácias**

Há mais de uma década que a venda de MNSRM passou a ser permitida fora das farmácias, e desde então que isso ameaça a sua sustentabilidade. As grandes cadeias conseguem comprar os MNSRM, suplementos alimentares e dispositivos e acessórios em grandes quantidades pelo que recebem maiores descontos nos fornecedores e cooperativas, e conseguem ter

preços muito competitivos. Nestas situações as farmácias têm de se distinguir pela diferença e oferecer um atendimento personalizado que fidelize os clientes.

### **Esgotamento de medicamentos a nível nacional**

Durante o meu estágio passaram-me pelas mãos imensas faturas de encomendas e apercebi-me que em muitas delas havia medicamentos que estavam esgotados nos armazéns dos fornecedores. Isto é uma ameaça, pois a falta da medicação pode causar descontentamento e eventual perda dos clientes não fidelizados. Ainda que a Farmácia Monteiro geralmente tenha um *stock* de medicamentos projetado para alguns meses, alguns medicamentos ficavam temporariamente esgotados. Isto foi o caso do Concor IC 2,5mg<sup>®</sup> e do Simbrinza<sup>®</sup>, que acabaram por esgotar e os clientes da farmácia tiveram de esperar alguns dias ou semanas para os obter. Alguns medicamentos como o Victan<sup>®</sup> e Spiriva Respimat<sup>®</sup> estão geralmente rateados pelas cooperativas, o que é um fator de risco para a farmácia.

O problema do esgotamento de medicamentos é complexo e não se resume unicamente às quebras de produção ou ao excesso de procura. Muitos medicamentos fabricados em Portugal eram exportados para outros países da União Europeia, onde eram vendidos por um preço superior. Este esquema foi combatido pela impressão de um código DataMatrix nas embalagens dos medicamentos que é exigido no momento da confirmação dos produtos pelo Sifarma 2000<sup>®</sup>.

### **Alterações constantes do Preço de Venda ao Público (PVP)**

Um problema com o qual me deparei foi a constante atualização do PVP por parte dos laboratórios. Isto criava situações em que havia diferentes preços nas caixas de medicamentos iguais. Assim, ao ceder o medicamento ao utente corria-se o risco de lhe cobrar um valor indevido, ou da farmácia perder lucro. Ainda que o Sifarma 2000<sup>®</sup> possua a opção de verificação do preço praticado, tive de me manter sempre atento no momento da receção das encomendas e da cedência dos medicamentos para colocar o preço correto no sistema.



## **Homeopatia**

Apercebi-me ao fazer atendimento que muitas das pessoas que frequentam a farmácia são adeptos da homeopatia e havia muita saída de produtos como Camilia® e Stodal®. Atualmente não existem dados que comprovem a eficácia da homeopatia. Segundo uma recomendação da Ordem dos Médicos, o consumo de medicamentos homeopáticos é um risco no sentido de que os consumidores podem colocar a sua vida em risco ao escolherem os produtos homeopáticos e rejeitarem ou retardarem tratamentos para os quais há boas evidências de segurança e eficácia. Assim, sendo a farmácia um local de saúde pública e não de interesses meramente económicos, na minha visão a venda de medicamentos homeopáticos deve ser interdita nas farmácias.

## **Falta de farmacêuticos nas pequenas cidades do Centro**

Considero que uma ameaça ao funcionamento da Farmácia Monteiro, tal como qualquer farmácia desta zona, é a falta de farmacêuticos que queiram trabalhar nas pequenas cidades, vilas e aldeias. As farmácias das grandes cidades têm mais facilidade em encontrar profissionais e colmatar alguma eventual quebra de pessoal, além de que estão constantemente a receber estagiários das Faculdades de Farmácia. Por sua vez as farmácias do interior Centro sofrem constantemente com a falta de profissionais qualificados.

## **Casos Clínicos**

- ❖ Um senhor dirigiu-se à farmácia a queixar-se de que não conseguia dormir devido à congestão nasal pois estava constipado e pedia um medicamento que lhe descongestionasse o nariz durante várias horas. Questionei-o se já tomava alguma medicação, se tinha alguma alergia sazonal e se tinha febre ou dores de cabeça ou no corpo, ao que me respondeu que não. Depois de lhe apresentar a gama de descongestionantes nasais, o senhor referiu que preferia um medicamento de marca, pelo que lhe cedi Vibrocil Actilong®. Informei-lhe a posologia e alertei-o para que se a congestão nasal persistisse durante mais de cinco dias, deveria parar de fazer o spray e dirigir-se ao médico.
- ❖ Um jovem dirigiu-se à farmácia a pedir a pílula do dia seguinte, pois tinha tido uma relação sexual desprotegida há cerca de 24 horas e não queria que a parceira

engravidasse. Em conversa explicou-me que a parceira tomava a pílula contraceptiva, mas falhava constantemente na hora da toma e por vezes se esquecia. Expliquei-lhe que no caso de ela ter tomado o comprimido esquecido com um atraso inferior a 24 horas, a eficácia da pílula não estaria comprometida e não seria necessário tomar a pílula do dia seguinte. No caso de ter tido um atraso superior a 24 horas a eficácia da pílula contraceptiva estaria comprometida. Para melhor compreensão do procedimento a ter mostrei-lhe o diagrama impresso no folheto informativo. Depois de falar com a parceira ao telemóvel, o jovem optou por levar a pílula do dia seguinte (Norlevo®) pois não queriam de maneira nenhuma uma gravidez indesejada, e só dessa maneira é que conseguiam ficar totalmente descansados.

- ❖ Uma senhora dirigiu-se à farmácia a queixar-se da dificuldade que tinha em adormecer. Durante o atendimento a senhora contou que ultimamente estava constantemente sob stress por razões profissionais. A senhora também mencionou que sofria de ansiedade e tomava um ansiolítico antes de se deitar. Apercebi-me em conversa que ela achava que o ansiolítico já não lhe fazia o mesmo efeito, e procurava adicionalmente algo para tratar a ansiedade. Depois de me certificar que tomava corretamente o ansiolítico aconselhei-a a falar com o seu médico de família para um eventual aumento de dose do medicamento. Além disso apresentei-lhe a gama Valdispert® e Valdispert Noite®, por se tratar respetivamente do extrato seco de raiz de valeriana, um ansiolítico natural, e da melatonina, hormona reguladora do sono. A senhora gostou dos produtos, mas lamentou não poder levar os dois por terem um custo elevado. Propus-lhe então o Advancis Passival Sono®, um suplemento com valeriana e melatonina na mesma formulação e por um preço inferior, que acabou por levar.

## **Considerações Finais**

Sinto que este estágio foi uma experiência enriquecedora em todos os aspetos: académico, pessoal e profissional. Depois de praticamente cinco anos de curso, tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos que adquiri e fazer um atendimento personalizado, ciente da responsabilidade que em mim estava a ser depositada. Ainda que tenha tido algum receio inicial do contato direto com o utente, sempre tentei adotar uma postura séria e correta no exercício desta profissão. Fiz parte de uma equipa excepcional e direcionada ao utente que me transmitiu valores e sabedoria deste enorme ramo que é Farmácia. Apercebi-me que a farmácia comunitária não é só um local de saúde pública ou de cedência de medicamentos,

mas também um local de boa disposição, convívio e até refúgio da população mais idosa ou vulnerável. É muito gratificante ajudar e fazer parte do dia-a-dia destas pessoas. Encarei todos os dias como uma oportunidade para aprender algo de novo, ou aperfeiçoar o que já aprendi. Relativamente ao enquadramento do estágio na pandemia mundial, considero que foi uma experiência excepcional para adquirir competências num ambiente de dificuldades e desafios.

## **Parte II**

**“Problemática da ocorrência de antibióticos do meio aquático”**

## **Resumo**

Os antibióticos são fármacos insubstituíveis na área da saúde, pois permitem tratar inúmeras doenças resultantes de infecções bacterianas. Ainda que estes compostos sejam desenhados para combater microrganismos patogênicos, a sua passagem para o meio aquático pelas múltiplas vias de contaminação apresenta riscos. O objetivo desta monografia é explorar as vias de contaminação, os padrões de consumo, o percurso dos antibióticos até ao meio aquático e os respetivos riscos associados à sua ocorrência no meio aquático.

**Palavras-chave:** Contaminantes ambientais, Ocorrência, Antibióticos, Meio aquático, Toxicidade.

## **Abstract**

Antibiotics are an essential pharmacological agent in the healthcare system due to their ability to treat numerous diseases originated by bacterial infections. Even though these compounds are designed to fight pathogenic microorganisms, their leakage into the aquatic environment through multiple routes of contamination also brings with it several associated risks. The aim of this monograph is to explore the various routes of contamination, consumption patterns and pathways which result in antibiotic leakage into the aquatic environment, as well as the inherent risks underlying its occurrence in the aquatic environment.

**Keywords:** Environment contaminants, Occurrence, Antibiotics, Aquatic environment, Toxicity.

## **Lista de Abreviaturas**

**AE** – Afluente da ETAR

**ARG** – Genes de resistência aos antibióticos

**AS** – Águas de superfície

**AST** – Águas subterrâneas

**CBO** – Carência bioquímica de oxigênio

**CMI** – Concentração mínima inibitória

**CYP450** – Citocromo P-450

**DDD** – Dose(s) Diária(s) Definida(s) por 1000 pessoas por dia

**EC<sub>50</sub>** – Concentração do fármaco que induz metade da resposta máxima

**ECDC** – Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

**EE** – Efluente da ETAR

**EFSA** – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

**EMA** – Agência Europeia do Medicamento

**ETAR** – Estação de tratamento de águas residuais

**FD** – Deteção por fluorescência

**HPLC** – Cromatografia líquida de elevada eficiência

**IND** – Informação não disponível

**MS** – Espectrometria de massa

**MS/MS** – Espectrometria de massa em *tandem*

**ND** – Não detetado

**SPE** – Extração de fase sólida

**UE/EEE** – União Europeia/Espaço Económico Europeu

**UHPLC** – Cromatografia líquida de ultraelevada eficiência

**UV** – Ultravioleta

## Introdução

A revolução dos antibióticos foi um dos marcos mais importantes na história da Humanidade. A história de sucesso dos antibióticos e do antagonismo bacteriano começou com a descoberta afortunada da penicilina por Alexander Fleming, que permitiu tratar diversas patologias. O seu uso em larga escala começou na Segunda Guerra Mundial, altura em que a taxa de mortalidade dos soldados devido às infeções causadas por ferimentos era elevada (QUINN, 2013). O sucesso da penicilina impulsionou mundialmente a investigação para a descoberta de novos antibióticos. Assim começava a sua “era de ouro”, tipicamente datada dos anos 50 aos anos 70, quando se descobriram mais classes desse grupo terapêutico. Com a descoberta de novas classes, os antibióticos passaram a estar cada vez mais inseridos na prática clínica, tornando-se uma peça indispensável dos sistemas de saúde (DAVIES, 2006).

Após a absorção de um antibiótico, este pode ser metabolizado ou excretado na sua forma original, sendo geralmente eliminado na urina ou nas fezes (MONTEIRO e BOXALL, 2010). Em países desenvolvidos (MANZETTI e GHISI, 2014), esses princípios ativos são levados para os sistemas de esgotos, seguindo para a estação de tratamento de águas residuais (ETAR) (KUMMERER, 2003). Nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes não há redes de saneamento adequadas, os resíduos são depositados diretamente no meio ambiente (UNITED NATIONS, 2017). Quando usados em medicina veterinária, nomeadamente na produção animal para consumo humano ou para controlo e prevenção de doenças (MILIC *et al.*, 2012), os antibióticos excretados são espalhados nos resíduos resultantes dessa atividade e contaminam o meio aquático adjacente.

O risco da presença dos antibióticos no meio aquático está essencialmente associado a dois fatores: a indução de resistência bacteriana e a toxicidade inata dos princípios ativos pela exposição aguda ou crónica, que pode não só afetar os humanos, mas também os ecossistemas onde esses compostos estão presentes (KUMMERER, 2003).

O objetivo desta monografia é explorar as vias de contaminação, os padrões de consumo, o percurso dos antibióticos até ao meio aquático e os respetivos riscos associados à ocorrência no meio aquático. Como os antibióticos de uso humano e animal são diferentes e possuem vias de contaminação distintas, foi dada preferência à análise dos antibióticos de uso humano.

## Vias de contaminação do meio aquático

Cada vez mais, a presença de antibióticos no meio aquático é um motivo de preocupação transversal em todo o mundo (MILIC *et al.*, 2012). Existem várias vias de contaminação do meio aquático com antibióticos.

A via major de contaminação é pela descarga direta dos efluentes das ETARs (CARVALHO e SANTOS, 2016). As ETARs clássicas não foram desenhadas para remover fármacos (NDABANKULU *et al.*, 2019), o que leva a uma remoção deficiente dos mesmos. Para além disso, não existem na legislação europeia limites máximos de concentrações de fármacos para águas residuais e de superfície. No entanto, 8 fármacos integram a lista de vigilância em águas de superfície da diretiva quadro da água (PEREIRA *et al.*, 2020).

Apesar disso, não se deve assumir a excreção dos antibióticos como a única via de contaminação do meio aquático. Além da excreção na forma de urina e fezes, alguma quantidade de antibióticos pode ser rejeitada no lixo doméstico, que por sua vez acaba em aterros e infiltra-se nas águas subterrâneas (MILIC *et al.*, 2012). Em Portugal, a empresa de recolha de resíduos farmacêuticos VALORMED recolhe, segundo as estimativas, apenas cerca de 20% dos resíduos de medicamentos potencialmente gerados (VALORMED, 2019).

A aquicultura e as indústrias farmacêuticas de produção de antibióticos também contribuem para a contaminação do meio aquático pelos resíduos resultantes dessas atividades (MILIC *et al.*, 2012). No caso dos antibióticos para uso veterinário, a principal fonte destes no meio aquático são o aproveitamento do estrume e o despejo fecal, pois os antibióticos passam progressivamente através do solo para as águas subterrâneas (CARVALHO e SANTOS, 2016).

Com os atuais níveis de contaminação, os antibióticos são considerados contaminantes pseudo-persistentes (GULKOWSKA *et al.*, 2008), pois apesar de se degradarem através de processos bióticos e abióticos, a sua introdução contínua e disseminada no ambiente excede a capacidade de degradação e atenuação ambiental.



A representação esquemática das vias de contaminação pode ser observada na Figura 1.

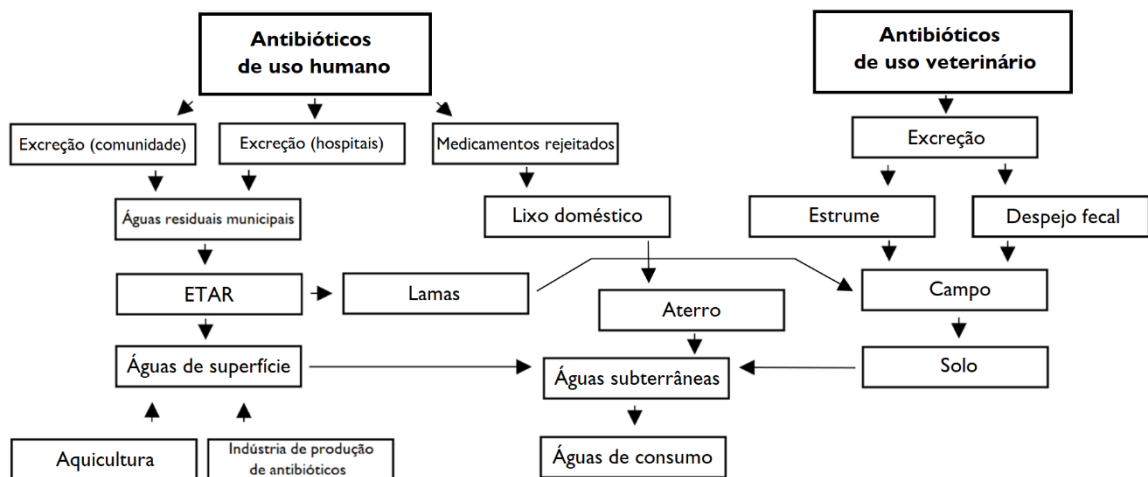


Figura 1 - Vias de contaminação do meio aquático por antibióticos de uso humano e veterinário. Adaptado de MILIC *et al.*, 2012.

## Antibióticos – prescrição e consumo

Estima-se que, a nível mundial, a quantidade de antibióticos consumida anualmente se situa entre 100 000 e 200 000 toneladas (WISE, 2002). Estima-se também que o consumo de antibióticos cresceu 36% entre 2000 e 2010, de 54 083 964 813 unidades para 73 620 748 816 unidades. Apenas cinco países - Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul – foram responsáveis por 76% desse aumento. Este aumento acarreta preocupações ambientais, nomeadamente a contaminação do meio ambiente com esses compostos (VAN BOECKEL *et al.*, 2014).

A quantidade anual de antibióticos consumidos pode ser calculada pelo número de prescrições multiplicado pela respetiva dosagem e número de comprimidos por embalagem. Ainda assim, essa quantidade virá sempre por defeito, pois há antibióticos consumidos que não são cedidos necessariamente com prescrição. O consumo total, consumo *per capita* e a proporção individual dos antibióticos usados variam muito entre países, assim como o número de prescrições e o consumo sem prescrição (MOLSTAD *et al.*, 2002). Além da variação entre os países, pode haver variações locais. Há cerca de dez anos, na Alemanha as Doses Diárias Definidas por 1000 habitantes por dia (DDD) situavam-se num intervalo de 9,6 a 17,3 entre as diferentes regiões do país (KUMMERER, 2009). A informação sobre os grupos de antibióticos específicos relativos a diferentes países está disponível em várias fontes, maioritariamente em DDD ou miligramas de antibiótico por quilograma de biomassa (mg/kg) (KUMMERER, 2009). Segundo JIACRA, um relatório conjunto da Agência Europeia

do Medicamento (EMA), Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) e da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), em 2014 foram consumidas nos 28 países da União Europeia/Espaço Económico Europeu (UE/EEE) 3 821 toneladas de substâncias ativas de antibióticos para uso humano e 8 927 toneladas para utilização em medicina veterinária. Estes valores são respetivos às biomassas totais da UE/EEE, 31 314 000 toneladas de biomassa nos humanos e 58 914 000 toneladas de biomassa nos animais. Ao fazer a divisão da quantidade de antibióticos pela biomassa humana e animal obtêm-se os valores de 122,02 mg/kg para os humanos (intervalo de 49,9-181,7 mg/kg; 118,0 mg/kg de mediana) e 151,52 mg/kg para os animais (intervalo 3,1-418,8 mg/kg; 67,1 mg/kg de mediana). Na prática, estes valores significam que a diferença de consumo relativo não é muito acentuada.

A percentagem de consumo relativo para os humanos é cerca de 80% do valor para os animais. No entanto, o maior consumo absoluto de antibióticos em medicina veterinária e tendo estes uma via de contaminação mais direta do meio ambiente, torna-os num fator muito importante da contaminação do meio aquático. Em valores absolutos a quantidade de antibióticos para uso veterinário é muito superior, mas ainda que na UE/EEE o consumo animal seja praticamente 70% do consumo total, apenas metade dos países têm o consumo animal superior ao humano. Ao observar os valores absolutos em países da UE/EEE, verifica-se que em países como Espanha, Itália e Alemanha o consumo animal excede largamente o consumo humano (Figura 2) (ECDC, EFSA e EMA, 2017).

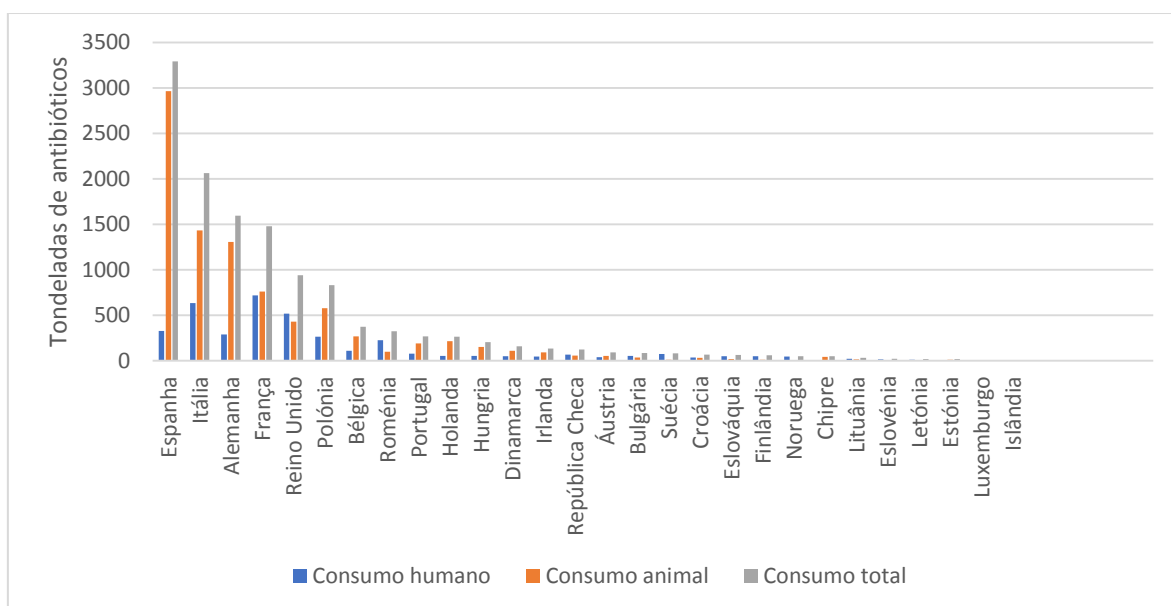


Figura 2 - Consumo de antibióticos nos países europeus, em 2014, em toneladas. Fonte: ECDC, EFSA e EMA, 2017. Relatório JIACRA.

Os diferentes países fazem a criação animal distintamente, portanto a proporção de biomassa animal relativa à total varia consideravelmente entre os países – de 42% a 87% (ECDC, EFSA e EMA, 2017). Assim, se a França é o líder europeu na criação de bovinos, a Alemanha na criação de suínos e o Reino Unido na criação de equinos (MARQUER *et al.*, 2019), a quantidade de antibióticos usados será (excluindo o uso indevido) uma variável baseada nas necessidades das espécies predominantemente criadas. Estas variáveis, assim como os diferentes valores populacionais entre os países, sugerem a necessidade de ter em conta esses dados aquando da comparação do consumo animal, humano e total. A título de exemplo, tendo sido o Reino Unido um dos líderes europeus na produção animal para consumo humano, não faz sentido comparar os valores absolutos do Reino Unido *versus* os valores absolutos da Eslováquia, já que na Eslováquia essa produção acontece em menor escala. Uma forma de comparar esses valores é usar a biomassa de cada país no denominador. Verifica-se que ainda que os valores absolutos sejam muito superiores no Reino Unido, em mg de antibiótico por kg de biomassa a Eslováquia encontra-se à frente do Reino Unido (Figura 3). Em mg/kg, a Espanha, Chipre, Itália, Portugal e a Hungria são os países com maior consumo animal de antibióticos. A Roménia, França, Itália, Irlanda e a Bélgica são os líderes no consumo humano de antibióticos (Figura 3).

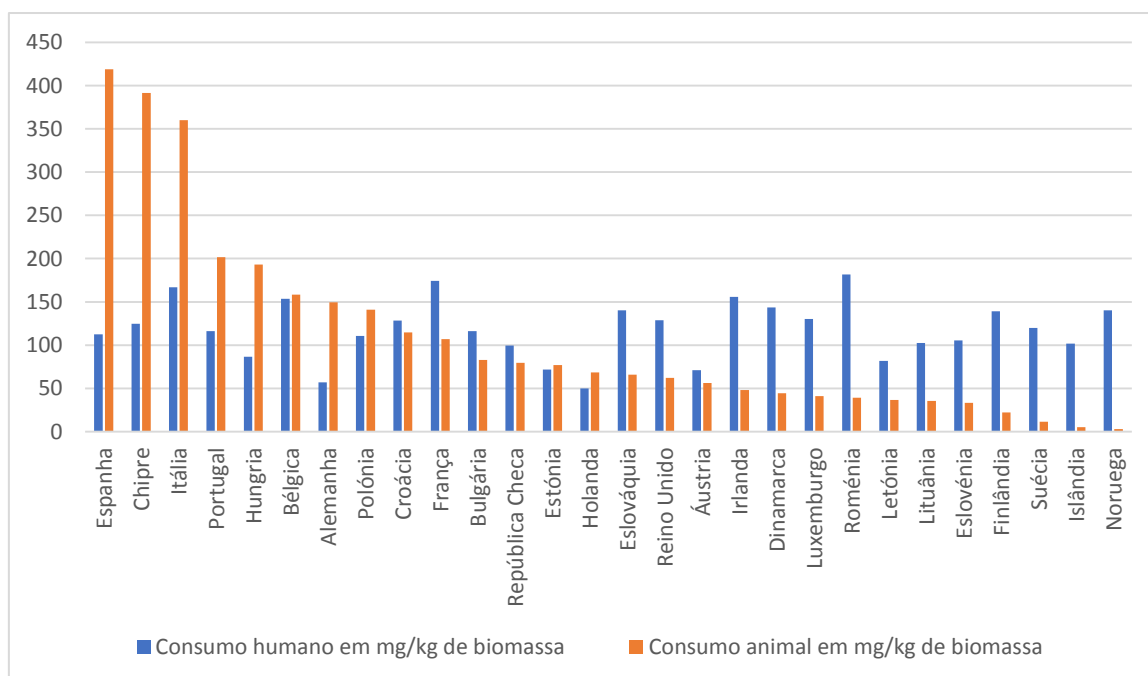


Figura 3 - Consumo de antibióticos nos países europeus, em 2014, em mg/kg de biomassa, ordenados por ordem decrescente de consumo animal. Fonte: ECDC, EFSA e EMA, 2017. Relatório JIACRA.

Em medicina veterinária, ainda que a legislação europeia proíba o uso de antibióticos como promotores de crescimento, o uso preventivo de alguns antibióticos como os coccidiostáticos e histomonostáticos como suplementos na alimentação não foi banido apesar das propostas restritivas da Comissão Europeia (CARVALHO e SANTOS, 2016).

Segundo o relatório JIACRA, em Portugal o consumo humano de antibióticos foi de 116,6 mg/kg (inferior à média europeia de 122,02 mg/kg), e nos animais de 201,7 mg/kg (superior à média europeia de 151,52 mg/kg de biomassa) (ECDC, EFSA e EMA, 2017). O valor elevado nos animais é preocupante não só por se tratar de contaminantes ambientais, mas também por serem posteriormente detetadas quantidades residuais de antibióticos na carne, com o risco de toxicidade daí inerentes. Como exemplo, no estudo de PENA *et al.*, (2010) foram detetadas 114,2 µg de fluoroquinolonas por quilograma de carne de frango, e 87,6 µg de fluoroquinolonas por quilograma de carne de peru.

Relativamente às preferências na prescrição e consumo das diferentes classes de antibióticos no Homem em Portugal, na comunidade são consumidas preferencialmente as penicilinas, seguindo-se o grupo dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas, e posteriormente as cefalosporinas. Em ambiente hospitalar, os antibióticos preferencialmente usados são as penicilinas seguidas de cefalosporinas e dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas. Ao conjugar esses valores, determina-se que os antibióticos mais usados são as penicilinas com 9,71 DDD, seguindo-se os macrólidos, lincosamidas e estreptograminas com 2,84 DDD, e as cefalosporinas com 2,01 DDD (ECDC, EFSA e EMA, 2017). Ao contrário do esperado, verifica-se que os hospitais não detêm uma grande percentagem de consumo de antibióticos. Segundo JIACRA, em Portugal apenas 8,1% do total dos antibióticos consumidos são em ambiente hospitalar. Este valor está dentro dos valores que KUMMERER (2003) estima para a Europa, com o consumo em ambiente hospitalar a rondar apenas 5 a 20% do consumo total. O problema major é, tal como visto anteriormente, o consumo em ambulatório e em medicina veterinária.

## Metabolismo e farmacocinética

Os antibióticos são metabolizados e excretados isoladamente ou numa mistura do composto primário e dos seus metabolitos, maioritariamente na urina e/ou fezes. Esta excreção ocorre por meio de dois vários mecanismos de metabolização de Fase I e Fase II (Figura 4).

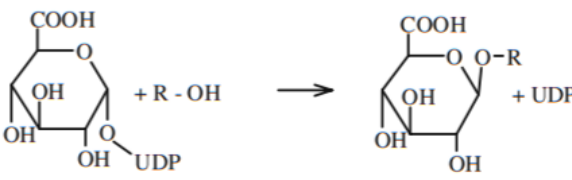
Fase I	Reação
<b>1. Reações oxidativas</b>	
<i>N-Desalquilação</i>	$\text{RNHCH}_3 \rightarrow \text{RNH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$
<i>Hidroxilação alifática</i>	$\text{RCH}_2\text{CH}_3 \rightarrow \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{RCHCH}_3 \end{array}$
<i>N-Oxidação</i>	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagdown \\ \text{NH} \\ \diagup \\ \text{R}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \diagdown \\ \text{N-OH} \\ \diagup \\ \text{R}_2 \end{array}$
<i>Desaminação</i>	$\begin{array}{c} \text{RCHCH}_3 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{R}-\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array} + \text{NH}_2$
<b>2. Reações de hidrólise</b>	
	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R}_1\text{COR}_2 \end{array} \rightarrow \text{R}_1\text{COOH} + \text{R}_2\text{OH}$
	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R}_1\text{CNR}_2 \end{array} \rightarrow \text{R}_1\text{COOH} + \text{R}_2\text{NH}_2$
<b>Fase II</b>	
<b>3. Reações de conjugação</b>	
<i>Glucoronação</i>	
	UDP - glucuronic acid
<i>Sulfatação</i>	$\text{ROH} + \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS)} \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R-O-S-OH} \\    \\ \text{O} \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{3'-phosphoadenosine-5'-phosphate} \end{array}$

Figura 4 - Reações de metabolização de Fase I e II. Adaptado de MONTEIRO e BOXALL, 2010.

A Fase I utiliza a eliminação hepática por meio de hidrólises e oxidações e reduções bioquímicas que aumentam a polaridade e a solubilidade dos metabolitos. A Fase II envolve reações bioquímicas de conjugação (i.e., glucoronação e sulfatação) onde os grupos polares são transferidos para os compostos primários ou os seus metabolitos (PEREIRA *et al.*, 2020).

A via de metabolização mais comum é representada pelo Citocromo P-450 (CYP450) (BERTAULT-PERES *et al.*, 1987; THOMAS, 2007). Este atua nas substâncias exógenas ao organismo e executa a conversão catalítica desses compostos tóxicos em formas mais hidrofílicas e suficientemente solúveis para serem posteriormente excretados na urina, fezes e/ou suor (CHAHINE e O'DONNELL, 2011; STIBOROVÁ *et al.*, 2012; PALMA *et al.*, 2013). Normalmente a ocorrência destes processos significa a perda da atividade terapêutica do composto, porém há fármacos que apenas se tornam ativos quando ocorre a sua metabolização (pró-fármacos) (PEREIRA *et al.*, 2020).

O destino metabólico dos antibióticos depende das suas propriedades químicas, grupos funcionais e dos átomos reativos nas suas estruturas. Diferentes antibióticos podem ser metabolizados de diversas maneiras pelo organismo e preceder a diferentes metabolitos (MANZETTI e GHISI, 2014). GARCÍA-GALÁN *et al.* (2008) identificou dez diferentes metabolitos de sulfonamidas na urina, todos derivados do mesmo antibiótico. Chegou-se à conclusão que a hidroxilação do grupo central amina, a conjugação ao ácido glucorónico do grupo amida e também a acetilação do grupo amina eram processos presentes no metabolismo das sulfonamidas (GARCÍA-GALÁN *et al.*, 2008).

Para perceber o impacto destes compostos no meio aquático é importante analisar os mecanismos de metabolização e farmacocinética, calculando a taxa de metabolização e excreção desses princípios ativos. Quanto maior a percentagem excretada na sua forma inalterada maior o seu impacto no meio aquático (HIRSCH *et al.*, 1999). Uma parte significativa da substância original, geralmente 50-80%, pode sair do organismo pela urina ou fezes na forma inalterada (ZUPANC *et al.*, 2013). As maiores taxas de excreção na forma inalterada são detetadas para a ciprofloxacina (50 a 80%) e a tetraciclina (80 a 90%); as menores são observadas na eritromicina (5 a 10%), sulfametoxazol (15 a 30%) e na claritromicina (25%) (DANNER *et al.*, 2019).

## Tratamento das águas residuais

As águas residuais são a via principal de entrada dos antibióticos para o ambiente em regiões urbanas e metropolitanas, e a descontaminação dessas águas é fundamental para que a contaminação ambiental seja minimizada (LI *et al.*, 2013). Apesar da acumulação de antibióticos no ambiente estar relacionada com as descargas da indústria farmacêutica, hospitais e centros médicos, a contribuição total destas atividades é geralmente baixa (KUMMERER *et al.*, 2000; KARTHIKEYAN e MEYER, 2006; PEREIRA *et al.*, 2020). As águas residuais resultantes da atividade veterinária geralmente não passam pelo tratamento nas ETARs e têm um percurso diferente das águas residuais humanas (PEREIRA *et al.*, 2020).

A descontaminação insuficiente das águas residuais (KUMMERER *et al.*, 2000; BATT *et al.*, 2006) e a dificuldade de remoção dos antibióticos (BATT *et al.*, 2006) são atualmente temas de grande importância (MANZETTI e GHISI, 2014). Uma ETAR pode integrar quatro fases de tratamento: tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. No tratamento preliminar as águas residuais chegam à ETAR onde são filtrados e separados os resíduos de maior dimensão (ÁGUAS DO NORTE). O tratamento primário envolve processos físicos de remoção de sólidos, óleo, gordura e matéria orgânica e serve para preparar as águas residuais para os subsequentes tratamentos. O tratamento secundário envolve uma unidade de processamento biológico, que por vezes é combinada com aditivos químicos para remover a matéria orgânica biodegradável e os sólidos em suspensão. Os sistemas de tratamento com lamas ativadas são frequentemente usados no tratamento secundário. O tratamento ocorre via oxidação microbiana dos compostos e é versátil no sentido de englobar a decomposição biológica, adsorção de sólidos suspensos e a incorporação em aglomerados microbianos (BURCH *et al.*, 2019). Os processos posteriores são denominados terciários ou de tratamento avançado (QUACH-CU *et al.*, 2018). O tratamento terciário pode envolver uma combinação de processos e remover os sólidos suspensos residuais, alterar a carência bioquímica de oxigénio (CBO), ou ainda desinfetar os efluentes antes da sua descarga. Uma combinação destes processos poderá ser, a título de exemplo, a filtração com antracite, areia ou gravilha e a desinfecção por cloração, irradiação UV e a ozonação (BURCH *et al.*, 2019). O tratamento terciário nem sempre está presente nas ETARs, (BURCH *et al.*, 2019).

Na Figura 5 está representada uma ETAR convencional na qual é efetuado o tratamento preliminar, primário e secundário.

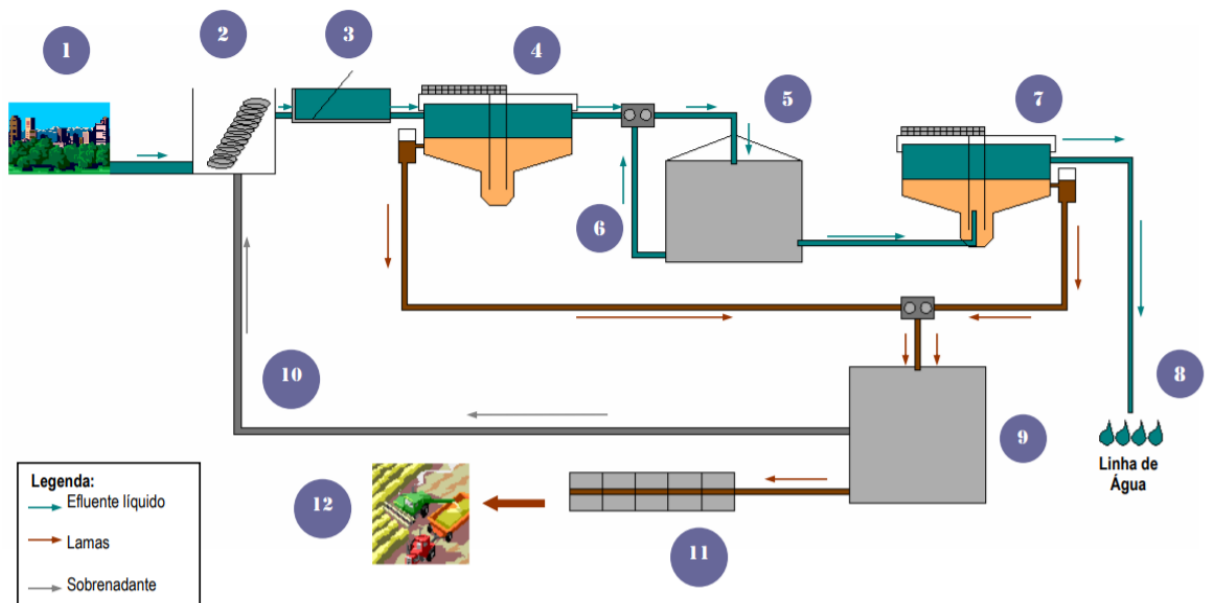


Figura 5 - Esquema de Funcionamento de uma ETAR convencional (Mealhada). Fonte: [http://www.cm-mealhada.pt/ficheiros/areas/ambiente/etar/amb\\_visetar\\_func.pdf](http://www.cm-mealhada.pt/ficheiros/areas/ambiente/etar/amb_visetar_func.pdf) (acedido em 02/07/2020).

O seu funcionamento é sequencial:

A. Tratamento preliminar:

1. Primeiramente as redes de drenagem recolhem as águas residuais (esgotos) e encaminham-nas até à ETAR;
2. O parafuso de Arquimedes eleva a água que chega à ETAR para o local de entrada;
3. As águas passam através de grelhas que retiram os resíduos sólidos como papeis e plásticos num processo designado por gradagem;

B. Tratamento primário:

4. Nos decantadores primários, os sólidos sedimentáveis são separados por ação da gravidade e enviados para os digestores;

C. Tratamento secundário:

5. Nos leitos percoladores estão presentes microrganismos aeróbios que se alimentam da matéria orgânica;
6. Ocorre a recirculação que aumenta a eficiência de remoção da matéria orgânica nos leitos percoladores;
7. Nos decantadores secundários, os microrganismos aeróbios e as partículas em suspensão são separadas das águas tratadas e encaminhadas para os digestores;



8. A água que satisfaça um determinado grau de pureza é reaproveitada ou despejada no meio ambiente;
9. Nos digestores anaeróbios as lamas são estabilizadas por ação das bactérias que degradam a matéria orgânica;
10. No processo de digestão há a formação do sobrenadante que regressa ao início do tratamento;
11. Na desidratação, as lamas são depositadas em leitos de secagem para reduzir o seu volume e teor de humidade e as águas resultantes são encaminhadas para o início do tratamento;
12. No final, as lamas que resultam deste processo são usadas como fertilizante.

A eliminação dos antibióticos nas ETARs é incompleta (PEREIRA *et al.*, 2015), e difere dependendo da ETAR (condições ambientais e das propriedades físicas e químicas do antibiótico) (LI *et al.*, 2016; ROBERTS *et al.*, 2015). Em média, se totalizarmos a quantidade de todos os antibióticos consumidos, a taxa de metabolização será de aproximadamente 30%, o que significa que 70% da massa de antibióticos vai ser excretada inalterada e chegar às ETARs (DANNER *et al.*, 2019; KUMMERER, 2003).

Na perspetiva de aumentar a qualidade da água que contenha quantidades subterapêuticas de antibióticos foram desenvolvidas estratégias para o seu tratamento (SANGAYADO e GWENZI, 2019). Segundo CUERDA-CORREA *et al.* (2019), uma estratégia promissora é a irradiação por raios ultravioleta (UV) denominada fotólise. Este método consiste na absorção da radiação UV (fotões) pelas moléculas poluentes presentes na água. Os eletrões dessas moléculas passam para o estado excitado e formam radicais livres, que por sua vez passam por uma série de reações químicas. No final dessas reações químicas as moléculas complexas dos poluentes são transformadas em fragmentos mais simples. A fotólise usa a radiação UV por esta possuir uma maior energia dos fotões, como indicado na equação de Planck:

$$E_{\lambda} = hc/\lambda$$

O tratamento das águas residuais com este método pode eliminar aproximadamente 80% de fluoroquinolonas e tetraciclina sujeitas à fotodegradação (BAQUERO *et al.*, 2008). No caso específico da enrofloxacin e dependendo da estação do ano e da latitude, o tempo de semivida ambiental é de 1,8-55,4 horas. Em condições laboratoriais, quando irradiada uma fonte constante de luz UV sobre a água com enrofloxacin, conseguiu-se determinar que o tempo de semivida eram apenas 36 minutos (SUKUL e SPITELLER, 2007). Segundo

PALMISANO *et al.* (2015), a fotodegradação reduz a concentração do princípio ativo e consequentemente a sua toxicidade.

Outra estratégia para a remoção de antibióticos da água é a fotocatalise heterogénea. A fotocatalise define-se como a aceleração de uma reação fotoquímica na presença de um semicondutor que é ativado por absorção de radiação com energia acima do seu “bandgap”. É um método que demonstrou ter uma grande capacidade de remoção dos antibióticos em condições laboratoriais. O termo “heterogénea” refere-se ao facto dos contaminantes estarem presentes na fase líquida, enquanto que o catalisador está na fase sólida. A literatura existente reporta o uso de óxido de zinco (ZnO), dióxido de cério (CeO<sub>2</sub>), sulfeto de cádmio (CdS) e sulfeto de zinco (ZnS) como catalisadores semicondutores, mas o mais promissor é o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) dada a sua estabilidade química, preço relativamente baixo, e excelentes resultados (PALMISANO *et al.*, 2015).

No estudo de PALMISANO *et al.* (2015) foram determinadas as percentagens de degradação de quatro antibióticos: amoxicilina, estreptomicina, eritromicina e da ciprofloxacina depois de submetidos à fotodegradação via fotólise e fotocatalise. Foram observados valores de degradação superiores na fotocatalise, com uma diferença acentuada para a amoxicilina e estreptomicina. Isto sugere uma maior eficiência da fotocatalise quando comparada à fotólise (PALMISANO *et al.*, 2015). Os dados mais relevantes dos ensaios para esses quatro princípios ativos estão demonstrados na Figura 6.

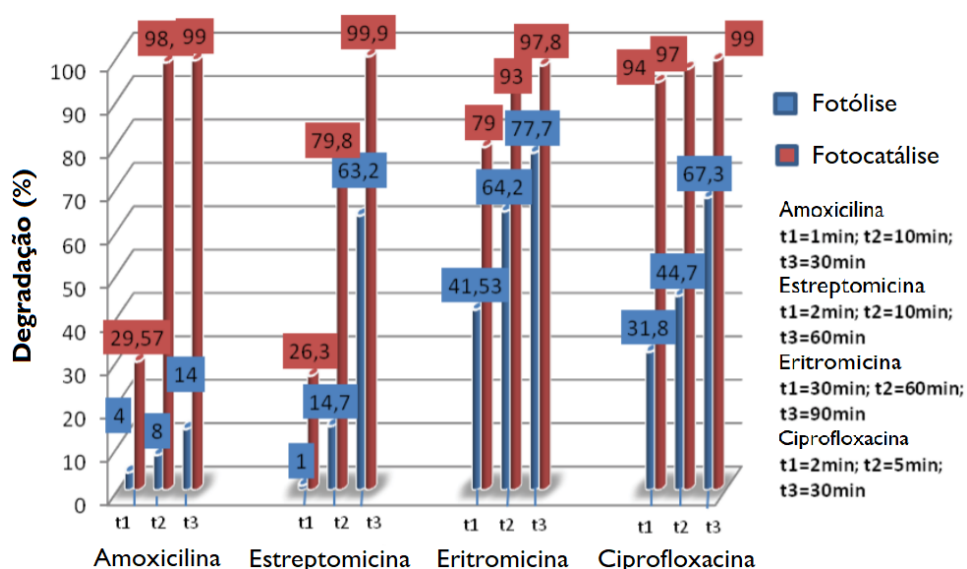


Figura 6 - Percentagens de degradação dos antibióticos amoxicilina, estreptomicina, eritromicina e ciprofloxacina na fotólise e fotocatalise. Adaptado de PALMISANO *et al.*, 2015.

Atualmente, a fotocatalise heterogênea não é um método usado em larga escala pois possui duas desvantagens: em condições não laboratoriais é difícil fazer incidir uniformemente a radiação sobre toda a superfície do catalisador e também porque é necessário um tratamento posterior para remover o catalisador da água, o que torna o processo menos rentável (CUERDA-CORREA *et al.*, 2019). Além dessas desvantagens, o uso do dióxido de titânio acarreta algumas preocupações ecológicas por este poder contaminar o meio ambiente.

Alguns estudos toxicológicos demonstraram que as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> causam efeitos adversos predominantemente por indução de *stress* oxidativo (SKOCAJ *et al.*, 2011). O dióxido de titânio foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencente ao grupo 2B, um possível cancerígeno para os humanos (IARC, 2010).

A cloração da água é outro processo utilizado. Após a injeção na água residual, o cloro gasoso é convertido em espécies oxidativas de ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso reage com as moléculas orgânicas por processos oxidativos e a sua eficiência em oxidar contaminantes orgânicos depende da sua estrutura química (BURCH *et al.*, 2019). A remoção dos antibióticos está dependente da concentração de cloro livre, pois não foi observada remoção significativa de antibióticos para valores de cloro livre inferiores a 0,75 mg/L. Por sua vez, a concentração do cloro livre está intimamente relacionada com a concentração de amônia. Esta compete com os antibióticos pelo cloro livre ao formar produtos de reação que reagem muito lentamente com os antibióticos. Assim, a eficiência do processo da cloração está dependente de alguns parâmetros da água, nomeadamente da concentração de amônia, matéria orgânica dissolvida e pH (LI e ZHANG, 2013). A desinfecção por radiação UV é muitas vezes preferida à cloração, pois há menor formação de produtos potencialmente tóxicos (SHARMA *et al.*, 2016).

A eficiência de remoção dos antibióticos pelas ETARs pode ser afetada por diversos fatores, nomeadamente a dimensão da ETAR e os seus parâmetros de funcionamento, a quantidade de desinfetante usado, as características dos antibióticos tendo em conta os padrões de consumo regionais e as flutuações sazonais do consumo (BURCH *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2015). BURTON *et al.* (2014) afirma que a dimensão da ETAR determina os tempos de retenção dos sólidos e desempenha um papel crítico nos processos físicos e bioquímicos, pelo que teoricamente afeta a eficiência de remoção dos antibióticos. As concentrações dos antibióticos variam consideravelmente em função dos padrões de consumo, densidade populacional (PEREIRA *et al.*, 2015) e processos de remoção (BURCH *et al.*, 2019). MIAO *et al.* (2004) sugeriu que os padrões de prescrição, que variam consideravelmente entre as

diferentes regiões, são relevantes para estudar os processos de remoção. Mesmo quando os parâmetros de funcionamento da ETAR foram mantidos constantes em situações de pequeno e grande fluxo, ROBERTS *et al.* (2016) observou grandes variações nas eficiências de remoção. Isto indica que há outros fatores que afetaram a eficiência e que os parâmetros de funcionamento das ETARs são variáveis complexas. O valor da eficiência poderá também estar incorreto devido à deficiente colheita de amostras para análise. A água colhida após o tratamento terciário representa a água que passou por processos de tratamento secundários, pelo que poderão não ser diretamente comparáveis (BURCH *et al.*, 2019). Foram realizados vários estudos nos quais se determinou a percentagem de remoção de determinados antibióticos após os processos secundário e terciário. Em todos os casos a percentagem de remoção de ETARs com tratamento terciário foi superior, ainda que em alguns casos a diferença não tenha sido significativa. Isto sugere a necessidade da avaliação destes métodos tendo em conta a relação eficiência/custo. Estes dados podem ser observados na Tabela I.

Tabela I - Comparação das percentagens de remoção após o tratamento secundário e terciário. Adaptado de BURCH *et al.* 2019.

Antibiótico	Remoção secundária (%)	Remoção terciária (%)	Processo terciário	Referência
Ciprofloxacina	NA	48	UV, apenas terciário	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 2012
	55	66	Cloração	LI e ZHANG, 2011
	78	83	Filtração com areia	GOLET <i>et al.</i> , 2003
	84	88	Filtração com areia	GIGER <i>et al.</i> , 2003
	84	88	Filtração com areia	GOLET <i>et al.</i> , 2003
Eritromicina	26	43	Cloração	LI e ZHANG, 2011
Norfloxacina	45	50	Cloração	LI e ZHANG, 2011
	89	92	Filtração com areia	GOLET <i>et al.</i> , 2003
Ofloxacina	NA	65	UV, apenas terciário	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 2012
	NA	~100	UV	KIM <i>et al.</i> , 2009
	84,9	87	Filtração com areia	PENG <i>et al.</i> , 2006
Sulfametoxazol	NA	51	UV, apenas terciário	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 2012
	NA	~100	UV	KIM <i>et al.</i> , 2009
	62	73	Cloração	LI e ZHANG, 2011
	63	87	Filtração com areia	ALAJMI, 2014
Tetraciclina	36	39	Cloração	LI e ZHANG, 2011
Trimetoprim	NA	7	UV, apenas terciário	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 2012
	NA	~100	UV	KIM <i>et al.</i> , 2009
	42	65	Cloração	LI e ZHANG, 2011
	83	90	Filtração com areia	ALAJMI, 2014

## Metodologias analíticas para a deteção e quantificação dos antibióticos

A deteção e quantificação dos antibióticos no meio aquático é um desafio analítico devido às suas reduzidas concentrações, diferentes propriedades físico-químicas e matrizes complexas. Atualmente as metodologias analíticas mais comuns e eficientes detetam concentrações que variam dos  $\mu\text{g/L}$  aos  $\text{ng/L}$ . Os métodos de extração podem incluir extração de fase sólida (SPE) da matriz aquática (SAMANIDOU *et al.*, 2007), seguidos de separação por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) ou a cromatografia líquida de ultraelevada eficiência (UHPLC) acopladas a um detetor de espetrometria de massa (MS) ou espetrometria de massa em *tandem* (MS/MS) (MILIC *et al.*, 2012). Podem ainda ser acopladas a detetores de radiação ultravioleta (UV), díodos ou fluorescência (FD) (SAMANIDOU *et al.*, 2007).

É comum os antibióticos possuírem um núcleo apolar e grupos funcionais polares e sofrerem dissociação ou protonação dependendo do pH do meio. Há, portanto, condicionantes na deteção dos antibióticos. As fases móveis muito polares e muito apolares podem causar uma separação incompleta dos antibióticos e apresentam um problema analítico significativo (JUHEL-GAUGAIN *et al.*, 2000). Diversos compostos orgânicos também podem interferir significativamente com os resultados da análise (MILIC *et al.*, 2012). Os métodos imunoquímicos, a voltametria, a deteção amperométrica e a cromatografia de camada fina podem ser usados para monitorizar os antibióticos em concentrações mais elevadas (ppb), mas apenas em biomatrizes (ossos, leite, carne, sangue, etc.) e não em amostras de água (MILIC *et al.*, 2012). Os métodos SPE-HPLC-MS/MS e SPE-UHPLC-MS/MS são os mais usados para detetar antibióticos e os seus derivados no meio aquático (BUCHBERGER, 2007).

## Ocorrência

Para avaliar a ocorrência de antibióticos nas diferentes matrizes do meio aquático em Portugal, foram compilados dados de diferentes estudos. Na Tabela 2, adaptada de PEREIRA *et al.* (2020), estão representados esses dados referentes a quatro antibióticos: azitromicina, ciprofloxacina, claritromicina e eritromicina.

A quantificação desses antibióticos em quatro matrizes aquáticas diferentes permite obter diversas informações. Ao comparar as concentrações nos afluentes das ETARs (AE) *versus* EE pode determinar-se a eficácia das ETARs na remoção deste tipo de compostos. Por sua vez, a análise das concentrações em termos absolutos nos EE, nas águas de superfície (AS) e

nas águas subterrâneas (AST) permite estimar o impacto que estes compostos poderão ter no ecossistema, comparando a sua concentração com os valores de toxicidade para os diferentes seres vivos desse ecossistema. Além disso, estes valores podem ser úteis para estimar as concentrações de antibióticos que chegam às águas de consumo.

Em todos os estudos representados foi usada a extração de fase sólida (SPE), exceto no estudo de REIS-SANTOS *et al.* (2018). Em todos os estudos foram usadas HPLC ou UHPLC acopladas à MS ou MS/MS, exceto no estudo de SEIFRTOVA *et al.* (2008), onde foi usada detecção por fluorescência. Há um decréscimo nas concentrações de afluente para efluente e águas de superfície na maioria dos estudos. Dos antibióticos estudados, a azitromicina é aquela que apresenta valores médios mais elevados (266,32 ng/L nos afluentes, 427 ng/L nos efluentes e 84,55 ng/L nas águas de superfície), seguido da ciprofloxacina (212,5 ng/L nos afluentes, 149,55 ng/L nos efluentes e 50,63 ng/L nas águas de superfície), eritromicina (92,7 ng/L nos afluentes, 71,2 ng/L nos efluentes e 35,5 ng/L nas águas de superfície) e claritromicina (22,93 ng/L nos afluentes, 18,1 ng/L nos efluentes e 33,1 ng/L nas águas de superfície). Contrariando a expectativa, alguns estudos reportaram um aumento da concentração dos antibióticos nos EE e até nas AS relativamente aos AE. Para a maioria das situações houve uma redução nas concentrações e o aumento é uma exceção. Uma das explicações para este fenómeno é que os fármacos são excretados nas formas conjugadas que poderão ser clivadas por enzimas durante o processo de tratamento das águas residuais, convertendo-os de volta à forma original (PAIGA *et al.*, 2016). Relativamente às águas residuais e segundo SOUSA *et al.* (2011), a concentração média de azitromicina aumentou para 114,9% do valor inicial. Segundo SANTOS *et al.* (2013), a concentração média da azitromicina passou para 91,9% do valor inicial, da ciprofloxacina para 166,9% do valor inicial, da claritromicina para 100,9% do valor inicial e da eritromicina para 76,8% do valor inicial. Segundo PAIGA *et al.* (2016), a concentração média de ciprofloxacina passou para 37,2% do valor inicial e da claritromicina para 74,7% do valor inicial. Segundo SEIFRTOVA *et al.* (2008), a concentração média de ciprofloxacina passou para 36,0% do valor inicial. FERNANDES *et al.* (2020) reportou concentrações de antibióticos nos EE de 2819 ng/L para a azitromicina, 339 ng/L para a ciprofloxacina e 269 ng/L para a claritromicina. Nas águas de superfície, as concentrações médias reportadas segundo PEREIRA *et al.* (2017) foram de 33,9 ng/L para a azitromicina, 33,1 ng/L para a claritromicina e 35,5 ng/L para a eritromicina. GONÇALVES *et al.* (2013) reportou concentrações médias de 135,2 ng/L para a azitromicina e 59,3 ng/L para a ciprofloxacina. PAIGA *et al.* (2016) reportou concentrações máximas de 29,6 ng/L para a azitromicina, 88,7 ng/L para a ciprofloxacina e 26,8 ng/L para a claritromicina.

Tabela 2 - Tabela de ocorrência de azitromicina, ciprofloxacina, claritromicina e eritromicina. Dados referentes a Portugal. Adaptado de PEREIRA et al., 2020.

Antibiótico	Matriz	Nº de amostras	Método	LOD/LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	Frequência (%)	Máximo (ng L <sup>-1</sup> )	Média (ng L <sup>-1</sup> )	Referência
AZITROMICINA	AE	2	SPE-LC-MS/MS	2/6	100	617	594	SOUSA et al., 2011
	AE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	100	295	186	SANTOS et al., 2013
	AE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	0,06/0,18	16,7	67	18,95	PAIGA et al., 2016
	AE	48	SPE-LC-MS	3/11	17	210	IND	SALGADO et al., 2011
	EE	2	SPE-LC-MS/MS	2/5	100	836	683	SOUSA et al., 2011
	EE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	100	297	171	SANTOS et al., 2013
	EE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	0,16/0,50	66,7	21,5	IND	PAIGA et al., 2016
	EE	6	SPE-UHPLC-MS/MS	4/13,3	33,3	2819	IND	FERNANDES et al., 2020
	AS	12	SPE-LC-MS/MS	4/13	33	163	135,2	GONÇALVES et al., 2013
	AS	31	UHPLC-TOF-MS	IND/IND	9,7	IND	IND	REIS-SANTOS et al., 2018
	AS	55	SPE-UHPLC-MS/MS	0,04/0,10	18,2	29,6	IND	PAIGA et al., 2016
	AS	72	SPE-LC-MS/MS	6,8/20,7	2,8	35,7	33,9	PEREIRA et al., 2017
CIPROFLOXACINA	AE	2	SPE-LC-FD	17/IND	100	418,8	433	SEIFRTOVA et al., 2008
	AE	2	SPE-LC-MS/MS	2/6	0	ND	ND	SOUSA et al., 2011
	AE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	100	330	221	SANTOS et al., 2013
	AE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	28,1/84,2	38,9	251	196	PAIGA et al., 2016
	AE	48	SPE-LC-MS	1/3	10	15397	IND	SALGADO et al., 2011
	EE	2	SPE-LC-FD	17/IND	100	100,8	156,2	SEIFRTOVA et al., 2008

EE	2	SPE-LC-MS/MS	1/4	0	ND	ND	SOUZA et al., 2011
EE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	100	1396	369	SANTOS et al., 2013
EE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	20,2/61,2	27,8	179	73	PAIGA et al., 2016
EE	6	SPE-UHPLC-MS/MS	41,1/137	16,7	339	IND	FERNANDES et al., 2020
AS	22	SPE-LC-FD	IND/25	36	119,2	IND	PENA et al., 2007
AS	12	SPE-LC-MS/MS	10/33	8	59,3	59,3	GONÇALVES et al., 2013
AS	55	SPE-UHPLC-MS/MS	1,20/3,64	1,82	88,7	88,7	PAIGA et al., 2016
AS	31	UHPLC-TOF-MS	IND/IND	29,0	7,1	3,9	REIS-SANTOS et al., 2018
AE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	IND	52,3	22,2	SANTOS et al., 2013
AE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	0,06/0,20	16,7	48,2	24,2	PAIGA et al., 2016
AE	7	SPE-LC-MS/MS	IND	100	40,0	22,4	SANTOS et al., 2013
EE	18	SPE-UHPLC-MS/MS	0,08/0,22	44,4	70,4	18,1	PAIGA et al., 2016
EE	6	SPE-UHPLC-MS/MS	0,075/0,225	33,3	269	IND	FERNANDES et al., 2020
AS	IND	SPE-UHPLC-MS/MS	IND/IND	IND	32	IND	GAFFNEY et al., 2015
AS	55	SPE-UHPLC-MS/MS	0,08/0,25	12,7	26,8	IND	PAIGA et al., 2016
AS	72	SPE-LC-MS/MS	6,4/19,5	20,8	39,1	33,1	PEREIRA et al., 2017
AST	IND	SPE-UHPLC-MS/MS	IND/IND	IND	3	IND	GAFFNEY et al., 2015
AE	7	SPE-LC-MS/MS	IND/IND	100	220	92,7	SANTOS et al., 2013
EE	7	SPE-LC-MS/MS	IND/IND	100	134	71,2	SANTOS et al., 2013
AS	72	SPE-LC-MS/MS	6,6/19,9	4,2	38,8	35,5	PEREIRA et al., 2017

#### CLARITROMICINA

#### ERITROMICINA

**Legenda:** LOD: limite de deteção; LOQ: limite de quantificação; AE: afluentes das ETARs; EE: efluentes das ETARs; AS: águas de superfície; AST: águas subterrâneas; IND: indisponível; ND: não detetado.



## Toxicidade dos antibióticos no meio aquático

A presença de antibióticos no meio aquático é um risco ecológico. Este risco não está apenas associado à sua toxicidade inata e à capacidade de indução de resistências bacterianas, mas também está associado à genotoxicidade e à capacidade de induzir alterações endócrinas (CUERDA-CORREA *et al.*, 2019). A resistência bacteriana é definida como a capacidade dos microrganismos de resistir aos efeitos dos antibióticos e resulta na ineficácia do tratamento farmacológico das infecções bacterianas, o que por sua vez aumenta os níveis de morbidade e mortalidade dos doentes afetados. As bactérias são caracterizadas por uma grande plasticidade genética que lhes permite adaptar-se a diferentes moléculas de antibióticos (SANSEVERINO *et al.*, 2018). Esta estratégia pode ser mediada pela incorporação de genes de resistência aos antibióticos (ARG) de outras bactérias, ou pela ocorrência espontânea de mecanismos de resistência (SANSEVERINO *et al.*, 2018). A ocorrência espontânea de mutações em alguns genes durante a replicação pode fazer com que o gene de resistência seja transferido para as subseqüentes gerações, o que origina colônias de bactérias resistentes (transmissão vertical). É mais frequente ocorrer a transmissão dos genes de resistência (transmissão horizontal) das estirpes bacterianas que apresentam resistência intrínseca (natural), ou que adquiriram a resistência anteriormente. Esta transmissão de genes de resistência pode ocorrer por três mecanismos distintos: transformação (incorporação do DNA livre do meio ambiente), transdução (transferência do DNA de um vírus para uma bactéria) e conjugação (transferência do DNA por contato direto entre bactérias) (SANSEVERINO *et al.*, 2018). Estes mecanismos estão ilustrados na Figura 7.

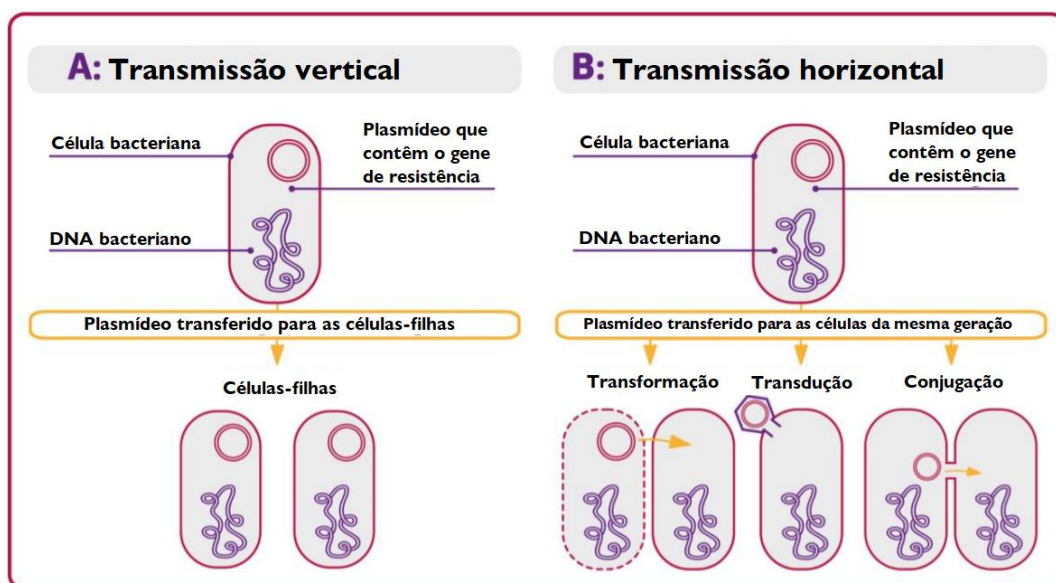


Figura 7 - Transmissão vertical e transmissão horizontal dos genes de resistência. Adaptado de SANSEVERINO *et al.*, 2018.

Foram realizados vários estudos que analisaram a ocorrência de mutações genéticas que conferiam a resistência aos antibióticos para as concentrações acima da concentração mínima inibitória (CMI) do antibiótico. Por outro lado, são escassos os estudos que fazem essa análise para as concentrações abaixo da CMI (WISTRAND-YUEN *et al.*, 2018). WISTRAND-YUEN *et al.* (2018) afirma que quando expostas a concentrações de antibiótico acima da CMI, as bactérias suscetíveis morrem ou param de se multiplicar, sendo que apenas as bactérias que tinham presentes os genes de resistência antes da exposição ao antibiótico sobrevivem. Por este motivo foram encontradas fortes correlações entre a exposição aos antibióticos e a proliferação dos ARG correspondentes, por haver um aumento da pressão seletiva nos ARG na presença de antibióticos (LI *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015).

Vários estudos estabeleceram a ligação entre a ocorrência de antibióticos nas águas residuais e as resistências bacterianas nas ETARs (GUO *et al.*, 2017; SCHWARTZ *et al.*, 2003). Sabe-se também, que as baixas concentrações dos antibióticos (10 a 100 vezes inferiores às concentrações inibitórias mínimas) podem aumentar a abundância relativa das bactérias resistentes e fazer uma seleção das resistências ao promover a evolução adaptativa (FRIMAN *et al.*, 2015; GULLBERG *et al.*, 2011; LUNDSTROM *et al.*, 2016). Um estudo de DANTAS *et al.* (2008) demonstrou que algumas colônias de bactérias não só conseguiam tolerar os antibióticos, mas também usá-los como a sua única fonte de carbono. No contexto clínico já foi atingido o consenso de que o uso excessivo dos antibióticos atualmente disponíveis, conjugado com a falta de descobertas de novos antibióticos, será um dos maiores desafios da área da saúde do século XXI (PIDDOCK, 2012).

Os antibióticos e os seus metabolitos ocorrem como uma mistura de contaminantes antropogênicos, pelo que devem ser considerados e tidos em conta os possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos (CARVALHO e SANTOS, 2016). Os efeitos da toxicidade ecológica dos antibióticos não são fáceis de prever, pois geralmente os estudos de toxicidade no meio aquático apenas consideram os princípios ativos individualmente e não em mistura de antibióticos (“cocktail” de antibióticos) ou matrizes complexas como acontece no meio aquático (DANNER *et al.*, 2019). Apesar de serem desenvolvidos para combater bactérias patogênicas, outros microrganismos do meio aquático podem ser afetados pelos resíduos dos antibióticos e dos seus metabolitos que aí estejam presentes (FLAHERTY e DODSON, 2005). Os produtores primários e os decompositores, que são essenciais para o funcionamento sustentável dos ecossistemas, podem ser vulneráveis aos antibióticos (DANNER *et al.*, 2019).

Podem ser realizados testes para determinar os efeitos de toxicidade aguda (efeitos a curto prazo que muitas vezes causam a morte do microrganismo) e de toxicidade crónica (exposição prolongada que se revela na diminuição dos índices de crescimento e/ou multiplicação) (SOARES *et al.*, 2012). A ecotoxicidade aguda ou crónica dos antibióticos e dos seus metabolitos foi estudada em ensaios com organismos de diferentes níveis tróficos como as bactérias, algas, invertebrados e peixes (CARVALHO e SANTOS, 2016). A interpretação destes dados deve ser feita tendo em conta o valor de concentração do fármaco que induz metade da resposta máxima ( $EC_{50}$ ). Se a concentração de um determinado antibiótico estiver acima de  $EC_{50}$  para uma determinada espécie, em pelo menos 50% dos casos haverá a morte do ser vivo. Para as espécies representadas na Tabela 3, a maior parte dos valores de  $EC_{50}$  está na ordem dos miligramas e microgramas, pelo que grande parte das concentrações de antibióticos da Tabela 2 estarão abaixo do  $EC_{50}$ . No estudo de GRINTEN *et al.* (2010) comparou-se a sensibilidade das algas, bactérias e cianobactérias às diferentes classes de antibióticos e determinaram-se os valores de  $EC_{50}$  para diferentes espécies. Por sua vez, PLEITER *et al.* (2013) estudou a toxicidade de diferentes classes de antibióticos nas cianobactérias e nas algas verdes, isoladamente e em diferentes combinações. Na maioria dos casos, os efeitos tóxicos dos antibióticos eram superiores quando combinados com outros antibióticos. Foi demonstrado que os antibióticos podem continuar a ter efeitos tóxicos nos ecossistemas quando misturados com outros antibióticos, ainda que em baixas concentrações (CARVALHO e SANTOS, 2016). Alguns dos estudos sobre os efeitos tóxicos dos antibióticos nos organismos aquáticos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Toxicidade (expressa em EC50, em mg L<sup>-1</sup>) de diferentes antibióticos para vários organismos aquáticos. Adaptado de CARVALHO e SANTOS, 2016.

Toxicidade dos antibióticos no meio aquático			
Classe do antibiótico Princípio ativo	Organismo	Toxicidade (EC <sub>50</sub> , mg L <sup>-1</sup> )	Referência
Aminoglicosídeos Estreptomicina	<i>Vibrio fischer</i>	>0,4	(GRINTEN et al., 2010)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	1,5	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,034	
Beta-lactâmicos Amoxicilina	<i>Anabaena</i> sp. CPB4337	56,3	(PLEITER et al., 2013)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>1500	
Diaminopirimidinas Trimetoprim	<i>Vibrio fischer</i>	>0,28	(GRINTEN et al., 2010)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>9,0	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	6,9	
Macrólidos Eritromicina	<i>Anabaena</i> sp. CPB4337	0,022	(PLEITER et al., 2013)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,35	
Tilosina	<i>Vibrio fischer</i>	>1,8	(GRINTEN et al., 2010)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,0089	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,29	
Quinolonas Ciprofloxacina	<i>Anabaena flos-aquae</i>	0,0102	(EBERT et al., 2011)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	>8,0	
	<i>Lemna minor</i>	0,0625	
Enrofloxacin	<i>Anabaena flos-aquae</i>	0,32	(WAGIL et al., 2014)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	0,2	
	<i>Myriophyllum spicatum</i>	5,6	(EBERT et al., 2011)
	<i>Lemna minor</i>	>44	
Flumequina	<i>Vibrio fischer</i>	0,1	(WAGIL et al., 2014)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>0,8	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	16	
Levofloxacin	<i>Anabaena</i> sp. CPB4337	>8,8	(GRINTEN et al., 2010)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	4,8	
Norfloxacin	<i>Anabaena</i> sp. CPB4337	>120	(PLEITER et al., 2013)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5,6	
	<i>Lemna minor</i>	>80	
Sulfonamidas Sulfametoxazol	<i>Vibrio fischer</i>	0,34	(PLEITER et al., 2013)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>1,5	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	>9,0	
Tetraciclina	<i>Vibrio fischer</i>	0,55	(GRINTEN et al., 2010)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	>0,1	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,6	
Tetraciclina	<i>Anabaena</i> sp. CPB4337	5,4	(PLEITER et al., 2013)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	6,2	
		3,3	

Segundo DANNER *et al.* (2019), as concentrações dos antibióticos em concentrações abaixo das clinicamente relevantes são propícias a ter efeitos diretos ou indiretos nos seres vivos dos diferentes níveis tróficos, sendo que estes efeitos não são sempre lineares. Ainda que os bioensaios sejam ferramentas válidas para elucidar sobre os efeitos dos contaminantes isolados nas espécies, estes não pressupõem cenários complexos e realistas e não dão a informação de como a exposição aos antibióticos influencia o ecossistema como um todo. Além disso, estes bioensaios não dão a informação sobre a capacidade dos procariontos de metabolizar os antibióticos, nem a sua capacidade adaptativa em ambiente poluído com antibióticos (DANNER *et al.*, 2019). Nesta perspectiva, DANNER *et al.* (2019) propõe o estudo de 3 fatores: cadeias alimentares, misturas de antibióticos e o efeito do aumento da temperatura. Essas interações estão representadas na Figura 8.

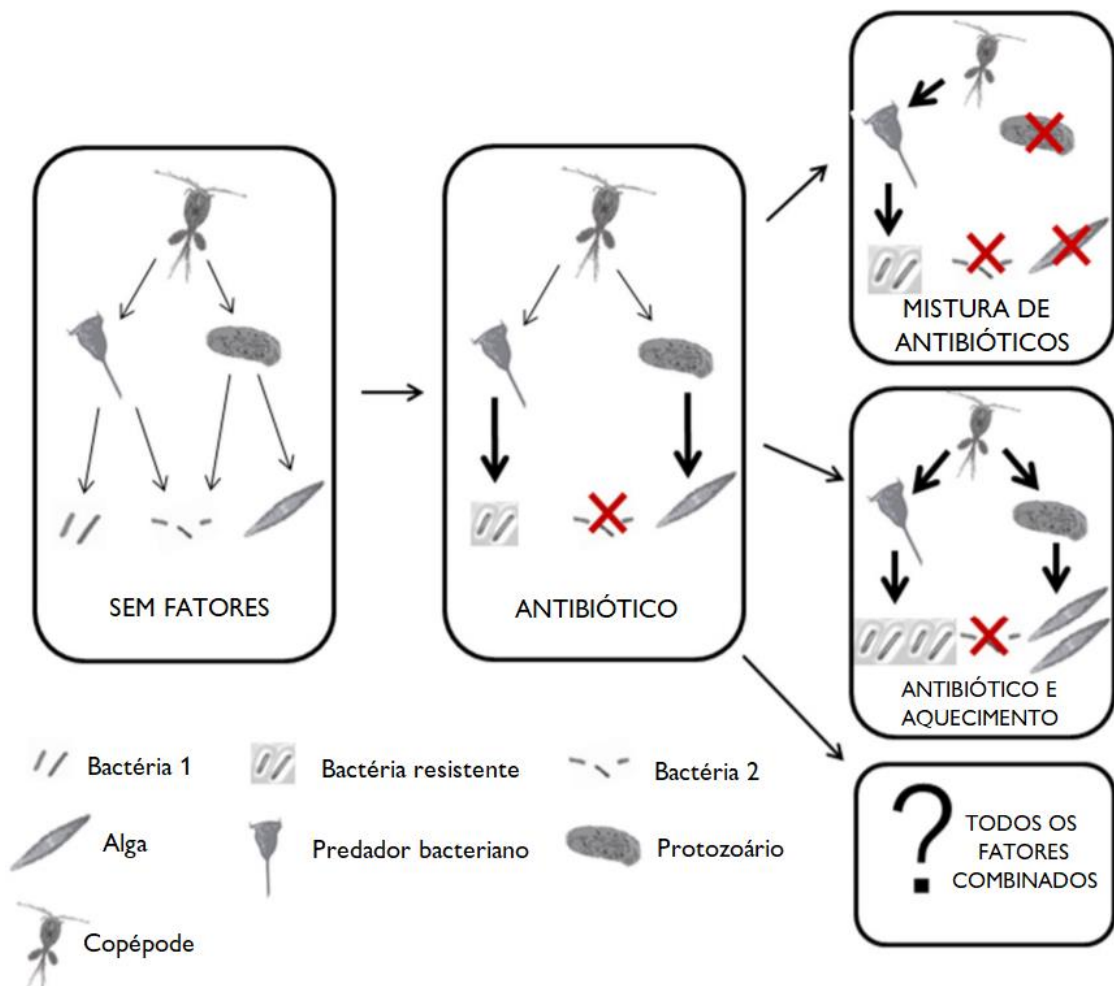


Figura 8 - Efeitos da adição de antibióticos e aumento da temperatura no ecossistema de uma amostra de água de superfície. As setas indicam as ligações tróficas entre as espécies (seta estreita: rácio predador-presa normal, seta a negrito: rácio predador-presa alterado). Adaptado de DANNER *et al.*, (2019).

Na parte esquerda do esquema está representada a cadeia alimentar sem o efeito dos fatores externos e na qual as ligações tróficas não se encontram alteradas. No centro está representado o efeito de um único antibiótico que pode induzir a morte de uma estirpe bacteriana e induzir a resistência em outra, o que afeta toda a cadeia alimentar por alterar as ligações tróficas. Isto leva à alteração nas populações dos seres vivos presentes devido à flutuação dos raios predador-presa. Na parte direita estão representados três possíveis cenários: um “cocktail” de antibióticos que pode induzir efeitos aditivos mais imprevisíveis e significativos quer nas bactérias, quer nas algas; o aumento da temperatura aliado à presença de um antibiótico, que pode induzir um aumento das taxas metabólicas e um aparecimento mais rápido de resistências bacterianas; ou ainda um “cocktail” de antibióticos acoplado ao aumento da temperatura, com efeitos completamente imprevisíveis (DANNER *et al.*, 2019).

No estudo de ADAMOWICZ *et al.* (2018) descobriu-se que as comunidades cooperativas de microrganismos (isto é, quando os metabolitos produzidos por um microrganismo são usados como nutrientes ou fonte de energia do outro) são mais suscetíveis aos antibióticos. A alimentação cruzada é ubíqua nas comunidades microbianas, pelo que as baixas concentrações dos antibióticos podem ter efeitos mais relevantes do que se pensava anteriormente (ADAMOWICZ *et al.*, 2018). Além da interação interbacteriana, as interações com os protozoários predadores das bactérias são relevantes e podem ter um grande efeito na abundância bacteriana. Foram feitos estudos que demonstraram que a resistência bacteriana aos antibióticos e os predadores protozoários estão interligados (DANNER *et al.*, 2019). Um desses estudos demonstrou que os antibióticos podem dar origem a uma reação em cascata que afeta indiretamente as espécies de outros níveis tróficos (FRIMAN *et al.*, 2015). Para o efeito, FRIMAN *et al.* (2015) usou a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e os seus predadores protozoários (a espécie de ciliados *Tetrahymena pyriformis* e o flagelado *Chilomonas paramecium*) para explorar os efeitos de 40 µg/L de gentamicina no meio aquático, e descobriu-se que a bactéria aumentou a resistência quer ao antibiótico, quer aos predadores. A adaptação bacteriana proporcionou uma reação em cascata pela cadeia alimentar, dando origem a um reduzido rácio predador-presa, que por sua vez gerou instabilidade das comunidades e diminuiu a comunidade dos predadores (FRIMAN *et al.*, 2015). Num outro estudo, o predador protozoário *Tetrahymena thermophila* aumentou a persistência e a transmissão de um plasmídeo de resistência bacteriana na população da bactéria patogénica *Serratia marcescens* (CAIRNS *et al.*, 2016).

Ainda assim, é necessário compreender que a emergência das resistências aos compostos antibacterianos não é um fenómeno que apareceu com o uso dos antibióticos nos humanos

ou nos animais. É um processo natural nas bactérias que se deve à competitividade interespecies (DANNER *et al.*, 2019). A título de exemplo, as bactérias Gram-negativas são intrinsecamente resistentes à vancomicina, pois o grande tamanho da molécula faz com que seja impossível penetrar pela membrana bacteriana destas bactérias. Um outro exemplo é a *Pseudomonas aeruginosa* que possui uma resistência inata a vários antibióticos, possivelmente por causa da sua baixa permeabilidade membranar (SANSEVERINO *et al.*, 2018). Assim, não é surpreendente que algumas bactérias resistentes aos antibióticos tenham sido encontradas em ambientes aquáticos e solos primitivos (DANNER *et al.*, 2019). É necessário fazer mais estudos sobre a redistribuição dos antibióticos pela cadeia alimentar para perceber a extensão dos efeitos que isso pode originar. Segundo a aproximação de FRIMAN *et al.* (2015), pode-se estudar laboratorialmente se os antibióticos alteram as comunidades de microrganismos aquáticos – bactérias, protozoários e vírus. As culturas preparadas laboratorialmente podem também incluir alguns invertebrados (como crustáceos microscópicos) para investigar a influência das alterações da cadeia alimentar na população destes seres vivos. Ainda assim, certamente que é importante realizar estas experiências na natureza e nos biofilmes naturais (LUNDSTROM *et al.*, 2016; QUINLAN *et al.*, 2011).

### **Notas conclusivas**

A descoberta dos antibióticos foi um dos maiores marcos da história da Humanidade, pois aumentou drasticamente o sucesso do tratamento de infecções bacterianas. Atualmente compreende-se que o seu uso desproporcional apresenta sérios riscos. Ainda que hajam muitas vias de contaminação do meio aquático, uma das principais é a incompleta remoção dos antibióticos pelas ETARs. Por não serem totalmente metabolizados e como as ETARs não os conseguem eliminar completamente das águas residuais, estes compostos atingem as águas de superfície e as águas subterrâneas. Por estarem em concentrações subterapêuticas e em contato com vastos ecossistemas com diversos microrganismos, ocorre a potenciação da transmissão dos genes de resistência. Além disso, estes compostos apresentam toxicidade inata e podem afetar as cadeias alimentares, alterando o equilíbrio dos ecossistemas. Nesta perspectiva, alguns desafios da atualidade são evitar o posterior aparecimento de resistências bacterianas, evitar a passagem dos genes de resistência e minimizar os efeitos tóxicos que os antibióticos e os seus metabolitos têm sobre os ecossistemas.

## Referências

ADAMOWICZ, E., FLYNN, J., HUNTER, R., & HARCOTBE, W. - **“Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities.”** *ISME Journal*, 12(11) (2018), 2723-2735.

ÁGUAS DO NORTE – **Tratamento das águas residuais.** (Acedido a 13 de junho de 2020). Obtido de adnorte.pt: <http://www.adnorte.pt/pt/educacao-ambiental/ciclo-urbano-da-agua/tratamento-de-aguas-residuais/?id=116>

ALAJMI, H. - **“Effect of physical, chemical and biological treatment on the removal of five pharmaceuticals from domestic wastewater in laboratory-scale reactors and a full-scale plant.”** Newcastle University (2014).

BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J., & CANTÓN, R. - **“Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.”** *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), (2008), 260-265.

BATT, A., BRUCE, I., & AGA, D. - **“Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges.”** *Environmental Pollution*, 142(2), (2006), 295-302.

BERTAULT-PERES, P., BONFILS, C., FABRE, G., JUST, S., CANO, J. P., & MAUREL, P. - **“Metabolism of cyclosporin A. II. Implication of the macrolide antibiotic inducible cytochrome P-450 3c from rabbit liver microsomes. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.”** 15(3), (1987), 391-398.

BUCHBERGER, W. - **“Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge.”** *Analytica Chimica Acta*, 593(2), (2007), 129-139.

BURCH, K. D., HAN, B., PICHTEL, J., & ZUBKOV, T. - **“Removal efficiency of commonly prescribed antibiotics via tertiary wastewater treatment. Environmental science and pollution research international.”** 26(7), (2019), 6301-6310.

BURTON, F., STENSEL, H., & TCHOBANOGLOUS, G. - **“Wastewater engineering : treatment and resource recovery”** (5th ed.). New York: McGraw-Hill Higher Education; London, (2014).



CAIRNS, J., JALASVUORI, M., OJALA, V., BROCKHURST, M., & HILTUNEN, T. - **“Conjugation is necessary for a bacterial plasmid to survive under protozoan predation.”** *Biology Letters*, 12(2), (2016).

CARVALHO, I., SANTOS, L. - **“Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario.”** *Environment International*, 94, (2016), 736-757.

CHAHINE, S., O'DONNELL, M.J., - **“Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*.”** *J Exp Biol.*;214(Pt 3), (2011), 462-8.

CUERDA-CORREA, E., ALEXANDRE-FRANCO, M., & FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C. - **“Advanced Oxidation Processes for the Removal of Antibiotics from Water. An Overview.”** *Water*, 12(1), (2019), 102.

DANNER, M., ROBERTSON, A., BEHRENDTS, V., & REISS, J. - **“Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects.”** *Science of the Total Environment*, 664, (2019), 793-804.

DANTAS, G., SOMMER, M., OLUWASEGUN, R., & CHURCH, G. - **“Bacteria subsisting on antibiotics.”** *Science*, 320(5872), (2008), 100-103.

DAVIES J. - **“Where have All the Antibiotics Gone?”** *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 17(5), (2006), 287–290.

DE LA CRUZ, N. - **“Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge.”** *Water Research*, 46(6), (2012), 1947-1957.

CM Mealhada - Divisão de Águas e Saneamento. **“Esquema de Funcionamento da ETAR de Mealhada”** (Acedido a 02 de julho de 2020). Obtido de Câmara Municipal da Mealhada: [http://www.cm-mealhada.pt/ficheiros/areas/ambiente/etar/amb\\_visetar\\_func.pdf](http://www.cm-mealhada.pt/ficheiros/areas/ambiente/etar/amb_visetar_func.pdf)

EBERT, I., BACHMANN, J., KÜHNEN, U., KÜSTER, A., KUSSATZ, C., MALETZKI, D., & SCHLÜTER, C. - **“Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms.”** *Environmental toxicology and chemistry*, 30(12), (2011), 2786–2792.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), e EMA (European Medicines Agency), (2017). – **Joint Interagency**

**Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report.** EFSA Journal 2017;15(7):4872, 135 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4872

FERNANDES, M., PAÍGA, P., SILVA, A., LLAGUNO, C., CARVALHO, M., VÁZQUEZ, F., & DELERUE-MATOS, C. - **“Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal.”** *Chemosphere*, 239, (2020), 124729.

FLAHERTY, C., & DODSON, S. - **“Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth, and reproduction.”** *Chemosphere*, 61(2), (2005), 200-207.

FRIMAN, P., GUZMAN, L., REUMAN, D., & BELL, T. - **“Bacterial adaptation to sublethal antibiotic gradients can change the ecological properties of multitrophic microbial communities.”** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806), (2015), 20142920.

GAFFNEY, V., ALMEIDA, M., RODRIGUES, A., FERREIRA, E., BENOLIEL, J., CARDOSO, V. - **“Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment.”** *Water research*, 72, (2015), 199-208.

GARCIA-GALAN, M., VILLAGRASA, M., DÍAZ-CRUZ, M., BARCELÓ, D., - **“LC-QqLIT MS analysis of nine sulfonamides and one of their acetylated metabolites in the Llobregat River basin. Quantitative determination and qualitative evaluation by IDA experiments.”** *Anal. Bioanal. Chem.* 397, (2010), 1325-1334.

GIGER W, ALDER AC, GOLET EM, KOHLER H-PE, MCADELL CS, MOLNAR E, SIEGRIST H, SUTER MJ-F - **“Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters.”** *CHIMIA Int J Chemistry* 57(9): (2003), 485-491.

GOLET, E., XIFRA, I., SIEGRIST, H., ALDER, A., & GIGER, W. - **“Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil.”** *Environmental Science and Technology*, 37(15), (2003), 3243-3249.

GONÇALVES, C., SOUSA, M., & ALPENDURADA, M. - **“Analysis of acidic, basic and neutral pharmaceuticals in river waters: Clean-up by 1°, 2° amino anion exchange and enrichment using an hydrophilic adsorbent.”** *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(1), (2013), 1-22.

GULKOWSKA, A., LEUNG, H., SO, M., TANIYASU, S., YAMASHITA, N., YEUNG, L., RICHARDSON, B., LEI, A., GIESY, J., & LAM, P. - **“Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China.”** *Water research*, 42, (2008), 395-403. doi: 10.1016/j.watres.2007.07.031

GULLBERG, E., CAO, S., BERG, O.G., ILBÄCK, C., SANDEGREN, L., HUGHES, D., ANDERSSON, D.I., - **“Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations.”** *PLoS Pathog.* 7, (2011).

GUO, J., LI, J., CHEN, H., BOND, P. L., & YUAN, Z. **“Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements.”** *Water research*, 123, (2017), 468-478.

IARC - **“Carbon black, titanium dioxide, and talc.”** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, VOLUME 93*, (2010), 1-413.

JUHEL-GAUGAIN M, MCEVOY JD, VAN GINKEL LA. - **“Measurements for certification of chlortetracycline reference materials within the European Union: standards, measurements and testing programme.”** *Fres J Anal Chem.* 368; (2000), 656-663.

KARTHIKEYAN, K. G., & MEYER, M. T. - **“Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA.”** *The Science of the total environment*, 361(1-3), (2006), 196-207.

KIM I, YAMASHITA N, TANAKA H. - **“Performance of UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan.”** *J Hazard Mater* 166(2-3): (2009), 1134-1140.

KINGSTON, W. - **“Antibiotics, invention and innovation.”** *Research Policy*, 29(6), (2000), 679-710.

KUMMERER, K., AL-AHMAD, A., & MERSCH-SUNDERMANN, V. - **“Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test.”** *Chemosphere*, 40(7), (2000), 701-710.

KUMMERER, K. - **“Significance of antibiotics in the environment.”** *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(1), (2003), 5-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>

KUMMERER, K. - **“Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I.”** *Chemosphere*, 75(4), (2009), 417-434.

- LI, B., ZHANG, T. - **“Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants.”** *Chemosphere* 83(9): (2011), 1284–1289.
- LI, B., ZHANG, T. - **“Different removal behaviours of multiple trace antibiotics in municipal wastewater chlorination.”** *Water Research*, 47(9), (2013), 2970-2982.
- LI, D., YANG, M., HU, J., ZHANG, Y., CHANG, H., & JIN, F. - **“Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river.”** *Water Research*, 42(1-2), (2008), 307-317.
- LI, K., JI, F., LIU, Y., TONG, Z., XINMIN, ZHAN, & HU, Z. - **“Adsorption removal of tetracycline from aqueous solution by anaerobic granular sludge: Equilibrium and kinetic studies.”** *Water Science and Technology*, 67(7), (2013), 1490-1496.
- LIEN, L., HOA, N., CHUC, N., THOA, N., PHUC, H., DIWAN, V., LUNDBORG, C. - **“Antibiotics in wastewater of a rural and an urban hospital before and after wastewater treatment, and the relationship with antibiotic use-a one year study from Vietnam.”** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6) (2016).
- LUNDSTRÖM, S.V., ÖSTMAN, M., BENGTSSON-PALME, J., RUTGERSSON, C., THOUDAL, M., SIRCAR, T., BLANCK, H., ERIKSSON, K.M., TYSKLIND, M., FLACH, C.F., LARSSON, J., - **“Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms.”** *Sci. Total Environ.* 553, (2016), 587-595.
- MANZETTI, S., & STENERSEN, J. - **“A critical view of the environmental condition of the Sognefjord.”** *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), (2010), 2167-2174.
- MARQUER, P., RABADE, T., & FORTI, R. - **“Meat production statistics Statistics Explained.”** (2019).
- MIAO, X., BISHAY, F., CHEN, M., & METCALFE, C. - **“Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada.”** *Environmental Science and Technology*, 38(13), (2004), 3533-3541.
- MILIC, N., MILANOVIĆ, M., GRUJIC, N., TURK S., RADONIC, J., MIHAJLOVIC, I., MILORADOV, M. - **“Occurrence of Antibiotics as Emerging Contaminant Substances in Aquatic Environment. International journal of environmental health research.”** 23. (2012), 10.1080/09603123.2012.733934.

MOLSTAD, S., LUNDBORG, C., KARLSSON, A., & CARL, O. - **“Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries.”** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34(5), (2002), 366-371.

MONTEIRO, S., BOXALL, A. - **“Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. Reviews of environmental contamination and toxicology.”** 202. (2010), 53-154. 10.1007/978-1-4419-1157-5\_2.

NDABANKULU, V., MADDILA, S., & JONNALAGADDA, S. - **“Cerium doped TiO<sub>2</sub> as photocatalyst for water treatment under visible light.”** *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 668, (2019), 012011.

PALMA, B., SILVA E SOUSA, M., URBAN, P., RUEFF, J., & KRANENDONK, M. - **“Functional characterization of eight human CYP1A2 variants: The role of cytochrome b5.”** *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(2), (2013), 41-52.

PALMISANO, R., CAMPANELLA, L., & AMBROSETTI, B. - **“Photo-Degradation of Amoxicillin, Streptomycin, Erythromycin and Ciprofloxacin by UV and UV/TiO<sub>2</sub> Processes. Evaluation of Toxicity Changes Using a Respirometric Biosensor.”** *Journal of environmental analytical chemistry*, (2015).

PENA, A., CHMIELOVA, D., LINO, C., & SOLICH, P. - **“Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column.”** *Journal of Separation Science*, 30(17), (2007), 2924-2928.

PENA, A., SILVA, L.J.G., PEREIRA, A., MEISEL, L., LINO, C.M. **“Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in Portugal.”** *Anal Bioanal Chem* 397, 2615–2621 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3819-0>

PENG, X., WANG, Z., KUANG, W., TAN, J., & LI, K. - **“A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China.”** *Science of the Total Environment*, 371(1-3), (2006), 314-322.

PEREIRA, A., SILVA, L., MEISEL, L., LINO, C., & PENNA, A. - **“Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: Geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment.”** *Environmental Research*, 136, (2015), 108-119.

PEREIRA, A., SILVA, L., LARANJEIRO, C., MEISEL, L., LINO, C., & PENA, A. - **“Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk.”** *Science of the Total Environment*, 609, (2017), 1182-1191.

PEREIRA, A., SILVA, L., LARANJEIRO, C., LINO, C., & PENA, A. - **“Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: Part I—Source, fate and occurrence.”** *Molecules*, 25(5). (2020).

PIDDOCK, V., - **“The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? Lancet Infect. Dis.”** 12, (2012), 249–253.

PLEITER, M.G., GONZALO, S., PALOMARES, I.R., ET AL., - **“Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment.”** *Water Res.* 47, (2013), 2050–2064.

QUACH-CU, J.; HERRERA-LYNCH, B.; MARCINIAK, C.; ADAMS, S.; SIMMERMAN, A.; REINKE, R.A. - **“The Effect of Primary, Secondary, and Tertiary Wastewater Treatment Processes on Antibiotic Resistance Gene (ARG) Concentrations in Solid and Dissolved Wastewater Fractions.”** *Water*, (2018), 10, 37.

QUINLAN, E.L., NIETCH, C.T., BLOCKSOM, K., LAZORCHAK, J.M., BATT, A.L., GRIFFITHS, R., KLEMM, D.J., - **“Temporal dynamics of periphyton exposed to tetracycline in stream mesocosms.”** *Environ. Sci. Technol.* 45, (2011), 10684–10690.

QUINN R. - **“Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative.”** *American journal of public health*, 103(3), (2013), 426–434. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2012.300693>

REIS-SANTOS, P., PAIS, M., DUARTE, B., CAÇADOR, I., FREITAS, A., VILA POUÇA, A. S., BARBOSA, J., LESTON, S., ROSA, J., RAMOS, F., CABRAL, H. N., GILLANDERS, B. M., & FONSECA, V. F. - **“Screening of human and veterinary pharmaceuticals in estuarine waters: A baseline assessment for the Tejo estuary.”** *Marine pollution bulletin*, 135, (2018), 1079–1084.

ROBERTS, D., LIU, X., ROBERTS, J., NAIR, P., COLE, L., ROBERTS, M., BELLOMO, R. -**“A multicenter study on the effect of continuous hemodiafiltration intensity on antibiotic pharmacokinetics.”** *Critical Care*, 19(1), (2015).

ROBERTS, J., KUMAR, A., DU, J., HEPPLWHITE, C., ELLIS, D., CHRISTY, A., & BEAVIS, S. - **“Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest**

**inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow.”** *Science of the Total Environment*, 541, (2016), 1625-1637.

SALGADO, R., MARQUES, R., NORONHA, J., MEXIA, J., CARVALHO, G., OEHMEN, A., & REIS, M. - **“Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant.”** *Environmental Pollution*, 159(10), (2011), 2359-2367.

SOARES, J., CASTRO, L.F.C., REIS-HENRIQUES, M.A., MONTEIRO, N.M., SANTOS, M.M., - **“Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways.”** *Ecotoxicology* 21, (2012), 1513-1522.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S., CHAMORRO, S., MARTI, E., HUERTA, B., GROS, M., SÀNCHEZ-MELSIÓ, A., BORREGO, C. M., BARCELÓ, D., & BALCÁZAR, J. L. - **“Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.”** *Water research*, 69, (2015), 234-242.

SAMANIDOU, V., NIKOLAIDOU, K., & PAPADOYANNIS, I. - **“Advances in chromatographic analysis of tetracyclines in foodstuffs of animal origin - A review.”** *Separation and Purification Reviews*, 36(1), (2007), 1-69.

SANGANYADO, E., & GWENZI, W. - **“Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks.”** *Science of the Total Environment*, 669, (2019), 785-797.

SANSEVERINO, I., CUENCA, A. N., LOOS, R., MARINOV D., LETTIERI T., **“State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance.”** EUR 29592 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, (2018).

SANTOS, L., GROS, M., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., DELERUE-MATOS, C., PENA, A., BARCELÓ, D., & MONTENEGRO, M. **“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.

SCHUSTER, A., HÄDRICH, C., & KÜMMERER, K. - **“Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany-is hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction?”** *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 8(5-6), (2008), 457-471.

SCHWARTZ, T., KOHNEN, W., JANSEN, B., & OBST, U. - **“Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.”** *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), (2003), 325-335.

SEIFRTOVÁ, M., PENA, A., LINO, C., & SOLICH, P. - **“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.

SHARMA, V., JOHNSON, N., CIZMAS, L., MCDONALD, T., & KIM, H. - **“A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes.”** *Chemosphere*, 150, (2016), 702-714.

SKOCAJ, M., FILIPIC, M., PETKOVIC, J., & NOVAK, S. - **“Titanium dioxide in our everyday life; Is it safe?”** *Radiology and Oncology*, 45(4), (2011), 227-247.

SOUSA, M., GONÇALVES, C., CUNHA, E., HAJŠLOVÁ, J., & ALPENDURADA, M. - **“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.

STIBOROVA, M., LEVOVA, K., BÁRTA, F., SHI, Z., FREI, E., SCHMEISER, H., ARLT, V. - **“Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 IA1 and IA2.”** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 125(2), (2012), 345-58.

SUKUL, P., & SPITELLER, M. - **“Fluoroquinolone antibiotics in the environment.”** *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 191, (2007), 131-162.

THOMAS J. H. - **“Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates.”** *PLoS genetics*, 3(5), (2007).

VAN BOECKEL, T. P., GANDRA, S., ASHOK, A., CAUDRON, Q., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., & LAXMINARAYAN, R. - **“Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. The Lancet. Infectious diseases,”** 14(8), (2014), 742-750.

VAN DER GRINTEN, E., PIKKEMAAT, M., VAN DEN BRANDHOF, E., STROOMBERG, G., & KRAAK, M. - **“Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics.”** *Chemosphere*, 80(1), (2010), 1-6.



WAGIL, M., KUMIRSKA, J., STOLTE, S., PUCKOWSKI, A., MASZKOWSKA, J., STEPNOWSKI, P., & BIAŁK-BIELIŃSKA, A. - **“Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland.”** *Science of the Total Environment*, 493, (2014), 1006-1013.

WISE, R. - **“Antimicrobial resistance: priorities for action.”** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), (2002), 585-586.

WISTRAND-YUEN, E., KNOPP, M., HJORT, K., KOSKINIEMI, S., BERG, O., & ANDERSSON, D. - **“Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure.”** *Nature Communications*, 9(1), (2018), 1-12.

UNITED NATIONS (2017) - **World Water Development Report, Wastewater: The Untapped Resource - World** (13 de junho de 2020). Obtido de <https://reliefweb.int/report/world/2017-un-world-water-development-report-wastewater-untapped-resource>

VALORMED – **Relatório de Atividades** (Acedido a 02 de julho de 2020). Obtido de <http://www.valormed.pt/article/view/13/relatorios-de-atividades>

ZUPANC, M., KOSJEK, T., PETKOVŠEK, M., DULAR, M., KOMPARE, B., ŠIROK, B., BLAZEKA, Z. & HEATH, E. - **“Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment.”** *Ultrasonics Sonochemistry* 20, (2013), 1104-1112.