

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Contaminantes de interesse emergente: antifúngicos

Mariana Antunes Brazão

Monografia orientada pela Professora Cristina Maria Martins Almeida,
Professor Auxiliar

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2022

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Contaminantes de interesse emergente: antifúngicos

Mariana Antunes Brazão

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Cristina Maria Martins Almeida,
Professor Auxiliar

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2022

Resumo

Nas últimas décadas, a presença de certas substâncias no ambiente, por exemplo em matrizes aquáticas, tem preocupado as agências regulamentares e tem sido foco da atenção da comunidade científica. As substâncias não regulamentadas e com potencial risco para a saúde dos ecossistemas, e de forma direta ou indireta, para a saúde humana, são designadas de Contaminantes de Interesse Emergente (CECs). Estes contaminantes, estão representados por um vasto grupo de compostos químicos, nomeadamente, fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas, produtos industriais, entre outros. A presença destes contaminantes, maioritariamente de natureza antropogénica, deve-se principalmente à ineficiência das estações de tratamento de águas residuais, que não estão desenhadas para remover este tipo de substâncias. No entanto, decorrente das várias etapas de tratamento, uma parte dos contaminantes é eliminada. Como a sua remoção pelos processos convencionais de tratamento não é total, têm sido desenvolvidas e pontualmente adotadas novas metodologias que alcancem melhores taxas de remoção. Apesar de se encontrarem em concentrações vestigiais, na ordem dos ng/L e ug/L, os CECs podem ter efeitos nefastos no ambiente aquático e nos organismos que nele residem, bem como na saúde humana. Uma das classes terapêuticas analisada são os antifúngicos, nomeadamente a classe dos azóis. Esta é uma das classes mais utilizada na clínica, bem como em produtos de cuidado pessoal, como champôs e géis de banho. Dividida em imidazóis e triazóis, a presença de substâncias pertencentes a esta classe tem sido avaliada em vários efluentes de estações de tratamento de águas residuais e nas águas naturais, recetoras destes efluentes. A falta de estudos de ocorrência e os potenciais efeitos na desregulação endócrina e no aumento da resistência a antifúngicos fez com que estes compostos fossem incluídos na lista de vigilância de contaminantes ambientais em matrizes aquáticas, na atual legislação ambiental relativa às substâncias prioritárias no domínio da política da água.

Palavras-chave: antifúngicos; azóis; contaminantes de interesse emergente; matrizes aquáticas; estações de tratamento de águas residuais;

Abstract

In the last decades, the presence of certain substances in the environment, for example, in aquatic matrices, has concerned regulatory agencies and has been the focus of attention of the scientific community. The unregulated substances with potential risk to ecosystem health and, directly or indirectly, to human health, are called Contaminants of Emerging Interest (CECs). These contaminants are represented by a large group of chemical compounds, including pharmaceuticals, personal care products, pesticides, and industrial products, among others. These contaminants, mostly of anthropogenic nature, are mainly due to the inefficiency of wastewater treatment plants, which are not designed to remove these types of substances. However, due to the various treatment stages, a portion of the contaminants is eliminated. As their removal by conventional treatment processes is not total, new methodologies that achieve better removal rates have been developed and occasionally adopted. Despite being found in trace concentrations, in the range of ng/L and ug/L, CECs can have harmful effects on the aquatic environment, the organisms that live in it and on human health. One therapeutic classes examined is the antifungals, namely the class of azoles. This is one of the most widely used classes in the clinic and personal care products such as shampoos and shower gels. Divided into imidazoles and triazoles, the presence of substances belonging to this class has been evaluated in various wastewater treatment plant effluents and in the natural waters that receive these effluents. The lack of occurrence studies and the potential effects on endocrine disruption and increased resistance to antifungal drugs has led to the inclusion of these compounds in the watch list of environmental contaminants in aquatic matrices, in the current environmental legislation on priority substances in the field of water policy.

Keywords: antifungals; azoles; contaminants of emerging concern; aquatic matrices; wastewater treatment plants;

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, bem como a todo o corpo docente. Um professor deixa sempre a sua marca nos alunos e não poderia estar mais agradecida pela transmissão de conhecimento que pude experienciar nesta casa. O meu agradecimento em especial à minha orientadora, professora Doutora Cristina Almeida, pelo seu acompanhamento e dedicação durante a realização desta monografia.

Aos amigos que fiz durante o curso, só posso deixar o meu profundo agradecimento. Desde amigos que fiz no primeiro dia, até às amizades que vieram mais tarde, mas que sempre marcaram o meu percurso. Não teria feito este curso sem os meus colegas, sem o seu apoio, sem o seu companheirismo e sem a sua amizade. Um agradecimento especial à Eduarda, à Vanessa e à Sofia por estarem presentes nos bons e nos maus momentos e por me incentivarem e não me deixarem desistir.

Agradeço aos meus pais, Helena e João Paulo, pela oportunidade e investimento que fizeram para que eu pudesse ingressar no ensino superior e concluir este curso. Agradeço todo o apoio e confiança que depositaram em mim, espero ter-vos deixado orgulhosos. Agradeço à minha irmã Clara, por ter sido a minha companhia e o meu lar nestes cinco anos em Lisboa. À restante família deixo também o meu agradecimento pelo apoio e suporte que me deram ao longo do curso.

Agradeço ao Vasco pela constante motivação e incentivo, mesmo quando nem tudo corria pelo melhor, sempre me fez acreditar que iria conseguir.

Índice

Resumo	I
Abstract	III
Agradecimentos	V
Índice	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XI
Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas.....	XIII
Introdução.....	1
Capítulo I. Metodologia	3
Capítulo II. Antifúngicos	4
1. Classificação.....	4
1.1 Polienos	4
1.2 Pirimidinas	5
1.3 Azóis.....	6
1.4 Equinocandinas	8
1.5 Alilaminas	9
1.6 Outros	10
2. Farmacocinética dos antifúngicos	10
2.1 Polienos	10
2.2 Pirimidinas	11
2.3 Azóis.....	12
2.4 Equinocandinas	14
2.5 Alilaminas	15
2.6 Griseofulvina.....	16
3. Resíduos e matrizes	16
4. Padrões de utilização de antifúngicos	16
4.1 Em Portugal.....	16

4.2	No mundo	18
Capítulo III. Contaminantes de interesse emergente		22
1.	Contaminante <i>versus</i> poluente	22
1.1	Definição	22
1.2	Perfil dos contaminantes de interesse emergente	23
1.3	Principais fontes de contaminação	24
1.4	Quantificação dos CECs.....	27
1.5	Remoção de CECs.....	29
1.6	Consequências e impacte ambiental.....	32
1.7	Consequências e impacte na saúde humana	33
1.8	Legislação.....	35
1.8.1	Nacional e europeia.....	36
1.8.2	Internacional.....	37
2.	Contaminantes de interesse emergente: fármacos.....	38
2.1	Fontes de exposição de fármacos	38
2.2	Tipos de fármacos e padrões de contaminação	38
Capítulo IV. Contaminantes ambientais: antifúngicos.....		42
1.	Antifúngicos versus CECs: Azóis	42
2.	Fontes de contaminação e matrizes ambientais alvo.....	42
3.	Ocorrência e remoção de agentes antifúngicos das matrizes ambientais.....	43
4.	Toxicidade e efeitos ecológicos	46
4.1	Toxicidade ambiental e em humanos	46
4.2	Resistência a antifúngicos	47
Capítulo V. Conclusões e perspectivas futuras		49
Bibliografia e referências bibliográficas		51

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura química da anfotericina B.....	4
Figura 2 - Estrutura química da 5-flucitosina	5
Figura 3 - Estruturas químicas dos imidazóis	6
Figura 4 - Estrutura química dos triazóis	7
Figura 5 - Estrutura química das equinocandinas: a) caspofungina; b) micafungina; c) anidulafungina.....	9
Figura 6 - Estrutura química das alilaminas.....	9
Figura 7 - Estrutura química da griseofluvina.....	10
Figura 8 - Evolução da utilização de medicamentos anti-infecciosos no SNS.....	18
Figura 9 -Classificação e tópicos preocupantes sobre CECs	24
Figura 10 - Ciclo de vida de distribuição de CECs.....	27
Figura 11 - Quocientes de perigo (HQ, em inglês) para produtos farmacêuticos e 17-alfa-etinilestradiol para diferentes espécies de peixes, invertebrados, plantas, algas e crustáceos	33
Figura 12 - Alguns efeitos adversos dos CECs na saúde humana	35

Índice de tabelas

Tabela 1 - Características farmacocinéticas da preparação de anfotericina B desoxicolato ...	11
Tabela 2 - Características farmacocinéticas das preparações de triazóis	12
Tabela 2 – (Continuação)	13
Tabela 3 - Características farmacocinéticas das preparações de equinocandinas.	14
Tabela 3 - (Continuação).....	15
Tabela 4 - Consumo total de anti-infecciosos em DHD, em ambulatório – 2000-2007.....	16
Tabela 5 - Consumo total de antimicóticos, em DHD, em ambulatório por molécula nos distritos em 2007	17
Tabela 6 - Consumo de antimicóticos (grupo ATC J02) e antifúngicos (grupo ATC D01B) para uso sistémico na comunidade, países da UE/EEE, 2020, expresso em DHD.....	19
Tabela 7 - Consumo de antimicóticos (grupo ATC J02) e antifúngicos (grupo ATC D01B) para uso sistémico em meio hospitalar, países da UE/EEE, 2020, expresso em DHD.....	20
Tabela 8 - Proporção de altas hospitalares em um doente recebeu pelo menos uma dose dos antifúngicos correspondentes durante a sua estadia (2006-2012).....	21
Tabela 9 -Fontes de CECs em ambiente aquático	26
Tabela 10 -Métodos de extração e análise de alguns CECs	29
Tabela 11 - Ocorrência de azóis nas ETAR	44

Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides

ANF B – Anfotericina B

A₂O - anaeróbio-anóxico-óxico (A₂O)

ATC - Anatomical Therapeutic Chemical index

BHT – 2,6- di-terc-butil-4-metilfenol

CEC – Contaminante de interesse emergente

CPSE - Concentração prevista sem efeito

CTZ - Cetoconazol

CYP - Citocromo P

DHD - Doses diárias definidas por 1000 habitantes por dia

DNA - ácido desoxirribonucleico

E1-estriona

E2- 17-β-estradiol;

EE2- 17-α-etinilestradiol

EC 50 - concentração que produz 50% do efeito máximo

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

EFS – Extração em fase sólida

EHMC- 2-etilhexil-4-metoxicinamato

ETAR – Estações de tratamento de águas residuais

EPA -Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

EPAL – Empresa Portuguesa de Águas Livres

FCZ – Fluconazol

GC -Cromatografia gasosa

GSF - Griseoflúvina

ITZ – Itraconazol

LC - Cromatografia líquida

LC 50- concentração letal para 50% da população

MBR - Bioreator de membrana

MEFS - Microextração em fase sólida

MS - Espetrometria de massa

MS/MS - Espetrometria de massa em *tandem*

MSTFA - N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

OMS - Organização Mundial de Saúde

QP -Quociente de Perigo

TRF -Terbinafina

UGT - UDP-glucuronil-transferase

UHPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência

UV - Ultravioleta

VCZ - Voriconazol

Introdução

Os fungos são organismos eucariotas, tendo algumas semelhanças às células humanas. Os agentes antifúngicos aproveitam-se, por sua vez, das principais diferenças entre os dois tipos de células para exercerem o seu efeito terapêutico nas infecções fúngicas. A existência de uma parede celular, composta por hidratos de carbono complexos, como a quitina e glucanos e o ergosterol como principal esteroide constituinte da membrana celular, ao invés do colesterol, constituem as principais diferenças (1).

O primeiro agente antifúngico, a anfotericina B, foi descoberto em 1958, constituindo um grande avanço na terapêutica destas infecções. No entanto, apresentava alguma toxicidade renal. Mais tarde, em 1973, a flucitosina foi descoberta. A primeira geração de azóis tornou-se disponível nos anos 90, bem como uma formulação lipídica da anfotericina B, associada a menos efeitos adversos. Na primeira década do século XXI, assistimos à descoberta das equinocandinas, bem como da segunda geração de azóis (2).

Apesar do grande desenvolvimento na descoberta de fármacos desta classe, no século XX, a descoberta de novas moléculas com propriedades antifúngicas parece ter estagnado. A principal causa parece ser a dificuldade acrescida na descoberta destes fármacos quando comparada com a descoberta de antibacterianos, devido maioritariamente à natureza eucariótica das células fúngicas (3).

No entanto, a prevalência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente ao longo das últimas décadas, sendo estas infecções associadas a elevadas taxas de mortalidade e morbidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (3).

Nos últimos anos, uma das preocupações ambientais mais urgentes tem sido a presença dos chamados Contaminantes de Interesse Emergente (CECs), tais como fármacos e produtos de cuidado pessoal no ambiente aquático. A principal fonte destes compostos são as águas residuais urbanas, sendo que muitos podem propagar-se através do ciclo urbano da água, chegando mesmo à água de consumo humano, devido à baixa taxa de remoção nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR), que não estão desenhadas para remover estes contaminantes (4). Os antifúngicos, nomeadamente da classe dos azóis, foram uns dos fármacos detetados em amostras de águas em diversos estudos.

A presente monografia encontra-se dividida em cinco capítulos, sendo o primeiro a metodologia adotada. O Capítulo II é dedicado ao estudo dos fármacos antifúngicos, nomeadamente, classes, propriedades farmacocinéticas, modo de ação e indicações

terapêuticas. É feita também uma análise aos padrões de utilização em Portugal, na Europa e no mundo.

O terceiro capítulo aborda o problema dos contaminantes de interesse emergente e do seu impacto ambiental. Também são apresentadas as principais fontes destas substâncias, a sua ocorrência a nível mundial, os seus efeitos no ambiente e no organismo humano, bem como a legislação aplicável em vigor. Uma das categorias de substâncias consideradas CECs, a dos fármacos, é analisada mais detalhadamente.

No quarto capítulo, é feita uma revisão dos estudos sobre os antifúngicos da classe dos azóis, fármacos considerados CECs, analisando a sua presença em matrizes aquáticas, bem como os potenciais efeitos no ambiente e na saúde humana.

O último capítulo reúne as conclusões retiradas desta revisão da literatura.

Capítulo I. Metodologia

A elaboração da presente monografia “Contaminantes de interesse emergente: antifúngicos” foi realizada através de uma revisão da literatura publicada em diversas bases de dados como a PubMed e ScienceDirect e os motores de busca Google e Scholar Google.

A pesquisa elaborada foi realizada de janeiro a julho com recurso às palavras chave “*antifungal drugs*”, “*antifungal resistance*”, “*emerging contaminants*”, “*compounds of emerging concern*”, “*wastewater treatment plants*”, “*emerging contaminants removal*”, “*detection of emerging contaminants*”, “*pharmaceutical compounds in water*”, “*azoles*”. A pesquisa foi ainda realizada recorrendo às mesmas palavras chave, mas em português.

Os artigos foram consultados segundo os seguintes critérios de inclusão: artigos de revisão de literatura e revisão sistemática, bem como estudos de caso; artigos publicados nos últimos 20 anos, dando preferência aos publicados nos últimos 10 anos; estudos de caso conduzidos globalmente, não excluindo nenhum local investigado; artigos redigidos em português e inglês.

A data (anos anteriores a 2002), entidades não idóneas, informação de blogues e outros contaminantes de interesse emergente sem serem os fármacos foram excluídos da análise bibliográfica.

Foram consultados regulamentos, normas e leis nacionais, da Europa e dos Estados Unidos da América, bem como sites de entidades oficiais como a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (Infarmed), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA).

As referências bibliográficas foram elaboradas através de um programa informático, o Mendeley, de acordo com a norma de Vancouver.

Capítulo II. Antifúngicos

1. Classificação

Atualmente podemos classificar os antifúngicos em 5 classes principais: polienos, pirimidinas, azóis, equinocandinas, alilaminas, existindo ainda outros fármacos com atividade antifúngica.

1.1 Polienos

Os polienos são produtos naturais derivados do *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto oriundo do solo (2). Estão incluídas nesta classe moléculas como a anfotericina B e as suas várias formulações, bem como a nistatina. Estas moléculas atuam através de ligações hidrofóbicas ao ergosterol, uma molécula vital na estrutura da célula fúngica(2,5). Esta ligação vai criar uma disrupção na membrana da célula, levando ao aparecimento de poros que funcionam como canais iónicos. Cria-se um efluxo do ião potássio e moléculas intracelulares, causando a morte da célula fúngica (2,5).

A anfotericina B é uma molécula anfipática, insolúvel em água e com uma baixa biodisponibilidade oral (6). Na sua estrutura (figura 1) possui uma lactona macrocíclica e um grupo hepteno não polar (6). Possui atividade antifúngica contra *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides braziliensis*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium marneffeii*, e agentes responsáveis por mucormicose. (2)

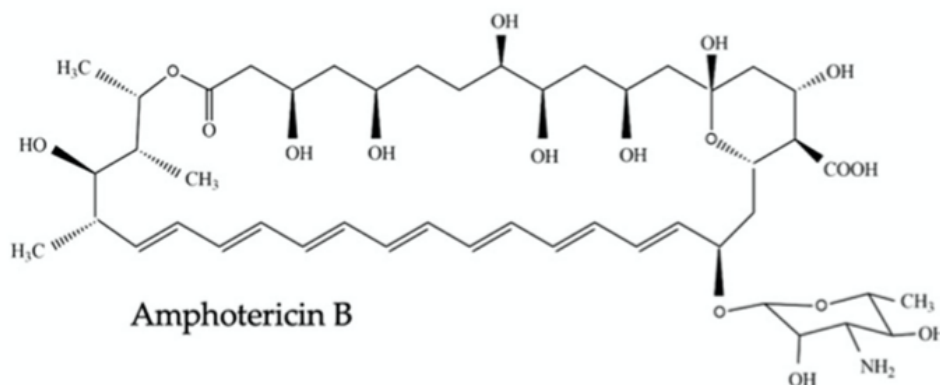


Figura 1 - Estrutura química da anfotericina B (Fonte: Carolus *et al.*2020 (7))

Devido à sua insolubilidade em água, este agente antifúngico foi formulado originalmente com o desoxicolato de sódio, sendo o nome da preparação Fungizone® (2,7). Por problemas de toxicidade, especialmente de nefrotoxicidade e problemas de infusão, foram desenvolvidas três formulações lipídicas da anfotericina B. A anfotericina B lipossomal (L-AmB), conhecida por AmBisome®, um complexo lipídico de anfotericina B (ABLCL), conhecido por Abelcet® e uma dispersão coloidal de anfotericina B, conhecida por Amphocil®, apesar de esta última não ser utilizada na clínica (2).

A nistatina tem uma pobre absorção gastrointestinal, sendo utilizada maioritariamente para tratar micoses tópicas e vaginais (7).

1.2 Pirimidinas

Nesta classe de antifúngicos encontramos a flucitosina ou 5-flucitosina. A sua estrutura (figura 2) apresenta um grupo carboxilo, um grupo fluorado e um grupo amina como substituintes no anel de pirimidina (8).

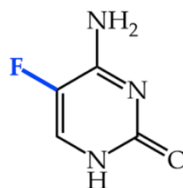


Figura 2 - Estrutura química da 5-flucitosina (Fonte: Houšť et al.2020 (9))

Esta molécula, 5-fluocitosina, foi designada e utilizada, em primeiro lugar, como um antimetabolito com propriedades antineoplásicas. No entanto, essas propriedades demonstraram-se pouco efetivas, sendo agora utilizada na terapia antifúngica (9). Está aprovada para o tratamento sistémico de criptococose, candidíase, cromomicoses, infeções por *Torulopsis glabrata* e *Hansenula*. Na terapia de sepsis por *Candida* e de meningite por *Cryptococcus* é utilizada em terapia combinada com anfotericina B (10).

O seu mecanismo de ação prende-se com o facto de esta molécula, 5-flucitosina, ser um pró-fármaco, convertida em 5-fluorouracilo, a forma ativa, dentro da célula fúngica, pela citosina desaminase, uma enzima localizada na membrana da célula e essencial para a entrada da 5-flucitosina na mesma. Uma vez na forma ativa, a 5-fluorouracilo é convertida, através de sucessivas fosforilações em 5-fluorouracilo trifosfato. Este é incorporado no ácido ribonucleico (RNA) fúngico em vez da uridina trifosfato, levando à inibição da síntese proteica (2,10). Para

além disso, a 5-fluorouracil é metabolizada em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato pela uridina monofosfato pirofosforilase, vedando a principal fonte de timidina na síntese de DNA (9).

Este antifúngico apresenta alguns efeitos adversos significativos como hepatotoxicidade e toxicidade para a medula óssea, provavelmente devido a concentrações tóxicas de fluorouracilo no plasma (10).

1.3 Azóis

A classe dos azóis é uma das maiores classes de antifúngicos e pode ser dividida em dois grupos, os imidazóis (figura 3), que possuem um heterocíclico com anéis de 5 membros com dois átomos de azoto e que incluem moléculas como o miconazol, o cetoconazol e o clotrimazol. Os triazóis (figura 4) por sua vez possuem 3 átomos de azoto e incluem moléculas como o fluconazol, o itraconazol, o posaconazol, o isavuconazol e o voriconazol (10,11).

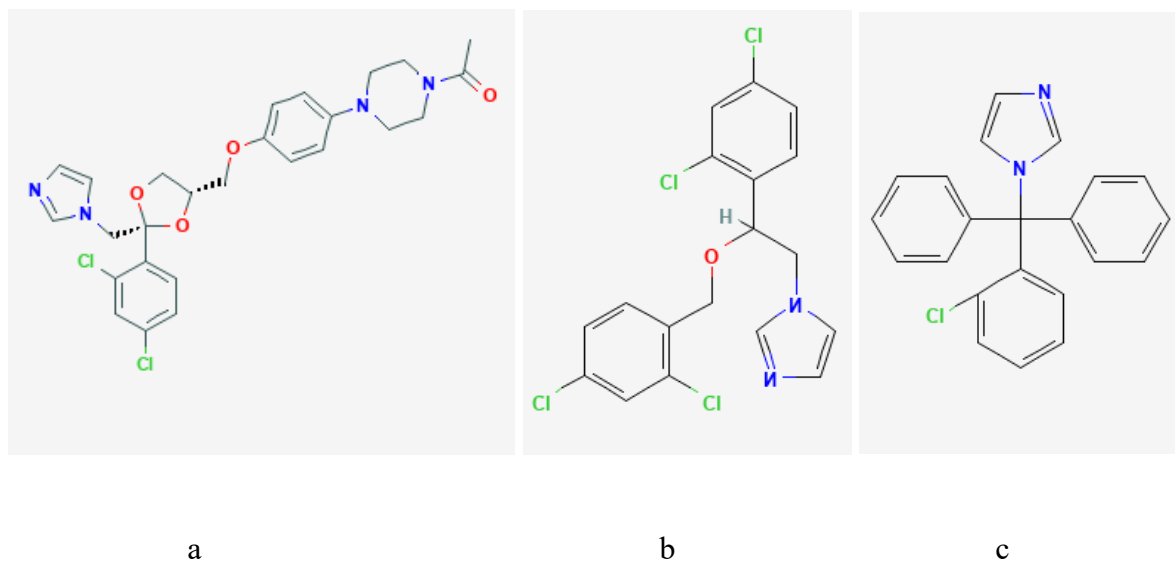


Figura 3 - Estruturas químicas dos imidazóis: a) cetoconazol; b) miconazol; c) clotrimazol (Fonte: PubChem *database*)

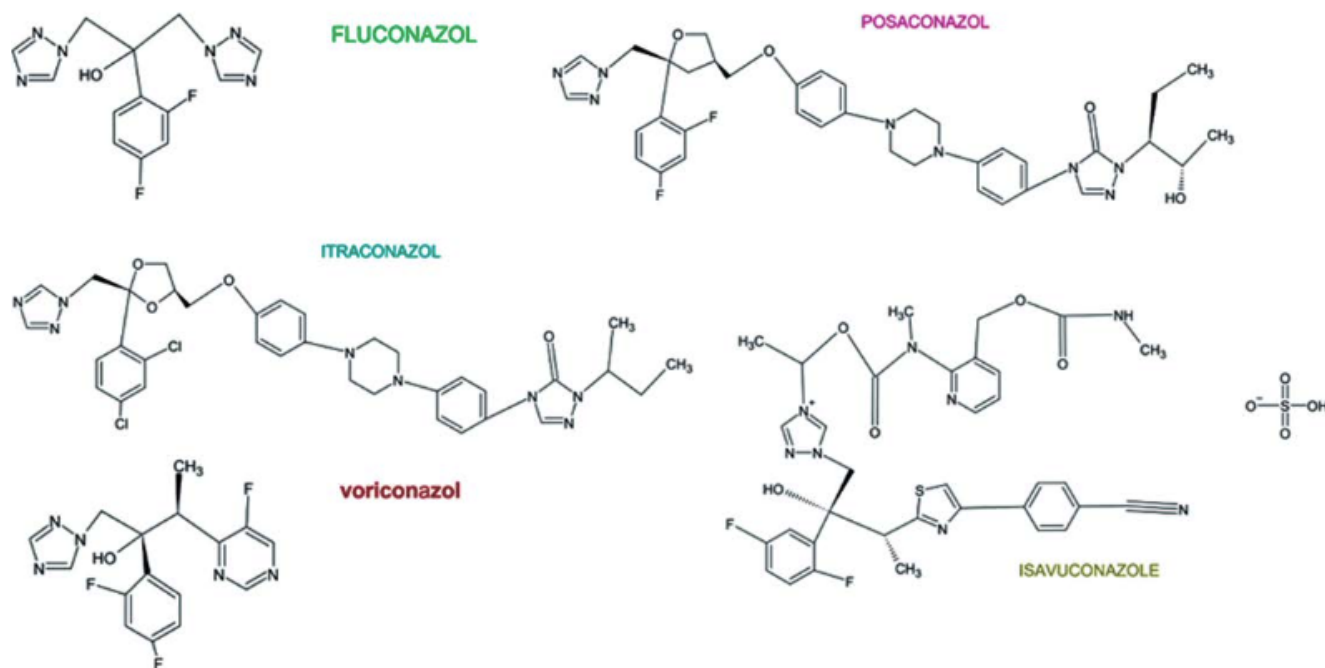


Figura 4 - Estrutura química dos triazóis (Fonte: Nocua-Baéz et al.2020 (11))

O mecanismo de ação dos azóis prende-se com a sua capacidade de inibir a 14- α -desmetilase através da ligação ao seu grupo heme. Esta enzima, pertencente à família do citocromo P 450 (CYP 450) é crucial para a conversão do lanosterol em ergosterol. Sendo o ergosterol um constituinte chave na membrana celular fúngica, a falta deste e o acúmulo de precursores tóxicos derivados destas reações contribuem para a atividade dos azóis (10).

O cetoconazol, conhecido por Nizoral[®] ou Fungoral[®] é utilizado sistémica e topicamente, contra infecções fúngicas cutâneas. É ativo contra espécies *Candida*, *Cryptococcus immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Malassezia furfur*, *Paracoccidioides brasiliensis* e dermatófitos (10).

O miconazol e o clotrimazol estão também disponíveis em preparações tópicas para tratar infeções cutâneas e vaginais (2).

O fluconazol apresenta uma alta solubilidade em água, ao contrário dos outros azóis, estando disponível para administração oral e intravenosa. É eficaz contra várias espécies de *Candida* e de *Cryptococcus*, sendo muito utilizado em profilaxia de infeções por *C.albicans*. É bem tolerado, mas pode apresentar alguma hepatotoxicidade e provocar arritmias ventriculares (2,8,10).

O itraconazol, administrado oralmente, é altamente lipofílico e ativo contra muitas espécies de dermatófitos e leveduras, como a *Candida* e o *Cryptococcus neoformans*, e ainda contra várias espécies de *Aspergillus* (10). O posaconazol está atualmente disponível em suspensão

oral, comprimidos de libertação prolongada e solução intravenosa. Está aprovado para o tratamento de candidíase orofaríngea e para a profilaxia de infeções fúngicas invasivas (2). Estes dois azóis compartilham múltiplas propriedades farmacológicas, sendo uma delas o facto de serem pouco solúveis em água, precisando de ser formulados com ciclodextrinas para melhorar sua solubilidade, o que acarreta alguma toxicidade. (8)

O isavuconazol é clivado por butirilcolinesterases e outras esterases do plasma na sua forma solúvel em água, o sulfato de isavuconazónio. O seu espectro antifúngico compreende espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Mucorales* e *Cunninghamella*. Está disponível para administração intravenosa e oral. Apresenta hepatotoxicidade e efeitos gastrointestinais e no sistema nervoso central (8,10).

O voriconazol é pouco solúvel em água pelo que também deve ser formulado com ciclodextrinas. Tem o melhor perfil de absorção oral de todos os azóis. É ativo contra espécies de *Candida*, *Scedosporium* e *Fusarium* (8,10).

Por fim o posaconazol, está disponível em três formulações, suspensão oral, comprimidos e uma solução para administração intravenosa, estas duas últimas com melhor biodisponibilidade (10). O seu espectro antifúngico é similar ao do voriconazol mas inclui também zigomicetes (12).

1.4 Equinocandinas

Na classe das equinocandinas encontramos lipopéptidos semissintéticos, compostos por hexapéptidos cíclicos ligado a cadeias de aminoácidos com diferentes tamanhos de cadeia. Em relação ao seu mecanismo de ação, este passa pela disrupção da parede celular fúngica. Ao inibir a síntese de β -1,3-glucano, um polissacárido da parede celular essencial para muitos fungos, estas moléculas exercem o seu potencial terapêutico. Atualmente estão disponíveis 3 moléculas nesta classe, a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina (figura 5) (10). São fungicidas para espécies *Candida* como a *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. lusitaniae* e exercem função fungistática contra espécies *Aspergilli* (2). Até ao momento foram apenas aprovadas para administração intravenosa (9).

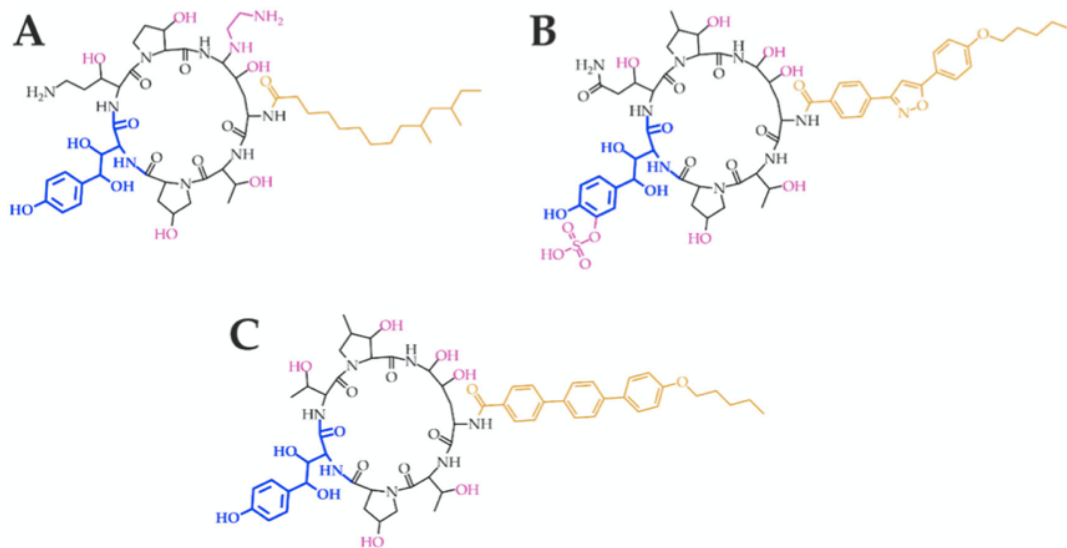


Figura 5 - Estrutura química das equinocandinas: a) caspofungina; b) micafungina; c) anidulafungina. (Fonte: Houšť et.al 2020 (9))

1.5 Alilaminas

Na classe das alilaminas, encontramos a terbinafina e a naftifina (figura 6). A terbinafina está disponível para uso oral e tópico, sendo que a naftifina está disponível em creme e em gel para uso tópico. A terbinafina é, pelo menos, tão eficaz como a dose diária de 200 mg de itraconazol no tratamento de onicomicoses de unhas. A naftifina inibe a esqualeno-2,3-epoxidase, inibindo a síntese de ergosterol. É ativa no tratamento de *tinea cruris* e *tinea corporis* (13).

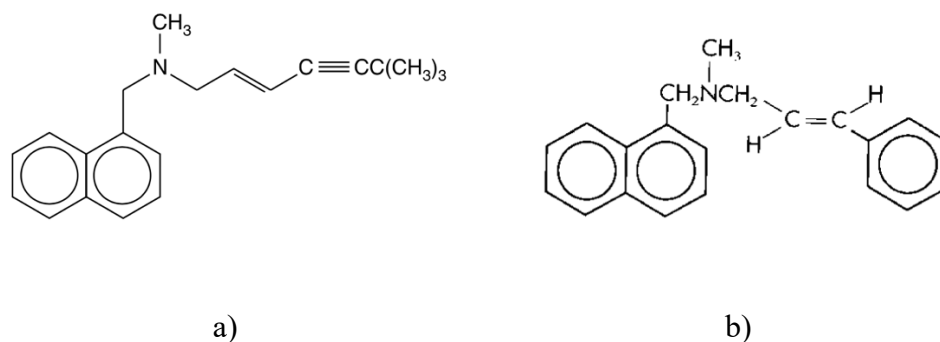


Figura 6 - Estrutura química das alilaminas; a) terbinafina; b) naftifina (Fonte: Brunton et.al 2005 (13))

1.6 Outros

Podemos ainda encontrar outros tipos de agentes antifúngicos. A griseoflavinina (figura 7) é um agente fungistático, praticamente insolúvel em água, disponível em comprimidos, ativo contra vários dermatófitos das espécies *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Tricophyton*. O seu mecanismo de ação passa pela inibição da mitose, durante o ciclo celular fúngico (13).

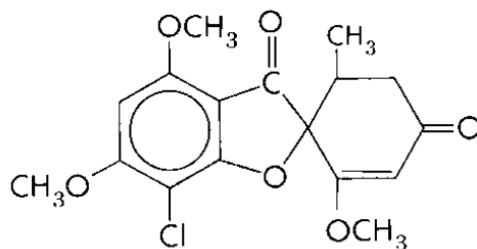


Figura 7 - Estrutura química da griseoflavinina (Fonte: Brunton et.al 2005(12))

Em suma, existem várias classes de antifúngicos. Para além de as dividirmos por estrutura e constituição podemos ainda dividi-las por mecanismo de ação. Existem moléculas que atuam na membrana célula, inibindo a síntese de ergosterol (azóis e alilaminas) ou interferindo com a integridade física da membrana (polienos). Outras que atuam na parede celular da célula fúngica (equinocandinas) e por fim os que atuam no núcleo da célula (flucitosina e griseoflavinina).

2. Farmacocinética dos antifúngicos

2.1 Polienos

Todas as preparações de anfotericina B são administradas através de infusão intravenosa, uma vez que a sua absorção entérica é desprezável. Em relação à preparação clássica de anfotericina B, com desoxicolato de sódio, podemos realçar uma ligação a proteínas no plasma de 95-99%, principalmente à LDL, à albumina e a glicoproteína ácida alfa-1(10,14).

Deve ser administrada uma dose diária de 0.25–0.3 mg/kg e aumentar-se 5–10 mg por dia até se atingir a dose de manutenção diária de 0.6–1.0 mg/kg. As restantes variáveis farmacocinéticas estão descritas na tabela 1 (10).

Em relação à metabolização e eliminação, a anfotericina B depois de ser administrada dissocia-se do desoxicolato e liga-se às proteínas do plasma, acumulando se no baço e no fígado e, em menor quantidade, no rim, no pulmão, no miocárdio e no cérebro. (12). Com uma semi-

vida de eliminação de quase 15 dias, a anfotericina B não é metabolizada pelas enzimas da família do citocromo P450, mas sim excretada, sem alterações, na urina (33%) e nas fezes (43%) (9,10).

Tabela 1 - Características farmacocinéticas da preparação de anfotericina B desoxicolato (Adaptada de Bellmann et al.2017 (10)).

C _{max} (µg/mL)	AUC (µg h/L)	V _d (L/kg)	t _{1/2}	CL (mL/h/kg)	Referências
1.7–2.8	14–29	0.5–2.0	15–27	10–30	(10)

C_{max} – concentração máxima; AUC- área debaixo da curva; V_d– volume de distribuição; t_{1/2} - tempo de semi-vida; CL – clearance

Em relação às formulações lipídicas de anfotericina B, as doses são muito maiores do que as da preparação de anfotericina B convencional. Na preparação lipossomal a dose é de 3–4 mg/ kg por dia e, na preparação de complexo lipídico, a dose é de 5 mg/kg por dia (10,12). No que toca às características farmacocinéticas, estas são bastante diferentes nas duas formulações. Após a administração repetida de 5 mg/kg/ por dia de anfotericina B lipossomal, a concentração máxima foi de 90 µg/mL, sendo o tempo de semi-vida de 5–10 h. No complexo lipídico a concentração máxima foi de 2 µg/mL nas doses padrão. O volume de distribuição é relativamente pequeno no tratamento com a anfotericina B lipossomal, entre 0,1-0,2 L/kg, sendo o do complexo lipídico altamente variável e muito grande (até 131 L/kg) (10). As formulações lipídicas também não são metabolizadas e são excretadas sem alterações. No entanto, apenas 10% da formulação lipossomal de anfotericina B é encontrada nas fezes ou na urina. Tal poderá dever-se ao aumento do sequestro pelos tecidos devido ao *carrier* lipossomal, diminuindo a taxa de eliminação (2).

A nistatina, que se apresenta sob formulações tópicas, vaginais e suspensão, não tem praticamente absorção gastrointestinal. Sendo que passa a sua maior parte em forma não modificada, para as fezes, quando administrada por via oral, no caso da formulação de suspensão oral para o tratamento de o tratamento de candidíase oral. Para além disso, não é detetada qualquer concentração plasmática após administração tópica ou vaginal (15).

2.2 Pirimidinas

A flucitosina está disponível em formulações orais e via intravenosa. Quando administrada oralmente, a biodisponibilidade da flucitosina é cerca de 76-89%. Apenas 3-4%

se liga a proteínas plasmáticas. A dose recomendada de flucitosina é 100-150mg/kg por dia, distribuídos por 4 tomas por dia. Cerca de 90% é eliminado no rim, via filtração glomerular com um tempo de semi-vida de 3-4h. O volume de distribuição no *steady state* é 0.4-0.8 L/kg, resultando em concentrações máximas e mínimas de 50-100 µg/mL (2,10,12).

2.3 Azóis

Em relação ao perfil farmacocinético do grupo dos azóis, podemos também fazer a divisão entre imidazóis e triazóis.

No que toca aos imidazóis, o cetoconazol é o único com efeito sistémico (10). A sua biodisponibilidade é altamente variável, sendo a absorção melhorada através de comida e pH ácido. A sua ligação às proteínas plasmáticas, especialmente a albumina, é de 84% e 15% liga-se aos eritrócitos, sendo que apenas 1% existe como fármaco livre (10,12). A dose oral é entre 200 e 400 mg diários. É metabolizado no fígado em metabolitos inativos pelo CYP3A4, sendo eliminado através da biliar nas fezes. A sua eliminação do plasma é bifásica, a semi-vida de eliminação nas primeiras 10h é de 2h e na semi-vida terminal é à volta de 8h. Foi descrita também uma penetração favorável na urina, saliva, fluido sinovial, sebo e cerúmen (10,12).

Em relação aos triazóis, nomeadamente o fluconazol, o itraconazol, o isavuconazol e o voriconazol, as características farmacocinéticas principais estão descritas na tabela seguinte (tabela 2).

Tabela 2 - Características farmacocinéticas das preparações de triazóis (Adaptada de Bellmann et al.2017 (10))

	Fluconazol	Itraconazol	Isavuconazol	Voriconazol
Dose padrão	Dose de carga de 12 mg/kg (800 mg) seguida de dose de manutenção de 6 mg/kg (400 mg) diariamente via IV	Dose inicial de 200 mg 2x/dia, seguida de dose de manutenção 200 mg 1x/dia ou 2x/dia	Dose de carga de 200 mg 3x/dia no 1º e 2º dia com dose de manutenção de 200 mg uma vez ao dia, quer em administração IV quer em oral	Dose de carga de 6 mg/kg 2x/dia no 1º dia e dose de manutenção 4 mg/kg 2x/dia, na administração IV. Dose de carga de 400 mg 2x/dia no 1º dia e dose de manutenção de 200 mg 2x/dia, em administração oral

Tabela 2 – (Continuação)

	Fluconazol	Itraconazol	Isavuconazol	Voriconazol
Biodisponibilidade	>90 %	55 %	98 %	96%
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	9 após doses 400 mg via IV	0.3–1.3	2.6	4.4 após administração IV
V_d (L/kg)	0,7	11	~6.5	4.5
$t_{1/2}$	30 h	30 h	80–120 h	~6h
Ligação às proteínas	12 %	99 %	99%	58 %
CL (mL/h/kg)	15-24	Dose dependente, altamente variável	~30–70	~100
Metabolismo	Metabolização hepática muito reduzida	Metabolismo hepático excessivo pelo CYP3A4	Metabolismo hepático pelo CYP3A4 e UGT	Metabolismo hepático pelo CYP2C9, CYP2C19, e CYP3A4
Eliminação	Renal, com reabsorção tubular	54% nas fezes e 35% na urina	Excreção na urina mínima de isavuconazol não modificado. Metabolitos eliminados de forma igual na urina e fezes	Metabolitos inativos excretados ~80% na urina e ~20% nas fezes.
Distribuição tecidual	Saliva, urina, raspagens de pele, líquido e teto de bolhas, vagina e no líquido cefalorraquidiano	Pele, tecido adiposo, fígado, pulmão, rim, baço, osso e no músculo	Sem dados	Fígado, pulmão, líquido cefalorraquidiano e córtex adrenal, segundo estudos em tecido animal
Referências	(9,10,12)	(2,9,10,12)	(2,9,10,12)	(10,12)

C_{max} – concentração máxima; V_d – volume de distribuição; $t_{1/2}$ - tempo de semi-vida; CL - clearance

Em relação ao posaconazol, este está disponível em três formulações, cada uma com características diferentes. No que toca à primeira formulação, uma suspensão oral, esta apresenta uma pobre absorção e altamente variável (12). As doses são divididas ao longo do dia com 200 mg a serem administrados quatro vezes ao dia para uma maior exposição ao fármaco. Após uma dose única de 400mg, o $t_{1/2}$ é 29 h, C_{max} é 0.6 $\mu\text{g/mL}$, a ligação às proteínas plasmáticas é de 98 a 99 % e o volume de distribuição cerca de 20 L/kg (10). No que toca à

formulação oral em comprimidos, a dose é de 300 mg duas vezes por dia no 1º dia como dose de carga e 300 mg por dia como dose de manutenção. A C_{max} é de 2 µg/mL, o volume de distribuição cerca de 5 L/kg, a ligação às proteínas é também 98 a 99 % e o $t_{1/2}$ é ~ 35 h (10). Na solução para administração intravenosa, a dose é de 300 mg uma vez por dia no 1º dia como dose de carga e 300 mg por dia como dose de manutenção. A C_{max} é de 2,6 µg/mL, o volume de distribuição cerca de 3,7 L/kg, a ligação às proteínas é também 98 a 99 % e o $t_{1/2}$ é ~ 27 h (10). O posaconazol sofre glucuronidação no fígado pela UGT 1A4. Formam-se metabolitos inativos. Num estudo, após a ingestão de posaconazol marcado radioativamente, 77% da dose administrada foi recuperada nas fezes, 66% como fármaco não modificado e 14% da radioatividade foi detetada na urina, quase exclusivamente como metabolitos (10). Em relação à distribuição tecidual, poucos estudos foram realizados mas os níveis teciduais mais altos de posaconazol foram recuperados do fígado, rim, pulmão, miocárdio e cérebro (12).

2.4 Equinocandinas

Em relação ao grupo das equinocandinas, as características farmacocinéticas da caspofungina, da micafungina e da anidulafunina estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Características farmacocinéticas das preparações de equinocandinas (Adaptada de Bellmann et al.2017 (10)).

	Caspofungina	Micafungina	Anidulafungina
Dose padrão	Dose de carga de 70 mg/dia; dose de manutenção de 50 mg/dia (70 mg se o peso corporal for >80kg)	50 mg/dia para profilaxia, 100 mg/dia em candidemia, 150 mg/dia em candidíase esofágica.	Dose de carga 200 mg/dia e 100 mg/dia como dose de manutenção
Biodisponibilidade	100%	100 %	2-7 % oral e 100 % IV
C_{max} (µg/mL)	10	18 (dose de 150 mg)	7
V_d (L/kg)	0.3-2.0	0.3	0.6
$t_{1/2}$	8h	13-20h	40-50h
Ligação às proteínas	92.4-96.5%	99.9 %	99%
CL (mL/h/kg)	~10	~12	15

C_{max} – concentração máxima; V_d – volume de distribuição; $t_{1/2}$ - tempo de semi-vida; CL – clearance

Tabela 3 - (Continuação)

	Caspofungina	Micafungina	Anidulafungina
Metabolismo	Metabolização hepática	Metabolização hepática	Degradação espontânea no plasma
Eliminação	Metabolitos eliminados na urina	Metabolitos inativos eliminados nas fezes	Produtos da degradação eliminados via biliar nas fezes (90%)
Distribuição tecidual	Rins, fígado, baço, pulmão, eritrócitos e intestino delgado. Pequenas concentrações no coração, nódulos linfáticos, músculo, olhos e cérebro.	Em ratos e coelhos no pulmão e rim, fígado e cérebro. Em humanos, em macrófagos alveolares pulmonares.	Pulmão e fígado. Pequenas concentrações no cérebro de coelhos. Em humanos, em macrófagos alveolares pulmonares, células mononucleares do sangue periférico e em leucócitos polimorfonucleares
Referências	(9,10)	(9,10,12)	(9,10,12)

C_{max} – concentração máxima; V_d – volume de distribuição; t_{1/2} - tempo de semi-vida; CL – clearance

2.5 Alilaminas

No grupo das alilaminas, temos a terbinafina e a naftifina, esta última apenas com utilização tópica, sem alcance sistêmico.

Em relação à terbinafina, 70 a 80% é absorvida no trato gastrointestinal, sofrendo metabolismo de primeira passagem. As concentrações plasmáticas máximas de terbinafina, 860-1340µg/L, são atingidas dentro de 2 horas em doses orais únicas de 250 mg. Liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (99%). Distribui-se amplamente pelos tecidos, nomeadamente a pele e tecido adiposo. Possui um volume de distribuição de 948 L no estado de equilíbrio e a concentração plasmática de terbinafina diminui em 3 fases, com tempos de semi-vida aparentes de 1.1, 16 a 22 e 100 horas. É extensamente metabolizada no fígado e 80% da terbinafina é excretada na forma metabolizada na urina e 20% nas fezes (16).

2.6 Griseofulvina

Em relação à griseofulvina, esta está formulada em comprimidos e a dose é geralmente 500 a 1000 mg por dia em adultos.

A absorção ao nível do trato gastrointestinal é variável e incompleta, cerca de 50%. O tempo de semi-vida plasmática terminal varia de 9,5-21 h. A ligação da griseofulvina às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 84 %. A griseofulvina é metabolizada no fígado e é excretada na urina, principalmente sob a forma de metabolitos. Há uma deposição de griseofulvina na queratina recém-formada do cabelo, unhas e pele (17,18).

3. Resíduos e matrizes

Como podemos concluir, a maioria dos agentes antifúngicos é excretada ou através da urina, ou através das fezes. De notar ainda, que podemos observar uma maior excreção de fármacos não metabolizados nos efluentes urbanos (esgotos domésticos e hospitalares), assim como os respetivos produtos de metabolização e degradação.

4. Padrões de utilização de antifúngicos

4.1 Em Portugal

Segundo o relatório do Infarmed, realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sobre a “Evolução do consumo de antibióticos em Portugal Continental”, que utilizou o sistema de classificação *Anatomical Therapeutic Chemical* (ATC) e expressou o consumo de anti-infecciosos em doses diárias definidas por 1000 habitantes por dia (DHD), segundo entre 2000 a 2007 verificou-se, em Portugal, uma redução do consumo de anti-infecciosos em ambulatório e, no que toca aos antifúngicos/antimicóticos (grupo ATC J02), verificou-se uma variação de -21,65% como podemos verificar pela tabela seguinte, retirada do mesmo relatório (19).

Tabela 4 - Consumo total de anti-infecciosos em DHD, em ambulatório – 2000-2007 (Adaptado de Ramalinho *et al.* 2010).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Var.(%)
Antimicóticos (J02)	0,89	0,87	0,82	0,79	0,79	0,75	0,74	0,70	-21,65

Segundo o mesmo relatório, o itraconazol foi o antifúngico mais prescrito em todos os distritos de Portugal em 2007, seguido do fluconazol (19).

Tabela 5 - Consumo total de antimicóticos, em DHD, em ambulatório por molécula nos distritos em 2007 (Adaptado de Ramalinho *et al.* 2010)

	Cetoconazol (J02AB02)	Fluconazol (J02AC01)	Itraconazol (J02AC02)	Total (J02A)
Braga	0,055	0,264	0,601	0,920
Bragança	0,058	0,192	0,329	0,579
Porto	0,037	0,228	0,517	0,781
Viana do Castelo	0,064	0,199	0,692	0,955
Vila Real	0,052	0,165	0,283	0,501
Aveiro	0,074	0,263	0,650	0,987
Castelo Branco	0,058	0,182	0,228	0,468
Coimbra	0,077	0,211	0,381	0,670
Guarda	0,054	0,193	0,261	0,508
Leiria	0,067	0,326	0,554	0,946
Viseu	0,033	0,200	0,280	0,514
Lisboa	0,072	0,214	0,343	0,630
Santarém	0,069	0,257	0,439	0,765
Setúbal	0,094	0,222	0,283	0,598
Beja	0,069	0,175	0,344	0,588
Évora	0,171	0,142	0,449	0,763
Portalegre	0,022	0,206	0,251	0,478
Faro	0,082	0,227	0,311	0,620
Continente	0,065	0,228	0,430	0,722

Noutro relatório, também do Infarmed, sobre o consumo de antibióticos em meio ambulatório e meio hospitalar entre 2011 e 2014, apenas conseguimos verificar uma diminuição da utilização de anti-infecciosos em Portugal até 2013 e um ligeiro aumento em 2014, grupo onde se incluem os antifúngicos, acabando por não se conseguir verificar a variação de cada

grupo farmacoterapêutico incluído nos anti-infecciosos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos e antiparasitários) em exclusivo, apenas os grupo dos antibióticos (20).

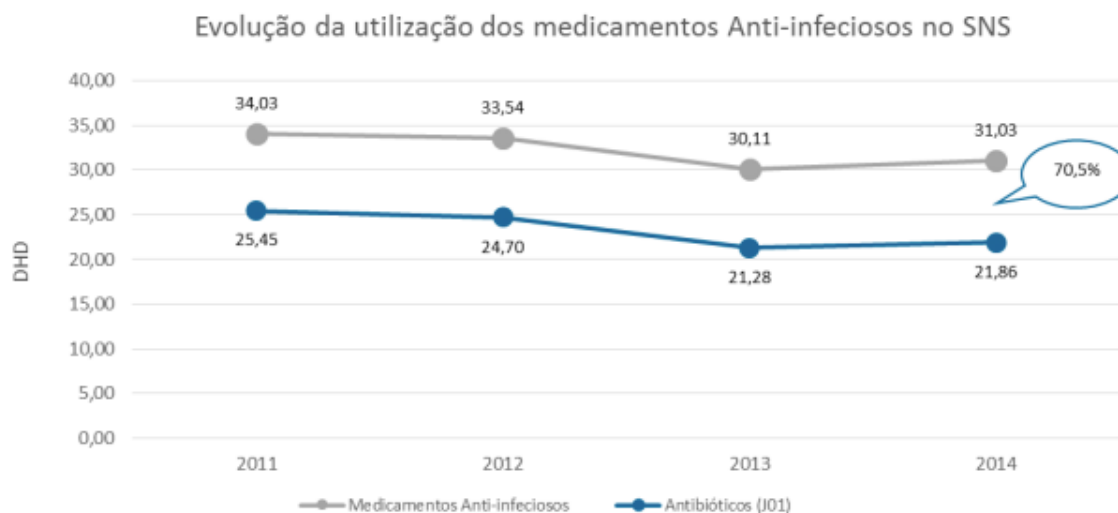


Figura 8 - Evolução da utilização de medicamentos anti-infecciosos no SNS. (Fonte: Silva et al.2014 (20))

4.2 No mundo

No que toca à utilização de antifúngicos de uma forma global, analisando o “*Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) Annual Epidemiological Report for 2020*” do Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), podemos observar alguns dados e números sobre os padrões de utilização desta classe de fármacos na Europa. Este relatório contou com dados de 29 países, 27 membros da União Europeia e 2 membros da Área Económica Europeia, Islândia e Noruega. Foram analisados dados sobre utilização de antimicóticos e antifúngicos para usos sistémico do grupo J02 e D01B da classificação ATC, para além de dados sobre antibióticos e antivirais, em meio ambulatorio e meio hospitalar (21).

Nesta área, o consumo comunitário de antifúngicos e antimicóticos na comunidade, ou seja, em ambulatorio, foi de 0.9 DHD. A terbinafina, o fluconazol e o itraconazol compreenderam entre 90 a 100% do total de consumo de antifúngicos na comunidade em 2020. Em meio hospitalar o consumo de antimicóticos e antifúngicos foi de 0.13 DHD (21).

Nas tabelas seguintes podemos verificar valores concretos de DHD nos vários países e em especial valores mais atualizados sobre a utilização de antifúngicos em Portugal. Na tabela referente a meio hospitalar, os dados de Portugal foram recolhidos de hospitais públicos no continente e na região autónoma da Madeira (21).

Tabela 6 - Consumo de antimicóticos (grupo ATC J02) e antifúngicos (grupo ATC D01B) para uso sistémico na comunidade, países da UE/EEE, 2020, expresso em DHD (Adaptado de (21))

País	GSF (D01BA 01)	TRF (D01B A02)	ANF B (J02AA 01)	CTZ (J02A B02)	FCZ (J02A C01)	ITZ (J02A C02)	VCZ (J02A C03)	Outros J02	Total J02 e D01B
Áustria	0	0,45	0,034	0	0,09	0,13	<0,01	0,01	0,72
Bélgica	0	1,61	0	0	0,60	0,44	<0,01	<0,01	2,67
Bulgária	0	0,24	0	0	0,37	0,12	0	0	0,73
Croácia	0	0,16	0	0	0,08	0,10	0	0	0,34
Chipre (a)	0,24	1,26	0,026	<0,01	0,46	1,33	0,01	0,02	3,36
Chéquia (a)	0	0,34	<0,01	<0,01	0,18	0,08	0,01	0,02	0,64
Dinamarca	0	1,01	<0,01	0	0,28	0,08	<0,01	0	1,38
Estónia		1,04	0	0	0,14	0,14	<0,01	0,02	1,35
Finlândia	0	1,42	0	<0,01	0,20	0,08	<0,01	<0,01	1,72
França	0,11	0,80	0	0	0,22	0,03	0,01	<0,01	1,17
Alemanha	0	0,53	<0,01	0	0,09	0,08	<0,01	0,01	0,72
Grécia	0	0,22	<0,01	0	0,84	0,35	<0,01	<0,01	1,41
Hungria	0	0,64	0	<0,01	0,18	0,09	<0,01	<0,01	0,91
Islândia	0	2,41	0	0	0,44	0,13	<0,01	<0,01	2,99
Itália	0,03	0,11	0	<0,01	0,38	0,23	<0,01	0	0,74
Letónia	0	0,43	0	0	0,12	0,21	<0,01	0	0,76
Lituânia	0	0,45	0	0	0,12	0,07	<0,01	<0,01	0,65
Luxemburgo	0	0,34	0	0	0,41	0,45	0	0	1,20
Malta	<0,01	0,23	<0,01	0	0,74	0,07	<0,01	<0,01	1,05
Holanda	<0,01	0,75	<0,01	0,004	0,11	0,20	0,01	0,01	1,09
Noruega	0	1,21	0	0	0,17	0,01	<0,01	0,01	1,40
Polónia	0	0,20	0	0	0,43	0,20	<0,01	0,01	0,84
Portugal	0	1,07	0	0	0,24	0,24	0	0	1,55
Roménia	0	0,18	0	0	0,33	0,15	<0,01	<0,01	0,67
Eslováquia	0	0,37	0	0,007	0,18	0,10	<0,01	<0,01	0,66
Eslovénia	0	0,49	0	0	0,08	0,09	<0,01	0,02	0,69
Espanha	0	0,17	0	0	0,10	0,10	0	0	0,37
EU/EEA	0,02	0,49	<0,01	<0,01	0,24	0,14	0,01	<0,01	0,90

(a) Chipre e a Chéquia forneceram dados dos cuidados ambulatoriais e hospitalares em simultâneo.

Tabela 7 - Consumo de antimicóticos (grupo ATC J02) e antifúngicos (grupo ATC D01B) para uso sistémico em meio hospitalar, países da UE/EEE, 2020, expresso em DHD (*Adaptado de (21)*)

Países	GSF (D01BA 01)	TRF (D01B A02)	ANF B (J02AA 01)	CTZ (J02AB0 2)	FCZ (J02AC 01)	ITZ (J02AC0 2)	VCZ (J02AC 03)	Outros J02	Total J02 e D01B
Áustria	0	<0,01	0,02	0	0,03	<0,01	<0,01	0,02	0,8
Bélgica	0	0,01	0,01	0	0,05	<0,01	0,01	0,02	0,09
Bulgária	0	<0,01	<0,01	0	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	0,05
Croácia	0	<0,01	0,01	<0,01	0,05	<0,01	0,01	0,02	0,09
Dinamarca	0	<0,01	0,02	<0,01	0,11	0,01	0,01	0,05	0,21
Estónia	0	0,01	0,01	0	0,04	0,02	<0,01	0,01	0,10
Finlândia	0	0,01	0,01	0	0,03	<0,01	<0,01	0,01	0,07
França	0	0,01	0,13	0	0,05	<0,01	0,01	0,04	0,23
Grécia	0	<0,01	0,01	0	0,17	0,01	0,01	0,06	0,26
Hungria	0	<0,01	0,01	0	0,02	<0,01	<0,01	0,01	0,04
Irlanda	0	<0,01	0,02	0	0,03	<0,01	<0,01	0,02	0,07
Itália	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	0,05	0,01	0,01	0,04	0,12
Letónia	0	<0,01	<0,01	0	0,03	0,01	<0,01	<0,01	0,05
Lituânia	0	<0,01	<0,01	0	0,03	<0,01	<0,01	0,01	0,04
Luxem- burgo	0	<0,01	0,01	0	0,04	<0,01	0,01	0,01	0,08
Malta	<0,01	0	0,04	0	0,04	0,02	0,01	0,02	0,12
Noruega	<0,01	<0,01	0,01	0	0,02	<0,01	<0,01	0,02	0,05
Polónia	0	<0,01	<0,01	0	0,05	<0,01	0,01	0,02	0,08
Portugal	0	<0,01	0,03	<0,01	0,05	<0,01	0,02	0,02	0,14
Roménia	0	<0,01	<0,01	0	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	0,05
Eslováquia	0	<0,01	<0,01	0	0,09	<0,01	<0,01	0,01	0,10
Eslovénia	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	0,03	<0,01	0,01	0,02	0,08
EU/EEA	<0,01	<0,01	0,04	<0,01	0,05	<0,01	0,01	0,03	0,13

No resto do mundo, especificamente nos Estados Unidos da América (EUA), foi conduzido um estudo, com dados de 2006 a 2012, para averiguar a utilização de antifúngicos em alguns dos hospitais desse país. Na tabela seguinte, retirada desse mesmo estudo, podemos verificar a proporção de altas hospitalares em que um doente recebeu pelo menos uma dose de um antifúngico durante a sua estadia. Podemos verificar nesses dados que o fluconazol, do grupo dos azóis, constitui o antifúngico mais utilizado em meio hospitalar nos EUA (22).

Tabela 8 - Proporção de altas hospitalares em um doente recebeu pelo menos uma dose dos antifúngicos correspondentes durante a sua estadia (2006-2012). Estimativas extrapoladas através do *Truven MarketScanVR HD* (Adaptada de Vallabhaneni et al. 2018 (22))

Classe de antifúngicos	Ano							Total
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Todos os antifúngicos sistémicos	2,66%	2,70%	2,73%	2,73%	2,75%	2,74%	2,67%	2,71%
Polienos	0,09%	0,09%	0,08%	0,07%	0,07%	0,06%	0,06%	0,07%
Equinocandinas	0,22%	0,25%	0,29%	0,32%	0,33%	0,35%	0,33%	0,30%
Azóis (total)	2,51%	2,52%	2,54%	2,51%	2,52%	2,51%	2,44%	2,51%
Azóis: Fluconazol	2,40%	2,40%	2,42%	2,39%	2,38%	2,38%	2,30%	2,38%
Azóis: Cetoconazol	0,018%	0,021%	0,020%	0,018%	0,020%	0,015%	0,015%	0,02%
Azóis: Posaconazol	0%	0,004%	0,010%	0,012%	0,013%	0,009%	0,010%	0,009%
Azóis: Voriconazol	0,105%	0,108%	0,108%	0,113%	0,115%	0,114%	0,117%	0,11%
Outros antifúngicos	0,03%	0,03%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%

Apesar de os dados serem escassos relativamente aos padrões de utilização de fármacos com atividade antifúngica, estes parecem indicar que quer seja em meio ambulatório, quer seja em meio hospitalar, os azóis parecem ter uma predominância de utilização em Portugal, na Europa e nos EUA, em especial o fluconazol.

Capítulo III. Contaminantes de interesse emergente

1. Contaminante *versus* poluente

Um poluente ou contaminante, refere-se a substâncias que não fazem parte e não são desejadas em determinado compartimento ambiental. No entanto, um poluente é uma substância indesejada e nociva, ao passo que um contaminante é apenas uma substância que não deveria estar presente naquela matriz ou meio. Ou seja, todos os poluentes são contaminantes, mas nem todos os contaminantes serão poluentes (23).

A contaminação, ou poluição, desenvolve-se a partir de todos os setores de atividade humana, quer esta seja industrial, agrícola ou doméstica (24). Deve-se não só a causas naturais, como o petróleo, mas também a causas antropogénicas, como os contaminantes orgânicos resultantes da incineração de resíduos ou as lamas contaminadas das estações de tratamento de água ou água residual. Outra fonte substancial de contaminação é a indústria química, produzindo várias substâncias contaminantes como pesticidas, fertilizantes, entre outros (24).

Nas últimas duas décadas, a presença dos vários tipos de contaminantes, mesmo em concentrações vestigiais, nas várias matrizes ambientais, como o solo, a atmosfera, sedimentos, biota e, especialmente, na água, tem preocupado a sociedade, as autoridades de saúde pública e a indústria. De facto, a presença destas substâncias é um desafio que irá ser colocado a vários setores da sociedade, quer industriais, quer políticos (24,25).

1.1 Definição

Os contaminantes de interesse emergente do inglês *contaminants of emerging concern* (CECs,) são contaminantes ou poluentes não regulamentados, que podem tornar-se candidatos para futuras regulamentações, dependendo dos resultados dos estudos sobre a sua toxicidade e/ou efeito nefasto sobre o meio ambiente, na saúde humana e animal e dos dados de monitorização relativos à sua ocorrência no meio ambiente. Também são considerados CECs, compostos recentemente introduzidos no meio ambiente (por exemplo, medicamentos aprovados recentemente pelas autoridades competentes e que devido ao seu uso começam a entrar no ambiente), compostos que se encontram presentes no meio ambiente há já algum tempo, mas cuja presença só recentemente tem sido detetada ou o poluente convencional já legislado, mas que, devido a novos dados referentes à sua ocorrência, destino ou efeitos adversos, tornou-se de novo foco de atenção (26) .

Não obstante, estes contaminantes podem tornar-se aptos para regulamentações futuras, se se demonstrar a sua toxicidade e efeitos prejudiciais para a saúde humana e animal e também para o ambiente (25,27). O termo “emergente” pode levar à interpretação incorreta de que a presença do contaminante é nova no ambiente; no entanto, apenas significa que, no momento presente, está a ganhar notoriedade junto da comunidade científica e das agências regulamentares (27). Não existe uma definição globalmente aceite, sendo que podemos encontrar, na variada literatura existente sobre este tema, diversas interpretações e definições deste termo, dependendo da perspetiva do autor e do seu objetivo (28). Por exemplo, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) define contaminante de interesse emergente como uma substância química ou um material identificado como uma ameaça, potencial ou real, para a saúde humana ou para o meio ambiente. Consideram também uma ameaça quando existe uma lacuna nos padrões de saúde publicados sobre essa substância ou quando é descoberta uma nova fonte ou uma nova rota do contaminante até ao ser humano (29).

1.2 Perfil dos contaminantes de interesse emergente

Várias substâncias são consideradas CECs, de acordo com a comunidade científica e agências regulamentares. Podemos nomear algumas como fármacos, bem como compostos desreguladores endócrinos, como as hormonas esteroides, produtos de cuidado pessoal e cosméticos, produtos de limpeza doméstica, compostos industriais, pesticidas e outros produtos agrícolas, biocidas, nanomateriais, cianotoxinas e micotoxinas, microrganismos resistentes a antibióticos, compostos polifluorados, entre outros, de uma lista particularmente longa e que está sempre a ser atualizada (25,28).

Foram feitas diversas tentativas de classificar estes compostos e de os agrupar num sistema de classificação. No entanto, não há nenhum oficialmente aceite. A figura 9 apresenta uma das classificações propostas para os CECs, bem como alguns tópicos preocupantes relacionados com estes.



Figura 9 -Classificação e tópicos preocupantes sobre CECs (Adaptado de Morin-Crini et al. 2011(28))

1.3 Principais fontes de contaminação

A maioria destes CECs chegam às águas através de fontes antropogênicas bem conhecidas, particularmente através dos efluentes domésticos, hospitalares, industriais, agropecuários (escoamento de águas da agricultura, pecuária e aquacultura) e lixiviados de aterros sanitários (28). Estas substâncias são detetadas nas águas geralmente em concentrações vestigiais, na ordem dos ng/L a µg/L. A grande diversidade de contaminantes pode dificultar os sistemas de detecção e análise, mas também os sistemas de tratamento, principalmente os das estações de tratamentos de águas residuais (ETAR), as quais não foram delineadas para eliminar tais substâncias (30).

As ETAR são instalações cuja função é, através de processos físicos, químico e biológicos, a remoção de poluentes das águas residuais que chegam a essa mesma estação (31). A seleção dos processos é feita com base nas características da água a tratar e também das condições requeridas no efluente final. Sendo assim, o processo de tratamento de águas residuais pode agrupar-se em vários níveis, como o pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário. No pré-tratamento, os sólidos mais grosseiros, areias e gordura são removidos das águas de modo a prepará-las para os níveis seguintes. No tratamento

primário são removidos sólidos suspensos e matéria orgânica através de processos de sedimentação e flutuação. No tratamento secundário recorrendo a processos biológicos, como lamas ativadas, ocorre a remoção da matéria orgânica através da degradação destas por microrganismos num ambiente controlado. Um último tratamento pode ser aplicado quando se pretende uma qualidade da água mais elevada, o tratamento terciário, onde se aplicam outras operações e processos adicionais com o objetivo de remover constituintes residuais presentes, como nutrientes, organismos patogénicos e parasitas e substâncias tóxicas. Neste tratamento podem ser utilizados processos de desinfecção, ozonização, utilização de carvão ativado, entre outros métodos, sendo que estes últimos, a ozonização e adsorção a carvão ativado, fazem parte dos métodos eficazes na remoção dos CECs (32,33). As ETAR eliminam principalmente nutrientes, organismos patogénicos e alguns contaminantes. No entanto, as taxas de remoção dos CECs através destas ETAR continuam a não ser as pretendidas, sendo uma das principais origens destes contaminantes em matrizes aquáticas.

Os CECs foram detetados em diferentes tipos de águas, incluindo águas residuais, águas superficiais, águas subterrâneas e ainda água potável (28,30). Na tabela 9 podemos observar algumas das principais fontes de alguns CECs.

Outro fator importante é a capacidade de contaminação a uma longa distância do ponto de contaminação, usando a água como veículo de propagação da contaminação. Devido à sua estabilidade e à propriedade de transporte da água, estas substâncias podem ser encontradas em áreas onde a sua utilização pode até não ser recorrente. O ciclo de vida de distribuição destes CECs está ilustrado na figura 10 (34).

Tabela 9 -Fontes de CECs em ambiente aquático (Adaptado de Luo et al 2014 (30))

Contaminante	Subclasses	Principais fontes	Referências
Fármacos	<p>AINEs</p> <p>Antidislipídemicos</p> <p>Anticonvulsivantes</p> <p>Antibióticos</p> <p>Betabloqueadores</p> <p>Antidepressivos</p>	<p>Efluentes domésticos;</p> <p>Efluentes hospitalares;</p> <p>Escoamento de explorações agropecuárias.</p> <p>Lixiviados de aterros sanitários</p>	(35)
Produtos de cuidado pessoal e cosméticos	<p>Fragrâncias</p> <p>Desinfetantes</p> <p>Filtros UV</p> <p>Repelentes de insetos</p> <p>Champôs</p> <p>Pastas dentífricas</p>	<p>Efluentes domésticos decorrentes de atividades diárias (banho, higiene oral, eliminação indevida de produtos)</p>	(36)
Pesticidas	<p>Inseticidas</p> <p>Fungicidas</p> <p>Herbicidas</p>	<p>Aplicação direta nas matrizes aquáticas para desinfecção;</p> <p>Uso em ETARs;</p> <p>Escoamento de solos agrícolas, jardins, e outros terrenos tratados e irrigados com pesticidas.</p>	(37)
Substâncias industriais	<p>Surfactantes</p> <p>Compostos perfluorados</p> <p>Retardadores de chama</p>	<p>Efluentes industriais;</p> <p>Aterros sanitários (eliminação indevida dos produtos).</p>	(30)

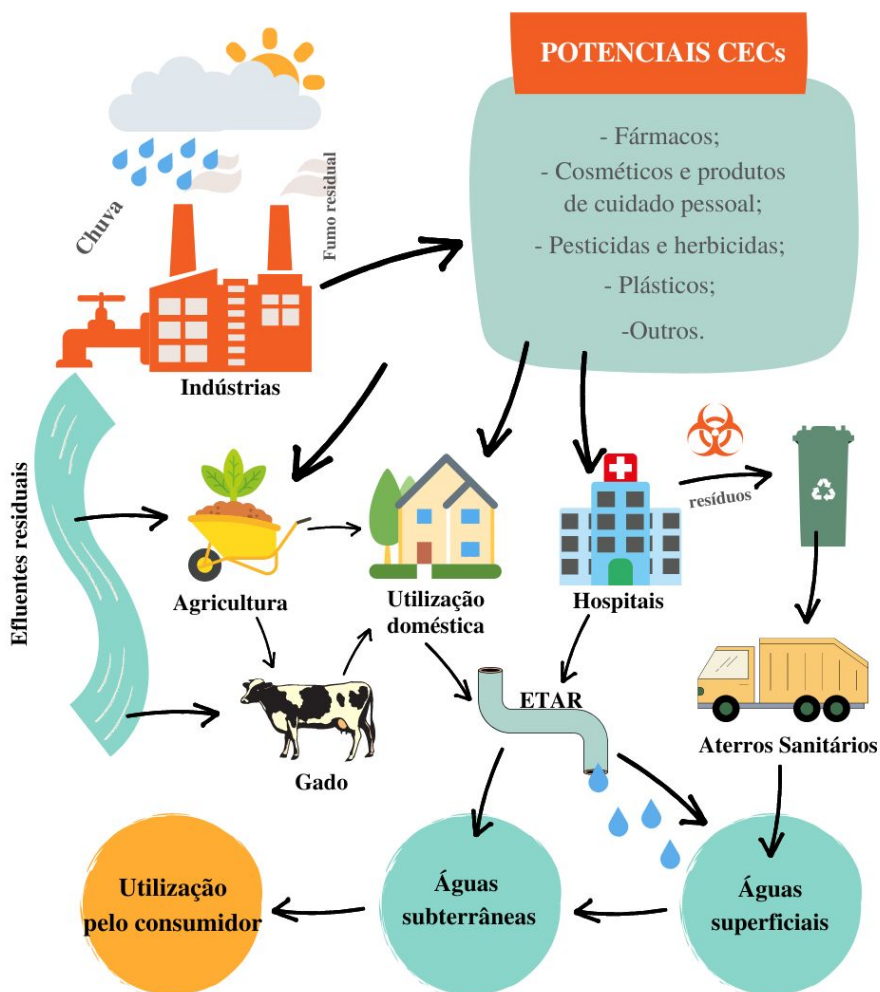


Figura 10 - Ciclo de vida de distribuição de CECs (Adaptado de Rasheed et al. 2019 (34))

1.4 Quantificação dos CECs

A determinação destes compostos de interesse emergente em matrizes ambientais, nomeadamente nas águas, foi possível devido ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas que permitem detetar estes compostos até ao ng/L, como a cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) acopladas a espectrometria de massa (MS) ou a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) (38,39). Este último método é o mais usado na deteção de CECs em matrizes complexas, como as amostras de água residual, devido à sua sensibilidade, especificidade e seletividade (34).

A escolha entre cromatografia gasosa ou líquida vai depender das propriedades físico-químicas dos compostos a detetar. Compostos voláteis e semi-voláteis são analisados por cromatografia gasosa e os não voláteis, por cromatografia líquida (28). Quando à escolha do

analisador de massa, existe atualmente uma grande variedade, nomeadamente, de quadrupolo, analisador de captura de iões (*ion trap*), analisador por tempo-de-voe (*Time-of-flight*), triplo quadrupolo e *Orbitrap* (34,40).

Antes da análise da amostra, há alguns passos que podem ser necessários para uma análise mais correta e, segundo estimativas, esta etapa pré-análise ocupa cerca de 70-90% do tempo total (41). A colheita, a extração e a limpeza da amostra são etapas pré-análise bastante importantes e que podem afetar o resultado final da análise (27). A extração líquido-líquido tem sido largamente utilizada, porém, a utilização da extração em fase sólida tem aumentado nos últimos tempos pela sua reprodutibilidade, aplicabilidade e simplicidade (34). Outros métodos convencionais podem ser utilizados, como o *Soxhlet* e extração assistida por ultrassom, mas também outras técnicas recentes, como a microextração em fase sólida (MEFS) (42). Existe também a possibilidade de utilizar a extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) para extração em amostras sólidas como sedimentos, solos e biota (28).

Os fármacos, por exemplo, são maioritariamente detetados através de cromatografia gasosa (CG) ou líquida (CL), dependendo da sua polaridade, acoplados a espectrometria de massa ou a espectrometria de massa *tandem*, sendo que atualmente a CL associada à MS/MS é a técnica mais utilizada para detetar fármacos devido à sua sensibilidade (38,43,44). No entanto, continua a ser um dos grandes desafios para investigadores, devido à diversidade das propriedades químicas dos fármacos e também dos baixos níveis de concentração que estes apresentam nas matrizes a analisar (38).

Na tabela 10 estão mencionados alguns métodos de extração e análise de alguns CECs.

Tabela 10 -Métodos de extração e análise de alguns CECs (Adaptado de Almeida 2021(44))

Matriz	Classe de CEC	Contaminantes	Método de extração	Método de análise	Referência
Águas superficiais e Residuais	Fármacos	Amitriptilina, aspirina, cafeína, carbamazepina, clenbuterol, diazepam, diclofenac, doxepina, gemfibrozil, ibuprofeno, imipramina, cetoprofeno, naproxeno, nordazepam, paracetamol, salbutamol, terbutalina	EFS	CG – MS depois de derivatização com MSTFA	(45)
Águas superficiais e Residuais	Fármacos	Claritromicina, eritromicina, azitromicina e diclofenac	EFS <i>online</i>	UHPLC acoplada ao analisador triplo quadropolo	(46)
	Produtos de cuidado pessoal	BHT (agente antioxidante) e EHMC (filtro UV)			
	Pesticidas Inseticidas Herbicidas	Metiocarbe, triatato, imidacloprida, tiaclopride, tiametoxam, clotianidina, acetamiprida, oxadiazon			
	Hormonas	E1, E2 e EE2			
Águas Residuais	Fármacos	Amitriptilina, carbamazepina, clomipramina, ciclobenzaprina, diclofenac, eritromicina, fluoxetina, indometacina, ácido mefenâmico, paroxetina, ácido salicílico, sulfacetamida, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, ácido tolfenâmico, triclosano e trimetoprim	MEFS	UHPLC com analisador de captura de iões linear + <i>Orbitrap</i>	(47)
	-	Acesulfame K (adoçante alimentar e excipiente de medicamentos)			

MSTFA - N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida; BHT – 2,6- di-terc-butil-4-metilfenol;

EHMC- 2-etilhexil-4-metoxicinamato; UHPLC- Cromatografia líquida de ultra eficiência ;E1-estriona ;E2- 17-β-estradiol;

EE2- 17-α-etinilestradiol

1.5 Remoção de CECs

O impacto dos CECs está a aumentar exponencialmente devido ao aumento do uso de fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas, entre outros contaminantes referidos anteriormente. Como tal, existe uma necessidade acrescida de controlar os seus valores limite nas matrizes aquáticas (48).

As ETAR não estão desenhadas para eliminar este tipo de substâncias na sua totalidade, apesar das suas diversas etapas de tratamento, sendo a remoção destes contaminantes insuficiente (30,49). Assim, para além das técnicas de remoção de CECs convencionais, como

processos de adsorção com carvão ativado e biodegradação, novas técnicas avançadas foram e estão a ser desenvolvidas como a oxidação avançada, ozonização, adsorção a matérias não sólidas, utilização de enzimas e nanofiltração (24,50).

Durante o tratamento primário nas ETAR, fragrâncias, como a galaxolida e a tonalid, são bem removidas. Os desreguladores endócrinos são removidos de forma moderada, desde 13% (monoetoxilato de nonilfenol) a 43% (bisfenol A). Certos fármacos e hormonas têm uma taxa de remoção de apenas 28% (diclofenac e estriol) (30). No tratamento secundário, os contaminantes sofrem diversos processos, incluindo biodegradação e transformação abiótica. Na biodegradação, uma técnica considerada eficaz, os contaminantes são biologicamente degradados em vários graus. Para os fármacos, mesmo que no mesmo grupo terapêutico, a biodegradabilidade pode apresentar grande variabilidade. Por exemplo, entre os AINEs, o diclofenac exibiu baixa biodegradação, 25%, enquanto o ibuprofeno e o cetoprofeno tiveram uma biodegradação maior, 75%. Os antibióticos geralmente não são facilmente biodegradáveis. Os pesticidas, como atrazina, fluconazol e tebuconazol, são particularmente resistentes nas ETAR (30).

A remoção destes contaminantes nas ETAR depende também das próprias características das substâncias, como a sua polaridade e pKa, mas também de fatores relacionados com as ETAR, como o tempo de retenção da lama, na ETAR (30).

Outro método, utilizado na remoção destes contaminantes é a adsorção com carvão ativado, devido à grande área de superfície específica e alta porosidade do carvão ativado (51). Este pode ser utilizado em pó ou granulado e, geralmente, é mais eficaz a remover contaminantes na água do que o processo de coagulação-floculação. Em relação à adsorção com carvão em pó, o desempenho na eliminação de contaminantes depende da dose e do tempo de contato do carvão em pó, da estrutura molecular e do comportamento do composto alvo, bem como da composição água/águas residuais (30,52). Também com o uso de carvão em pó granulado, é necessário ter em atenção certas condições como o tempo de contato, a regeneração regular do carvão, a forma e tamanho dos poros, os volumes dos carvões ativados, tipo de carvão e a carga superficial dos compostos (30). A adsorção recorrendo a nanotubos de carvão, minerais de argilas e *Biochar*, uma substância à base de carvão produzida pela decomposição térmica da biomassa sob um acesso insignificante ou limitado de oxigénio, podem ser métodos a utilizar (30,53).

Também a ozonização e os processos de oxidação avançados estão sob investigação para a remoção de CECs das águas. Estes processos são muito eficientes na oxidação de vários compostos orgânicos e inorgânicos. Baseiam-se na geração de radicais livres, espécies

altamente reativas, que podem atacar a maioria das moléculas orgânicas (54). Estes métodos mostram alguma superioridade em relação aos tratamentos convencionais, como altas taxas de degradação e não são seletivos. O ozono pode degradar contaminantes direta e indiretamente, principalmente através da formação de um agente oxidante mais forte e menos seletivo, o radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). A suscetibilidade dos contaminantes à ozonização é diferente para as várias substâncias. O naproxeno, por exemplo, é suscetível tanto à ozonização, como a outros processos de oxidação avançada. A atrazina apenas é suscetível ao radical $\bullet\text{OH}$ e a tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) não é degradada através de nenhum meio de oxidação (30). Em alguns casos, as taxas de remoção obtidas por ozonização direta foram baixas, 8 a 30%, mas quando a ozonização é realizada com a presença de carvão ativado, a taxa de remoção pode chegar aos 100%. Como tal, a associação de diferentes técnicas pode ser também eficaz na remoção de CECs (54). Outro método de oxidação é a radiação UV. Esta remove significativamente (90%) alguns compostos (cetoprofeno e diclofenac), embora não tenha sido eficaz na remoção de macrólidos (24% -34%) (30).

A utilização de filtração recorrendo a membranas é também útil na remoção destes contaminantes. A microfiltração e ultrafiltração geralmente não são muito eficazes na remoção dos CECs, devido ao diâmetro dos poros ser superior ao tamanho das moléculas. Assim, recorre-se muitas vezes à combinação com outros tipos de filtração, como a nanofiltração e osmose reversa, permitindo uma eficácia muito maior na remoção dos contaminantes (30). No entanto, certos contaminantes relativamente pequenos, como alguns fármacos, de cuidado pessoal e alguns perfluoroquímicos, podem ser permeáveis a estas membranas devido ao seu diâmetro reduzido (55).

A associação do tratamento biológico das lamas juntamente com processos de filtração (micro e ultrafiltração) cria outro método de remoção de contaminantes, os chamados bioreatores de membrana (MBR). Este processo tem vantagens em relação aos métodos convencionais, como a alta qualidade do efluente, excelente capacidade de separação microbiana, controlo absoluto do tempo de retenção das lamas, alto teor de biomassa, necessidade de pouco espaço para a instalação e possibilidades de uma integração flexível nas ETAR já existentes (30,56).

Por fim, a utilização de certas enzimas para a biodegradação de certos compostos contaminantes tem vindo a ser estudada e desenvolvida. Estas enzimas são principalmente de famílias de oxidorreduções como a lignina peroxidase, manganés peroxidase, certas lacases e tirosinases e a peroxidase de rábano (34,57).

1.6 Consequências e impacte ambiental

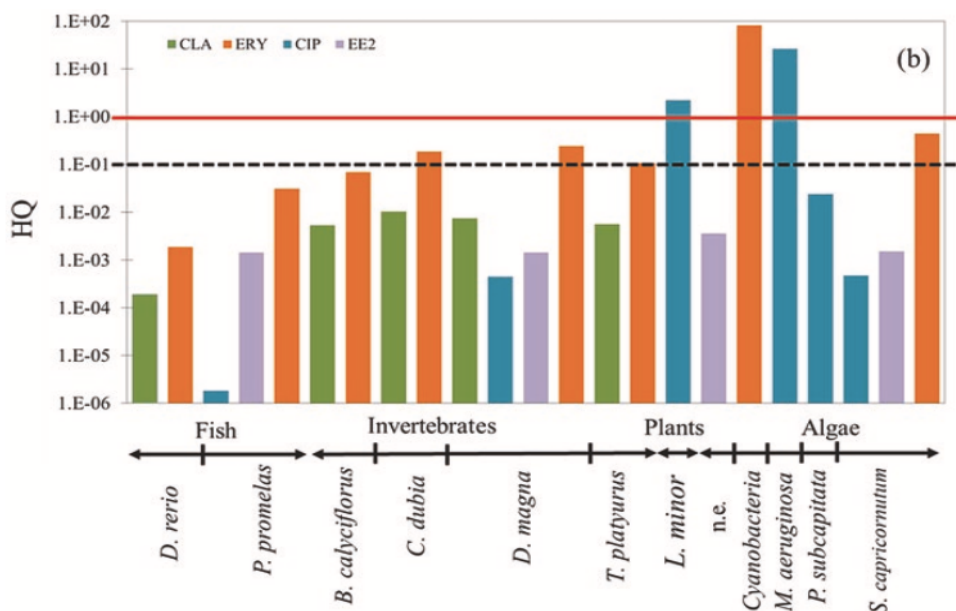
A remoção incompleta destes contaminantes nas ETAR tem, como consequência, a presença destas substâncias nas águas devolvidas ao meio, após tratamento. Estes efluentes acabam por atingir aquíferos, devido à estreita interação das águas subterrâneas com as águas superficiais, principalmente os rios. Consequentemente, podem atingir meios aquáticos próximos, mas também outros mais distantes e promover alterações nesse meio e nos organismos que nele se encontram (58). Para investigar os efeitos tóxicos dos CECs no meio ambiente, é importante monitorizar o nível de ecotoxicidade dos CECs no ecossistema aquático, através de indicadores específicos (48). Recorre-se a vários bioensaios utilizando vários organismos para determinar os níveis de toxicidade como o *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio* e *Pimephales promelas*, os invertebrados aquáticos *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Americamysis bahia*, *Mysidopsis bahia*, *Thamnocephalus platyurus* e *Brachionus calyciflorus*, e ainda algumas plantas e algas *Lemna gibba* e *Lemna minor*, *Scenedemus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Selenastrum capricornutum* e *Microcystis aeruginosa* (58). Um dos mais utilizados é o crustáceo *Daphnia magna*. Neste bioensaio, os CECs com valores de EC 50 (concentração que produz 50% do efeito máximo para esses contaminante) entre 10 e 100 mg/L são identificados como compostos nocivos, de 1 a 10 mg/L, como tóxicos, e < 1 mg/L como muito tóxicos para a vida aquática (48,59). Vários anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o naproxeno, acetaminofeno, diclofenac e ibuprofeno, antibióticos, como o sulfametoxazol, trimetoprim e eritromicina, antidiabéticos e a carbamazepina (antiepilético) são altamente tóxicos e prejudiciais à vida aquática. A presença de antibióticos, pode levar à geração de bactérias resistentes e genes resistentes a antibióticos em certos organismos. Da mesma forma, os desreguladores endócrinos podem provocar desregulação nos sistemas endócrinos dos organismos, por exemplo o aumento de níveis de testosterona em peixes, que se vão propagar através da cadeia alimentar. Também o sistema imunitário e reprodutor de certos animais pode sofrer alterações com certas exposições aos CECs e pode haver a inibição da taxa de crescimento de algas, bactérias e fungos no meio aquático (48). Outro quociente utilizado para a ecotoxicidade de contaminantes em águas superficiais, segundo as diretrizes da Agência Europeia do Medicamentos (EMA), é o quociente de perigo (QP) através da equação 1:

$$QP = \frac{\text{Concentração ambiental medida da substância}}{\text{Concentração prevista sem efeito no organismo(CPSE)}} \quad \text{Eq. 1}$$

Quando os dados de toxicidade não estão disponíveis, podemos estimar a concentração prevista sem efeito no organismo, através da equação 2, recorrendo ao valor EC 50 ou da LC50 (concentração letal para 50% dos organismos testados durante um período de observação) (58).

$$CPSE = \frac{EC50 \text{ ou } LC50}{1000} \text{ Eq. 2}$$

Quando o QP é superior a 1, o contaminante apresenta um elevado risco ecotoxicológico, quando está entre 0,1 e 1 apresenta um risco médio e abaixo de 0,1 apresenta um risco mínimo (60). Na figura 14 é possível ver os QP de alguns fármacos analisados em águas superficiais, mostrando que as plantas e as algas são os organismos mais afetados por alguns destes contaminantes, especialmente pela eritromicina e pela ciprofloxacina.



Legenda: CIP- ciprofloxacina, CLA- claritromicina, EE2 - 17-alfa-etinilestradiol, ERY- eritromicina,

Figura 11 - Quocientes de perigo (HQ, em inglês) para produtos farmacêuticos e 17-alfa-etinilestradiol para diferentes espécies de peixes, invertebrados, plantas, algas e crustáceos (Retirado de (Jurado et.al 2021 (58))).

1.7 Consequências e impacte na saúde humana

A presença de CECs nas matrizes aquáticas, nomeadamente na água de consumo humano, apresenta um elevado risco para a saúde humana. Quando expostos por tempo indeterminado a determinada concentração de um tipo de composto, pode desenvolver-se toxicidade crónica, bem com vários tipos de doenças e incapacidades (61). Os métodos de determinação de toxicidade, usados atualmente, apresentam resultados sobre toxicidade aguda devido a tempos de exposição reduzidos e, raramente, apresentam resultados sobre uma exposição crónica a um

tipo de contaminante. Isto demonstra uma limitação e algo a melhorar nesta área de investigação (48,61).

Um dos grandes problemas relacionados com CECs, especificamente com a classe dos antibióticos, tem sido o aparecimento de mais estirpes resistentes a antibióticos. A presença destes fármacos nas águas leva à absorção intestinal dos mesmos por humanos e animais, através de água ingerida, e a exposição crónica a este tipo de contaminantes pode levar ao aparecimento de bactérias multirresistentes (48,62).

Outros problemas crónicos, como vários tipos de doenças cancerígenas, estão associadas à exposição a vários tipos de CECs. O ácido perfluorooctanóico (PFOA), um produto químico usado no fabrico de produtos industriais, demonstrou induzir tumores do fígado, testículos e pâncreas, em ratos, após administração crónica na dieta. Em humanos, estudos epidemiológicos não revelaram um aumento estatisticamente significativo de cancro, mas mostraram uma tendência positiva para o aumento de cancro da próstata e do pâncreas quando se comparou os trabalhadores não expostos com os trabalhadores provavelmente/definitivamente expostos (63). Estes compostos perfluorados estão também associados a outros problemas em humanos, como infertilidade, disfunções reprodutivas e complicações na tiroide (48).

No ser humano, alguns CECs, considerados desreguladores endócrinos, podem interferir na função endócrina do corpo e resultar em efeitos adversos reprodutivos, neurológicos, de desenvolvimento e imunológicos (34).

Na figura 15 estão descritos alguns efeitos adversos dos CECs para a saúde humana e também para o ambiente. Para além dos efeitos carcinogénicos e reprodutivos já mencionados, podemos adicionar efeitos relacionados com o metabolismo e com o sistema cardiovascular. São, portanto, vários os prejuízos que uma exposição crónica a estas substâncias pode trazer para o ser humano.



Figura 12 - Alguns efeitos adversos dos CECs na saúde humana (Adaptado de Rasheed et al.2019 (34))

As avaliações de toxicidade e exposição de CECs em humanos são poucas, tendo como consequência a não determinação do verdadeiro risco, para a saúde humana, da exposição a estes compostos através da água. Como tal, mais estudos são necessários e avaliações de exposição crónica a estes CECs em humanos (58).

1.8 Legislação

As preocupações sobre a quantidade de substâncias consideradas CECs e as consequências da exposição do ser humano e do ambiente às mesmas têm sido crescentes. Existe um consenso geral entre agências e decisores políticos de que este assunto tem de ser abordado de forma premente, sistemática e coerente. Há necessidade de ter um sistema de alerta e de prevenção constante (64).

1.8.1 Nacional e europeia

Em 2000, o Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia emitiram uma diretiva, Diretiva 2000/60/CE, que estabelecia um quadro de ação comunitária no domínio da política da água. Nessa diretiva constam 33 substâncias prioritárias como o antraceno, o ftalato de di(2-etil-hexilo) (DEHP), o ácido perfluorooctanosulfônico e derivados (PFOS), entre outros, que teriam de ser controladas nos próximos 15 anos devido ao seu risco significativo para ou através do ambiente aquático (65). Esta diretiva sofreu várias atualizações, nomeadamente em 2008, a Diretiva 2008/105/CE que adicionou outros grupos de substâncias para possível priorização futura e, em 2013, a Diretiva 2013/39/UE, que recrutou 45 substâncias ou grupos de substâncias prioritárias. Esta diretiva recomendou o lançamento da primeira lista de vigilância (*watch list*) e aconselhou a inclusão do diclofenac, 17- β -estradiol e 17- α -etinilestradiol nesta lista de substâncias prioritárias (66,67).

Esta lista de observação, através da Decisão Europeia 2015/495/UE, foi lançada em 2015 como orientação de substâncias para as quais é necessário recolher dados de monitorização à escala da União Europeia. Esta lista incluiu três hormonas (17- α -etinilestradiol, 17- β -estradiol e estrona), quatro fármacos (diclofenac, azitromicina, claritromicina e eritromicina), um pesticida carbamato (metiocarbe), cinco pesticidas neonicotinóides (imidacloprida, tiaclopride, tiametoxam, clotianidina e acetamiprida) e dois herbicidas (oxadiazon e trialato), um filtro UV (EHMC) e um antioxidante usado como aditivo alimentar e em cosméticos (BHT) (68). Esta lista é dinâmica tendo sido atualizada em 2018, com a Decisão Europeia 2018/840/UE, onde se removeu alguns contaminantes e se adicionou o inseticida metaflumizona e os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina (69). A última atualização foi em 2020, com a Decisão Europeia 2020/1161/EU, onde foram adicionados compostos azólicos, como o clotrimazol, o fluconazol, o miconazol, o procloraz, o tebuconazol e o tetraconazol, fungicidas como a dimoxistrobina e a famoxadona, antibióticos como o trimetoprim e o sulfametoxadol e antidepressivos como a venlafaxina e o seu metabolito ativo, a O-desmetilvenlafaxina (70).

Os estados-membros, nos quais se inclui Portugal, são obrigados a selecionar pelo menos uma estação de monitorização, adicionando mais uma estação se tiver mais de um milhão de habitantes, mais uma estação de monitoramento adicional por 60.000 km² de área geográfica, mais o número de estações correspondente à sua população dividida por cinco milhões, segundo a Diretiva 2013/39/EU. Assim, em toda a Europa, existem 200 a 250 locais nos quais amostras são recolhidas e consideradas representativas de exposições químicas em toda a União Europeia (71).

Par além da legislação vigente, em 2005 a Comissão Europeia financiou o projeto NORMAN. Este visa promover uma rede contínua de laboratórios de referência e centros de pesquisa que permita uma troca mais rápida e abrangente de dados sobre a ocorrência de CECs. Este projeto tem também como missão incentivar a validação e harmonização de métodos de quantificação e de monitorização. Assegura ainda a transparência dos dados e estabelece um fórum independente para o debate técnico/científico sobre questões relacionadas com CECs. O projeto NORMAN desempenha um papel importante por ser uma organização independente que está a criar o interface entre ciência e política, possuindo cerca de 94 membros de cerca de 26 países (64,72).

1.8.2 Internacional

Nos Estados Unidos da América (EUA), vários estatutos aprovados no Congresso, como a Lei de Água Potável Segura, a Lei de Controlo de Substâncias Tóxicas, a Lei de Resposta, Compensação e Responsabilidade Ambiental Abrangente e a Lei da Água Limpa dão autoridade ao Departamento de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA para lidar com os problema e consequências da presença de CECs, nomeadamente impor limites de deteção nos efluentes. A Lei da Água Limpa foi especialmente estabelecida pelo Congresso para restaurar e proteger a qualidade das águas superficiais do país (73).

Duas seções da Lei da Água Limpa, secções 307 e 311, autorizam a EPA a designar contaminantes como poluentes tóxicos e substâncias perigosas, respetivamente. O Congresso integrou, em 1977, na Lei da Água Limpa, uma lista inicial de substâncias poluentes, a *Toxic Pollutant List* e posteriormente atualizou essa lista em 1979, 1989 e 2011. Essa lista possui 65 substâncias, apesar de algumas entradas na lista mencionem um grupo ou classe de substâncias e não uma substância única (73,74). Foi criada, posteriormente, uma lista de poluentes prioritários, *Priority Pollutant List*, que menciona um conjunto de poluentes químicos regulados e para os quais a EPA tem métodos de testagem analítica desenvolvidos. A lista atual, de 2014, possui 126 substâncias consideradas poluentes (74).

A lei americana encontra-se um pouco atrás da lei europeia no que se refere a CECs e à sua regulamentação. A desatualização das listas de contaminantes e poluentes é uma prova disso. Será necessário promover essa atualização como método de gestão do risco destes contaminantes.

2. Contaminantes de interesse emergente: fármacos

2.1 Fontes de exposição de fármacos

Como já referido, os produtos farmacêuticos são uma das categorias de substâncias consideradas CECs. A sua presença nas matrizes aquáticas pode ter grandes impactos ambientais e na saúde humana. O crescimento populacional e aumento da esperança média de vida aumentaram bastante a utilização de fármacos e, conseqüentemente, a sua presença em efluentes urbanos. Para além de fármacos humanos, fármacos de uso veterinário têm sido detetados com frequência na cadeia alimentar dos animais, especialmente antibióticos (75).

A maior fonte de entrada de fármacos no ambiente aquático são as ETAR. As águas residuais urbanas contêm resíduos de fármacos que podem ser de diferentes classes, em diferente concentração e quantidade (25).

Após a administração de medicamentos, estes são absorvidos e podem estar sujeitos a reações de metabolização. Assim, quando excretados do organismo humano, maioritariamente através da urina e de fezes, os fármacos podem apresentar-se sob a sua estrutura original ou através de metabolitos secundários. Normalmente, estes compostos são detetados em águas residuais urbanas em níveis baixos, ng/L a µg/L. Após entrarem em matrizes aquáticas, os fármacos podem seguir três vias principais: podem ser mineralizados em dióxido de carbono e água, podem não se degradar rapidamente devido à sua natureza lipofílica e ficarem retidos em lamas de sedimentação ou, metabolizando-se em moléculas mais hidrofílicas, podem não ser removidos nas ETAR e terminar em águas superficiais (76).

No entanto, as águas residuais provenientes de hospitais, clínicas veterinárias e até das próprias instalações de indústrias farmacêuticas, podem ser fontes deste grupo de CECs e não apenas as descargas domésticas (49).

Há poucos dados sobre os efeitos adversos, possíveis em humanos e no ambiente, conseqüentes da exposição a fármacos em matrizes aquáticas. Os níveis de concentração detetados são baixos, no entanto existe uma grande preocupação com a exposição a longo prazo a este tipo de contaminantes (77).

2.2 Tipos de fármacos e padrões de contaminação

Fármacos anti-inflamatórios, β-bloqueadores, antiepiléticos e antidepressivos, antilipídicos e antibióticos são classes de fármacos que estão presentes em maior concentração e são difíceis de remover completamente, devido às suas propriedades físico-

químicas (34). Dependendo do tipo de fármaco, a sua remoção nas ETAR pode também variar. Por exemplo, num estudo que colheu amostras em diferentes ETAR municipais, em Tóquio, a aspirina e o ibuprofeno foram efetivamente eliminados no tratamento secundário (> 90%). No entanto, fármacos como o cetoprofeno, o naproxeno, a carbamazepina e o crotamiton apresentaram uma reduzida remoção (< 50%) (78).

Num estudo da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, em parceria com a Empresa Portuguesa de Águas Livres, analisou-se a presença de vários fármacos em diversas amostras de água de captações, superficiais e subterrâneas, e de água para consumo humano. Apenas sete fármacos, como o atenolol, a sulfadiazina, a sulfapiridina, a cafeína, sulfametoxazol, carbamazepina e eritromicina, foram quantificados em amostras de água para consumo humano, sendo que, após avaliação do risco ambiental, apenas a eritromicina apresentou um QP superior a 1, indicando um risco elevado para o ambiente (25).

Noutro estudo da FFUL, decorrente do Projeto Europeu Life Impetus, vinte e quatro fármacos foram monitorizados nas águas residuais urbanas de duas ETAR portuguesas, Beirolas, na Área da Grande Lisboa e Faro, no Noroeste no Algarve. Este estudo mostrou que dezasseis dos vinte e quatro fármacos foram detetados em todas as amostras analisadas, sendo a cafeína e o paracetamol os mais abundantes nas águas residuais brutas, dezenas de µg/L, seguidos pelos AINE's, ibuprofeno, naproxeno e diclofenac. O antiepiléptico carbamazepina, os antibióticos eritromicina, sulfametoxazol e sulfapiridina, o antidiabético bezafibrato e o betabloqueador atenolol estavam presentes nas amostras em menor concentração (75). Outro estudo, realizado nestas ETAR, analisou a presença destes fármacos em lamas residuais provenientes dos tratamentos dos afluentes. A cafeína foi o composto mais prevalente. A maior concentração deste composto foi de 4035 ng/g, em Beirolas, e 129,9 ng/g na ETAR de Faro. Fármacos como a carbamazepina, o paracetamol, o diclofenac, o naproxeno, a sulfapiridina e o propranolol também foram detetados nas amostras analisadas (79).

Em 2020, foi avaliada a eficiência de remoção de fármacos em cinco ETAR portuguesas (Évora, Reguengos de Monsaraz, Borba, Portel e Redondo) na região do Alentejo. Vinte e seis fármacos foram analisados em afluentes e efluentes das ETAR, e ainda em águas superficiais, a montante e a jusante das ETAR. Dezoito dos vinte e seis fármacos analisados foram quantificados em afluentes e quatorze nas amostras de efluentes, sendo que oito (ácido clofibrico, gestodeno, estrona, estriol, 17-β-estradiol, 17-α-etinilestradiol, dietilestilbestrol e a fluoxetina) não foram quantificados em nenhuma das amostras. Quatro fármacos (sulfadiazina, cortisona, testosterona e claritromicina) só foram quantificados nas amostras de afluentes. Os fármacos mais representativos nos afluentes foram o paracetamol, a cafeína, o ibuprofeno, o

naproxeno, e o diclofenac, com valores médios de concentração de 115.4 µg/L, 40.9 µg/L, 12.1 µg/L, 8.0 µg/L, e 1.7 µg/L, respetivamente. Nas amostras dos efluentes, foram o diclofenac, a carbamazepina e a cafeína fármacos mais representativos, com valores médios de concentração de 1.6 µg/L, 0.35 µg/L, e 0.16 µg/L, respetivamente.

As maiores taxas de remoção, 100%, foram observadas para o paracetamol, para a sulfadiazina, a cortisona, a testosterona, o metoprolol, e o propranolol. As menores taxas foram observadas para a carbamazepina (2,7%) e para o diclofenac, que apresentou uma taxa de remoção negativa (-13,2%). Este valor negativo pode dever-se à presença de metabolitos do fármaco nos afluentes, sendo que estes podem ser substrato de certas reações durante o tratamento das águas. Em relação ao quociente de perigo, este foi superior a 1, para o diclofenac e para o sulfametoxazol, em todas as ETAR. Isto indica que estes fármacos podem representar um risco elevado para os organismos aquáticos. Os QP variaram nas várias ETAR. Para o sulfametoxazol variaram entre 3.12 em efluentes da ETAR de Reguengos de Monsaraz e 11,4 na ETAR de Borba. Para o diclofenac variaram entre 6,76 na ETAR de Portel e 84,7 na de Borba (35).

Em Espanha, na comunidade autónoma de Valência, a presença de fármacos em águas residuais urbanas foi também avaliada através da análise de 112 amostras de águas residuais de diferentes ETAR. Foram detetados 17 compostos nas amostras, sendo os mais frequentes da classe dos analgésicos, anti-inflamatórios e antidiabéticos. A 4-aminoantipirina, bezafibrato, diclofenac, gemfibrozil, cetoprofeno, naproxeno e venlafaxina foram dos compostos mais encontrados (77).

Fora da Europa, a Índia está entre os cinco maiores produtores de medicamentos no mundo, com cerca de 250 a 300 empresas, sendo que as suas exportações de medicamentos crescem 30% cada ano. No entanto, a capacidade de tratamento de esgotos domésticos na Índia é bastante reduzida. Foram relatadas concentrações muito mais altas, na ordem dos mg/L de fármacos nas ETAR que processam águas residuais das instalações de produção de medicamentos. Estudos conduzidos na ETAR de Patancheru, na Índia, reportaram os níveis mais altos de fármacos já relatados em águas residuais de outras partes do mundo (80).

A maioria dos estudos sobre a ocorrência de fármacos em matrizes aquáticas revela a presença recorrente das seguintes classes terapêuticas: AINE's, antibióticos, antidiabéticos, antidepressivos, entre outros. Outros fármacos considerados CECs, são os antifúngicos da classe dos azóis. Apesar de serem considerados CECs, em estudos de ocorrência de fármacos em matrizes aquáticas, os compostos azólicos quase nunca são selecionados como substância a detetar. A maioria dos estudos sobre a ocorrência de azóis foca-se precisamente

apenas nessa classe. Uma análise mais detalhada da presença destes CECs em matrizes aquáticas é feita no capítulo seguinte.

A toxicidade crónica dos fármacos considerados CECs deve ser analisada e debatida em estudos de exposição a longo prazo e esforços devem ser feitos para melhorar os métodos de remoção dos mesmos nas ETAR.

Capítulo IV. Contaminantes ambientais: antifúngicos

1. Antifúngicos versus CECs: Azóis

Os ambientes aquáticos e terrestres estão contaminados por várias substâncias, algumas delas produzidas pelo homem, que podem afetar o meio ambiente e a saúde humana (81). De entre elas podemos destacar os antifúngicos.

Os antifúngicos são uma classe de fármacos com propriedades antimicóticas que desempenham um papel bastante importante na manutenção da saúde humana. Os fármacos da classe dos azóis são uma das classes de antibióticos mais utilizadas, sendo administrados em rotina no tratamento de doenças fúngicas, quer em formulações tópicas, quer orais. Estão ainda presentes em muitos produtos de cuidado pessoal, como champôs anticaspa ou contra a dermatite seborreica, sabonetes, pastas dentífricas e géis de banho (82).

Também a nível da agricultura, os fungos desempenham um papel crítico. Fungos patogénicos são responsáveis por cerca de 20% das perdas nas culturas (83). É comum, portanto, utilizar-se uma vasta gama de agentes antifúngicos, principalmente triazóis, como pesticidas.

Devido à sua crescente utilização, tanto a nível clínico, como a nível agrário, os antifúngicos da classe dos azóis, que incluem os imidazóis e os triazóis, são frequentemente detetados em matrizes aquáticas e também nos solos (83).

2. Fontes de contaminação e matrizes ambientais alvo

Como já referido, os contaminantes de interesse emergente, incluindo os fármacos, não são removidos de forma eficiente nas ETAR. Dependendo das suas propriedades físico-químicas, uma parte destas substâncias acaba nas águas tratadas e nas lamas finais que irão ser devolvidas ao meio, o que acaba por levar à deteção destas substâncias em matrizes ambientais, como rios e outras matrizes aquáticas, sedimentos e solos (84). Sendo assim, a principal fonte de fármacos pertencentes à classe dos azóis são as descargas das ETAR, devido a uma remoção incompleta destes compostos (85).

Os compostos azólicos, quer presentes em medicamentos, quer em produtos de cuidado pessoal, são excretados através de fezes ou urina após ingestão ou lavados da pele após aplicação tópica. A quantidade, a forma (inalterada ou metabolito) e a via de excreção do fármaco dependem de fatores farmacocinéticos. Há azóis que são excretados principalmente pela via renal, na urina, como o fluconazol e através das fezes, como o posaconazol. Outros

fármacos são extensamente metabolizados e são os seus metabolitos, e não o composto inalterado, que são excretados, como o itraconazol (86). Tanto os fármacos como os seus metabolitos passam muitas vezes pelo processo de tratamento nas ETAR e não são removidos, podendo ser tóxicos e prejudiciais para o ser humano, para o ambiente e para organismos aquáticos como algas e peixes (82,85).

Os compostos azólicos dos medicamentos ou dos produtos de cuidado pessoal chegam às ETAR através de descargas domésticas ou hospitalares (85). Existe uma grande possibilidade de estes compostos atingirem os solos também através da utilização de efluentes tratados nas ETAR como fonte de rega de solos ou através do uso das lamas das ETARs como fertilizante (82). No entanto, outras substâncias azólicas utilizadas na agricultura, como tebuconazol, ciproconazol, difenconazol, flusilazol, propiconazol e epoxiconazol, podem atingir o ambiente e matrizes aquáticas através de escoamento de águas de culturas e solos de plantações (87).

3. Ocorrência e remoção de agentes antifúngicos das matrizes ambientais

Comparados com os estudos sobre os outros fármacos, os estudos de ocorrência de compostos da classe dos azóis nas águas residuais e nas águas superficiais são escassos (87). Os métodos analíticos mais utilizados para a deteção de fármacos antifúngicos em amostras de água são geralmente a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem, após extração em fase sólida (SPE) (88).

Num estudo que avaliou a presença de antifúngicos em amostras de águas residuais, obtidas de ETAR municipais localizadas no cantão suíço de Zurique, o fluconazol e o cetoconazol foram detetados nos afluentes em concentrações entre 10-110 ng/L. Também a concentração dos mesmos compostos foi avaliada após o tratamento nas ETAR, chegando-se à conclusão de que as concentrações de fluconazol nas amostras dos efluentes são muito semelhantes às concentrações nos afluentes, demonstrando a ineficácia da remoção deste das águas. As concentrações de cetoconazol já se mostraram mais reduzidas após o tratamento dos afluentes, sendo superior a 80%. Alguns pesticidas azólicos, como o propiconazol e o tebuconazol foram detetados em todas as estações investigadas, com concentrações de tebuconazol, 1-10 ng/L, normalmente menores que as de propiconazol, 4-40 ng/L. Não se demonstrou muita diferença nos valores de concentração destes pesticidas após o tratamento nas ETAR (87).

Na tabela seguinte podemos observar concentrações de fármacos antifúngicos, obtidos de vários estudos, antes e após tratamento das águas residuais nas ETARs de vários países, bem como a taxa de remoção desses mesmos fármacos após tratamento.

Tabela 11 - Ocorrência de azóis nas ETAR (Adaptado de Chen et. al 2015 (85))

Antifúngico	País	Tratamento	Concentração no afluente (ng/L)	Concentração no efluente (ng/L)	Concentração na lama	Taxa de remoção (%)	Referência
Clotrimazol	Espanha	Tratamento biológico	11–80	5-11	-	45-90	(88)
	Polónia	-	-	5,9-31,1	-	-	(89)
	China	Lama ativada	-	-	190-327	-	(90)
	China	A ² O	6,7	2,7	426	60	(91)
Cetoconazol	Espanha	Tratamento biológico	55–191	10-36	-	67-86	(88)
	China	Lama ativada	-	-	437–454	-	(90)
	Alemanha	Lama ativada	<LOQ-90	<LOQ	328	86-100	(92)
	Bélgica	Lama ativada	ND-58,1	ND-34,8	-	58.9–100	(93)
Miconazol	Espanha	Tratamento biológico	20-80	<LOQ-12	-	74-94	(88)
	China	Lama ativada	-	.	240-398	-	(90)
	China	A ² O	11	0,5	150	55	(91)
	Bélgica	Lama ativada	<LOQ-337.9	<LOQ-35.7	-	74-100	(93)
Fluconazol	Espanha	Tratamento biológico	20-93	37-95	-	0-60	(88)
	China	A ² O	65,1	61,1	8,2	6,1	(91)

Legenda: A²O – processo anaeróbico-anóxico-óxico; ND- Não detetado; LOQ- Limite de quantificação

Analisando a tabela, podemos observar que em Espanha o cetoconazol foi o antifúngico com maior concentração no afluente, mas, na amostra tratada, a taxa de remoção era elevada. Pelo contrário, o fluconazol apresentava uma baixa taxa de remoção, quer no estudo espanhol, quer no estudo chinês. Neste mesmo estudo, realizado em ETARs chinesas, os investigadores detetaram uma maior utilização de antifúngicos no verão do que no inverno, devido à maior

concentração destes nas ETAR no mês de maio, comparativamente ao mês de novembro, verificando-se uma variação sazonal (90).

Também um estudo sueco analisou as concentrações de antifúngicos nas águas suecas. O fluconazol foi o único encontrado em amostras de água não tratada e nas amostras do efluente final, variando as concentrações entre 90 a 140 ng/L, o que indica que a sua remoção não é muito eficiente (94).

Devido à sua elevada solubilidade em água, quando comparada com os outros azóis, o fluconazol não está presente nas lamas residuais. Os restantes azóis, pelo contrário encontram-se em concentrações mais elevadas em amostras destas lamas resultantes do tratamento, devido às suas propriedades de adsorção e ao facto de serem mais hidrofóbicos, sendo bastante resistentes ao tratamento nas ETAR (94).

Através dos valores de CPSE e calculando o QP para estes antifúngicos, podemos avaliar a ecotoxicidade destes antifúngicos. Geralmente as suas concentrações em águas superficiais em todo o mundo são menores do que os valores de CPSE, não apresentando QP elevado. O cetoconazol, o miconazol e o fluconazol apresentaram riscos baixos em todos os locais que foram analisados num estudo chinês. O clotrimazol apresentou risco baixo em 97,2% dos sítios e um risco elevado em 1,9% dos sítios (85). Não obstante, e devido aos potenciais riscos da presença de antifúngicos em matrizes aquáticas, mais estudos são necessários.

No que concerne à remoção destes contaminantes das águas, sabemos que as ETAR não estão programadas para os remover, mas sim para remover nutrientes, microrganismos patogénicos e compostos orgânicos de efluentes industriais e municipais. No entanto, as concentrações de fármacos e de produtos de cuidado pessoal podem ser diminuídas nas ETAR dependendo das propriedades físico-químicas do fármaco, como o coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}), o coeficiente de octanol-água (K_{ow}) ou a própria biodegradabilidade da substância, e das condições de tratamento, como tempo de retenção das lamas e o tempo de retenção hidráulica (30,95,96).

Técnicas tradicionais das ETAR como lamas ativadas ou o processo de biodegradação anaeróbio-anóxico-óxico (A_2O) são técnicas utilizada geralmente nas ETAR e são eficazes no tratamento de águas para retirar contaminantes ou substâncias comuns. No entanto, no que toca aos CECs e aos azóis, não há uma eficiência tão grande nestes processos. O fluconazol, devido às suas propriedades hidrofílicas e à baixa taxa de biodegradação, apresenta taxas de remoção muito baixas (85).

Quando um produto químico tem um $\log K_{ow} > 4$ é facilmente adsorvido a matrizes sólidas, como as lamas, quando apresenta um $\log K_{ow} < 2$ tende a permanecer nos efluentes ou

águas superficiais. Assim, de acordo com este valor conclui-se que o fluconazol ($\log K_{ow} = 0,5$) é hidrofílico, permanecendo na fase aquosa nas ETAR e não adsorve às lamas residuais. O clotrimazol ($\log K_{ow} = 6,1$), cetoconazol ($\log K_{ow}=4,35$) e miconazol ($\log K_{ow}=6,25$) são hidrofóbicos, tendendo a adsorver na fase sólida e apresentando-se nas lamas residuais das ETARs (85,97).

Para além destes processos de remoção tradicionais, podemos analisar o comportamento dos contaminantes em ambiente aquático. Geralmente, os azóis não parecem sofrer hidrólise, não sendo um processo favorável para a degradação de compostos azólicos no ambiente aquático. A fotólise, a transformação química de um composto através de reações de transferência de energia e elétrons induzidas pela luz, pode remover fármacos e produtos de cuidado pessoal, nomeadamente através de luz UV. Apesar de ter sido demonstrado em laboratório que o fluconazol pode ser fotodegradado sob luz UV mais facilmente sob condições alcalinas, em condições reais nas ETAR, este processo não demonstrou ser eficiente, provavelmente devido condições de reações desfavoráveis como o pH neutro e o tempo de retenção hidráulico curto (85).

Foram realizados poucos estudos sobre a eficiência de novas tecnologias de remoção, como a ozonização e a nanofiltração. Como tal, a aplicação destas tecnologias recentes e a avaliação do seu desempenho são necessárias para um melhor controlo do aparecimento de compostos azólicos em ambientes aquáticos (85).

4. Toxicidade e efeitos ecológicos

4.1 Toxicidade ambiental e em humanos

Os antifúngicos da classe dos azóis, triazóis e imidazóis, apresentam a sua atividade antifúngica através da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, uma enzima da família do CYP P450, codificada pelo gene CYP51, impedindo a biossíntese do ergosterol, um composto essencial na membrana dos fungos (98). Estes compostos apresentam ainda capacidade de reduzir os níveis de estrogénios através da inibição de outra enzima da família do CYP 450, a aromatase (CYP19), podendo ser utilizados na terapia de doenças dependentes de estrogénios, como o cancro da mama (87,99). Como estes compostos podem interagir com várias enzimas da família do CYP450, eles têm o potencial de afetar o sistema endócrino de vários organismos aquáticos, podendo afetar a diferenciação de vertebrados durante a fase larval e também o equilíbrio dos níveis de androgénios e estrogénios em mamíferos (87,88).

Tendo em conta o mecanismo de atuação desta classe de antifúngicos e estando os azóis presentes em descargas de ETAR e encontrado em águas superficiais, pode esperar-se efeitos nefastos nos organismos expostos a estes compostos.

Foi demonstrado que os imidazóis, inibindo o CYP19, podem levar a graves consequências na diferenciação sexual em vertebrados, como por exemplo o desenvolvimento testicular em salmões fêmea. Também a exposição ao imidazol clotrimazol pode ter efeitos complexos na atividade da aromatase nas gónadas e cérebro das larvas de *Xenopus tropicalis*. A redução da taxa de crescimento de certos peixes pode estar também relacionada com a exposição destes a compostos azólicos. (81,94,100) .

O clotrimazol pode também regular a expressão génica do gene CYP51 testicular em peixes zebra (*Danio rerio*), alterando os níveis hormonais e levando a um maior desenvolvimento testicular. Este antifúngico tem também a capacidade de alterar a síntese de esteróis dependentes de CYP51 em algas, resultando na acumulação de precursores de esteróis C14- α -metilados e a correspondente redução nos esteróis C14-desmetilados em comunidades de perifíton marinho expostas, afetando também a produção de clorofila a e de outros pigmentos nestas algas (85,101).

Em relação à genotoxicidade e carcinogenicidade, os antifúngicos da classe dos azóis não demonstraram apresentar estes efeitos, sendo que a sua presença em matrizes aquáticas e ambientais não estará envolvida no aparecimento destes efeitos (102).

Estudos que avaliem o impacto destes contaminantes na saúde humana são muito reduzidos, sendo que, como a maioria dos outros CECs, uma exposição crónica e ao longo dos anos poderá levar a efeitos graves e semelhantes aos reportados noutros mamíferos, uma vez que as enzimas da família do CYP450 apresentam funções semelhantes e igualmente importantes no sistema endócrino humano. Sendo assim, estudos a longo prazo são necessários para avaliar o risco que estes contaminantes apresentam para a saúde humana.

4.2 Resistência a antifúngicos

Para além do impacto em organismos aquáticos, existem evidências de que a presença de antifúngicos em matrizes aquáticas e em solos pode estar relacionada com o aumento da resistência a antifúngicos, uma ameaça para os recursos alimentares e para a saúde humana (81,103). A resistência a antibióticos é um problema emergente e já bem discutido entre agência regulamentares e as organizações de saúde. Pelo contrário, fungos patogénicos multirresistentes são muito menos conhecidos, embora representem também uma ameaça no

controle de doenças em plantas, animais e humanos, não sendo, por exemplo, alvo da maioria dos programas de vigilância oficiais da Organização Mundial de Saúde (104). Três tipos de fungos foram mencionados no relatório da segunda reunião do Sistema Global de Vigilância da Resistência Microbiana em 2016, fungos da família *Candida*, *Aspergillus* e fungos que causa Mucormicose, sendo o fungo *Aspergillus fumigatus*, bastante preocupante para a saúde humana. É responsável por várias doenças pulmonares, desde patologias crônicas ou imunoalérgicas a infecções invasivas graves com elevadas taxas de mortalidade. O fungo *Candida auris* apresentou também um nível de preocupação acrescido, sendo frequentemente multirresistente a antifúngicos (41%) e associada a uma mortalidade mais elevada na Unidade de Cuidados Intensivos em doentes imunossuprimidos (105).

A resistência do fungo *A. fumigatus* aos azóis, classe utilizada no tratamento de aspergiloses, tem sido reportada em várias zonas do mundo, sendo a Europa um lugar onde a ocorrência destes fungos multirresistentes tem sido elevada, originando aspergiloses graves e com altas taxas de mortalidade (104). Fatores que podem levar ao aparecimento desta resistência podem ser a exposição prolongada dos doentes aos azóis, mas também a utilização extensiva de azóis como pesticidas agrícolas (103,106). Estes pesticidas são particularmente utilizados na Europa e na Ásia, cerca de 40% dos pesticidas utilizados na Europa são antifúngicos e mais de um terço deles são antifúngicos da classe dos azóis (104). O uso destes contaminantes em solos agrícolas pode então levar ao desenvolvimento de fungos resistentes aos azóis, mas expondo os solos a estes contaminantes e, possivelmente através do escoamento de águas e através de chuvas, estes compostos podem chegar também a ambientes aquáticos, sendo potencialmente tóxicos para os organismos residentes nesse ambiente. Também a presença de fluconazol e de itraconazol em matrizes aquáticas demonstraram apresentar um risco moderado a elevado para o desenvolvimento de fungos multirresistentes a antifúngicos (107).

Ao contrário da resistência a antibióticos, a investigação de resistência a antifúngicos têm ainda um longo caminho a percorrer. Mais estudos são necessários sobre os CECs da classe dos azóis nas matrizes aquáticas e nos solos agrícolas, assim como sobre a eficácia das ETAR na sua remoção.

Capítulo V. Conclusões e perspectivas futuras

A informação disponível sobre os CECs tem aumentado cada vez mais. A preocupação com a presença destas substâncias em ambientes aquáticos, bem como a exposição humana às mesmas, parece ter levado a uma investigação mais intensiva sobre o tema.

As ETAR continuam a ser a principal fonte de CECs no ambiente. As técnicas de tratamento convencionais não são eficientes na remoção destas substâncias. Processos como a ozonização e tratamentos de oxidação avançados devem ser avaliados e implementados nas estações de tratamento existentes.

Através da sua excreção pela urina e fezes, alguns fármacos, bem como os respetivos metabolitos, são detetados e quantificados, quer nas águas, quer nos sedimentos, solo e biota. Alguns são mais prevalentes, como é o caso dos AINEs, antibióticos, antidiabéticos e antidepressivos. Para a sua deteção, os métodos mais utilizados são a cromatografia, gasosa ou líquida, acoplada a espectrometria de massa com vários tipos de analisadores. Inerente à complexidade das amostras, estas sofrem pré-tratamento, sendo o mais usual na matriz aquática, a extração em fase sólida.

No que toca aos antifúngicos, a classe mais utilizada na clínica é a classe dos azóis. Como tal, é de esperar que esta classe seja a mais prevalente em amostras de águas residuais. Vários estudos analisaram a concentração de fármacos azólicos, como o fluconazol, cetoconazol, clotrimazol e miconazol, em amostras recolhidas de vários locais. Nesses concluiu-se que o fluconazol é o que apresenta uma menor taxa de remoção nas ETAR, apresentando-se em concentrações mais elevadas nas águas efluentes da ETAR. Sendo que os restantes, apresentam-se em concentrações elevadas nas lamas, devido às suas propriedades hidrofóbicas. Também foram avaliadas as concentrações de antifúngicos usados como pesticidas, como o propiconazol e o tebuconazol, apresentando também taxas de remoção baixas.

Apesar de se encontrarem em níveis baixos, na ordem dos ng/L e µg/L, a exposição crónica a este tipo de contaminantes pode trazer efeitos bastante nefastos para os ecossistemas aquáticos, bem como para a saúde humana. Devido ao seu mecanismo de ação e a possibilidade de interagirem com enzimas da família do CYP450, os compostos azólicos possuem a capacidade de interferir com o sistema endócrino de vários organismos, como algas, peixes e anfíbios. A masculinização e efeitos no sistema reprodutor foram já demonstrados em laboratório para alguns destes. A probabilidade de uma exposição prolongada a estes compostos provocar efeitos semelhantes no organismo humano é elevada devido às funções semelhantes que estas enzimas desempenham no nosso organismo.

Devido à utilização de pesticidas antifúngicos tem aumentado a resistência a fármacos antifúngicos. A presença de azóis, como o fluconazol e o itraconazol, nas matrizes aquáticas devido à escorrência agrícola ou de remoção ineficaz nas ETAR, são indicadas como os principais fatores associados ao aumento desta resistência.

Os reais efeitos da presença destes contaminantes irão sentir-se no futuro. A exposição crónica e efeitos a longo prazo são uma das potenciais ameaças na saúde do ser humano. Como tal, um aprofundamento de conhecimento e da ocorrência destes CECs em matrizes aquáticas é necessário, bem com a avaliação do risco ambiental e na saúde humana. A aposta na modernização das ETAR é um ponto de partida para a prevenção do aparecimento destes contaminantes no ambiente.

Bibliografía e referências bibliográficas

1. Johnson A, Ziegler R, Lukasewycz O, Hawley L. Mycology. In: *Microbiology & Immunology: Board Review Series 4th Edition*. 2013. p. 161–9.
2. Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016;30(1):51–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>
3. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: A role for polyenes. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):457–65.
4. Kosma CI, Lambropoulou DA, Albanis TA. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci Total Environ*. 2014 Jan 1;466–467:421–38.
5. Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of Antifungal Agents. *Clin Chest Med* [Internet]. 2009;30(2):203–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.001>
6. Liu M, Chen M, Yang Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *Drug Deliv*. 2017;24(1):1–9.
7. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *J Fungi*. 2020;6(4):1–20.
8. Valdés BSG. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cuba Farm*. 2005;39(2):1–15.
9. Houšť J, Spížek J, Havlíček V. Antifungal drugs. *Metabolites*. 2020;10(3).
10. Bellmann R, Smuszkiewicz P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection*. 2017;45(6):737–79.
11. Nocua-Báez LC, Uribe-Jerez P, Tarazona-Guaranga L, Robles R, Cortés JA. Azoles de antes y ahora: una revisión. *Rev Chil infectología*. 2020;37(3):219–30.
12. Bellmann R. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antimycotics. *Curr Clin Pharmacol*. 2008;2(1):37–58.
13. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. Shanahan JF, Naglieri C, editors. The McGraw-Hill Professional; 2005. 1984 p.
14. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin

- B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):834–40.
15. Nystatin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2022 Apr 15]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00646>
 16. Debruyne D, Coquerel A. Pharmacokinetics of Antifungal Agents in Onychomycoses.
 17. Griseofulvin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00400>
 18. INFARMED. Resumo das Características do Medicamento: Grisovin [Internet]. 2005. Available from: https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Evolução_Consumo_Ab_Portugal.pdf/e011e1b0-31a3-49d9-9565-62dad6a8a270
 19. Ramalhinho I, Cabrita J, Ribeirinho M, Vieira I. Evolução do consumo de antibióticos em Portugal Continental (2000 – 2007). Relatório Infarmed [Internet]. 2010;25(1):20–8. Available from: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTUDOS_REALIZADOS_PROTOCOLOS/Evolução_Consumo_Ab_Portugal.pdf
 20. Ana Silva, Santos C. Utilização de Antibióticos em Portugal: Em meio ambulatório e em meio hospitalar. 2014;23. Available from: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2219894/Antibióticos+Ambulatório+Hospitalar+2011-2014/2b049547-7d08-4e06-b9fb-517c34e7b2d2>
 21. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU / EEA (ESAC-Net) Annual Epidemiological Report for 2020. 2021;(November).
 22. Vallabhaneni S, Baggs J, Tsay S, Srinivasan AR, Jernigan JA, Jackson BR. Trends in antifungal use in US hospitals, 2006–12. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(10):2867–75.
 23. Is There A Difference Between Pollution And Contamination? - WorldAtlas [Internet]. [cited 2022 Jun 25]. Available from: <https://www.worldatlas.com/articles/is-there-any-difference-between-pollution-and-contamination.html>
 24. Crini G, Lichtfouse E, Crini G, Lichtfouse E, Adsorbents G. Wastewater treatment : an overview To cite this version : HAL Id : hal-02065607 Wastewater Treatment : An Overview. 2019;1–22.
 25. Gaffney V, Cardoso V, Benoliel MJ, Almeida C. Contaminantes emergentes - fármacos:

- monitorização, avaliação do risco ambiental e do risco para a saúde humana. *Águas e Resíduos*. 2016;(1):15–27.
26. Gaffney V. Monitorização de Fármacos na Água Bruta e na Água Para Consumo Humano por Cromatografia Líquida Associada à Espectrometria de Massa Tandem [Tese de Doutoramento]. Lisboa. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2014.
 27. Alvarez DA, Jones-lepp TL. Sampling and Analysis of Emerging Pollutants. In: *Water Quality Concepts, Sampling, and Analyses*. 2011. p. 99–226.
 28. Nadia Morin-Crin, Lichtfouse E, Crini G. *Emerging Contaminants Vol.1 Occurrence and Impact*. *Environmental Chemistry for a Sustainable World Volume 65*. Springer Cham; 2011. 308 p.
 29. Connecticut Department of Energy and Environmental Protection. *Contaminants of Emerging Concern* [Internet]. 2021. [cited 2022 Jun 12]. Available from: <https://portal.ct.gov/DEEP/Remediation--Site-Clean-Up/Contaminants-of-Emerging-Concern/Contaminants-of-Emerging-Concern>
 30. Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2014;473–474:619–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
 31. Hreiz R, Latifi MA, Roche N. Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art. *Chem Eng J*. 2015 Dec 1;281:900–20.
 32. Castro D. *Otimização do funcionamento da ETAR das Termas de S. Vicente, Penafiel* [Tese de Mestrado]. [Porto]: Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2014.
 33. Barroso AF. *Avaliação do desempenho de uma ETAR de lamas ativadas através do estudo das comunidades microbiológicas do licor misto* [Tese de Mestrado]. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2012.
 34. Rasheed T, Bilal M, Nabeel F, Adeel M, Iqbal HMN. Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ Int*. 2019;122(September 2018):52–66.
 35. Silva S, Cardoso VV, Duarte L, Carneiro RN, Almeida CMM. Characterization of five portuguese wastewater treatment plants: Removal efficiency of pharmaceutical active compounds through conventional treatment processes and environmental risk. *Appl Sci*. 2021;11(16).
 36. Khalid M, Abdollahi M. *Environmental Distribution of Personal Care Products and Their*

- Effects on Human Health. Iran J Pharm Res IJPR [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 29];20(1):216. Available from: /pmc/articles/PMC8170769/
37. Gonsioroski A, Mourikes VE, Flaws JA. Endocrine Disruptors in Water and Their Effects on the Reproductive System. Int J Mol Sci [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2022 Jun 29];21(6). Available from: /pmc/articles/PMC7139484/
 38. Fatta D, Achilleos A, Nikolaou A, Meriç S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. TrAC Trends Anal Chem. 2007 Jun 1;26(6):515–33.
 39. Agüera A, Martínez Bueno MJ, Fernández-Alba AR. New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. Environ Sci Pollut Res [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2022 Jun 15];20(6):3496–515. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1586-0>
 40. Nikolaou A. Pharmaceuticals and related compounds as emerging pollutants in water: Analytical aspects. Glob Nest J. 2013;15(1):1–12.
 41. Zuloaga O, Navarro P, Bizkarguenaga E, Iparraguirre A, Vallejo A, Olivares M, et al. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. Anal Chim Acta. 2012 Jul 29;736:7–29.
 42. Martín-Pozo L, de Alarcón-Gómez B, Rodríguez-Gómez R, García-Córcoles MT, Çipa M, Zafra-Gómez A. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. Talanta. 2019 Jan 15;192:508–33.
 43. Thomaidis NS, Asimakopoulos AG, Bletsou AA. Emerging contaminants: A tutorial mini-review. Glob Nest J. 2012;14(1):72–9.
 44. Almeida CMM. Overview of sample preparation and chromatographic methods to analysis pharmaceutical active compounds in waters matrices. Separations. 2021;8(2):1–50.
 45. Togola A, Budzinski H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS.
 46. Gusmaroli L, Insa S, Petrovic M. Development of an online SPE-UHPLC-MS/MS method for the multiresidue analysis of the 17 compounds from the EU “Watch list.” Anal Bioanal Chem [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Jun 29];410(17):4165–76. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-1069-8>
 47. Kalaboka M, Chromatopoulos C, Jiménez-Holgado C, Boti V, Sakkas V, Albanis T.

- Exploring the Efficiency of UHPLC-Orbitrap MS for the Determination of 20 Pharmaceuticals and Acesulfame K in Hospital and Urban Wastewaters with the Aid of FPSE. Sep 2020, Vol 7, Page 46 [Internet]. 2020 Sep 4 [cited 2022 Jun 30];7(3):46. Available from: <https://www.mdpi.com/2297-8739/7/3/46/htm>
48. Bilal M, Adeel M, Rasheed T, Zhao Y, Iqbal HMN. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. *Environ Int.* 2019;124(October 2018):336–53.
 49. Behera SK, Kim HW, Oh JE, Park HS. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci Total Environ.* 2011 Sep 15;409(20):4351–60.
 50. Zhang S, Gitungo S, Dyksen JE, Raczko RF, Axe L. Indicator Compounds Representative of Contaminants of Emerging Concern (CECs) Found in the Water Cycle in the United States. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Jun 16];18(3):1–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33535451/>
 51. Sotelo JL, Rodríguez A, Álvarez S, García J. Removal of caffeine and diclofenac on activated carbon in fixed bed column. *Chem Eng Res Des.* 2012 Jul 1;90(7):967–74.
 52. Boehler M, Zwickelpflug B, Hollender J, Ternes T, Joss A, Siegrist H. Removal of micropollutants in municipal wastewater treatment plants by powder-activated carbon. *Water Sci Technol.* 2012 Nov 1;66(10):2115–21.
 53. Ahmad M, Lee SS, Dou X, Mohan D, Sung JK, Yang JE, et al. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover- and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water. *Bioresour Technol.* 2012 Aug 1;118:536–44.
 54. Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MÁ, Prados-Joya G, Ocampo-Pérez R. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere.* 2013 Oct 1;93(7):1268–87.
 55. Eva SD, Eric L, Martin R. Effects of sorption on the rejection of trace organic contaminants during nanofiltration. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2022 Jun 16];44(7):2592–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/es902846m>
 56. Ngo HH, Guo W, Vigneswaran S. Membrane Processes for Water Reclamation and Reuse. *Membr Technol Environ Appl* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2022 Jun 16];239–75. Available from: <https://ascelibrary.org/doi/10.1061/9780784412275.ch08>
 57. Sengupta A, Jebur M, Kamaz M, Wickramasinghe SR. Removal of Emerging Contaminants from Wastewater Streams Using Membrane Bioreactors: A Review.

- Membranes (Basel) [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jun 16];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35054586/>
58. Jurado A, Walther M, Díaz-Cruz MS. Occurrence, Fate and Associated Risks of Organic Micropollutants from the Watch List of European Groundwaters. 2021;113–63.
 59. Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett.* 2003 May 15;142(3):185–94.
 60. Hernando MD, Mezcua M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.* 2006 Apr 15;69(2):334–42.
 61. Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 2006 Feb 10;76(2):122–59.
 62. Santos LHMLM, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D, et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ.* 2013 Sep 1;461–462:302–16.
 63. Klaunig JE, Hocevar BA, Kamendulis LM. Mode of Action analysis of perfluorooctanoic acid (PFOA) tumorigenicity and Human Relevance. *Reprod Toxicol.* 2012 Jul 1;33(4):410–8.
 64. Dulio V, Van Bavel B, Brorström-Lundén E, Harmsen J, Hollender J, Schlabach M, et al. Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environ Sci Eur* [Internet]. 2018;30:5. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0135-3>
 65. Parlamento e Conselho Europeu. Diretiva 2000/60/CE do Parlamento e Conselho Europeu de 23 de outubro de 2000. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias.* 2000 p. 0001–73.
 66. Parlamento e Conselho Europeu. Directiva 2008/105/CE do Parlamento e Conselho Europeu de 16 de Dezembro de 2008. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias.* 2008 p. 84–97.
 67. Parlamento e Conselho Europeu. Diretiva 2013/39/UE do Parlamento e do Conselho Europeu de 12 de agosto de 2013. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias.* 2013 p. 1–17.
 68. Comissão Europeia. Decisão de Execução 2015/495/UE da Comissão Europeia de 20 de março de 2015 ,. *J Of das Comunidades Eur.* 2015;L 78:40–42.

69. Comissão Europeia. Decisão de Execução 2018/840/UE da Comissão Europeia de 5 de junho de 2018. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. p. 9–12.
70. Comissão Europeia. Decisão de Execução 2020/1161/UE da Comissão Europeia de 4 de agosto de 2020. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 2020 p. 32–35.
71. Merrington G, Peters A, Wilson I, Gardner M, Ryan J, Adams W. Using Water Framework Directive Watch List Data Sets to Estimate Europe-wide Chemical Exposures and Potential Aquatic Risks: Representativity and Uncertainty? *Environ Toxicol Chem*. 2021 Sep 1;40(9):2386–93.
72. NORMAN Network | NORMAN [Internet]. [cited 2022 Jun 17]. Available from: <http://www.norman-network.net/?q=NORMAN Network>
73. Congressional Research Service, Laura Gatz. Contaminants of Emerging Concern Under the Clean Water Act [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 17]. Available from: <https://crsreports.congress.gov>
74. Toxic and Priority Pollutants Under the Clean Water Act | US EPA [Internet]. [cited 2022 Jun 17]. Available from: <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act#toxic>
75. Silva C, Almeida CMM, Rodrigues JA, Silva S, Coelho M do R, Martins A, et al. Occurrence and seasonality of pharmaceutical compounds in urban wastewaters in two Portuguese regions. *Urban Water J* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 17];18(6):465–78. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1573062X.2021.1893365>
76. Gaso-Sokac D, Habuda-Stanic M, Busic V, Zobundzija D. Occurrence of pharmaceuticals in surface water. *Croat J Food Sci Technol*. 2017 Dec 20;9(2):204–10.
77. Gracia-Lor E, Sancho J V., Serrano R, Hernández F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 2012 Apr 1;87(5):453–62.
78. Tran NH, Gin KYH. Occurrence and removal of pharmaceuticals, hormones, personal care products, and endocrine disrupters in a full-scale water reclamation plant. *Sci Total Environ*. 2017 Dec 1;599–600:1503–16.
79. Silva S, Rodrigues JA, Coelho MR, Martins A, Cardoso E, Cardoso VV, et al. Occurrence of pharmaceutical active compounds in sewage sludge from two urban wastewater treatment plants and their potential behaviour in agricultural soils. *Environ Sci Water Res Technol*. 2021;7(5):969–82.
80. Balakrishna K, Rath A, Praveenkumarreddy Y, Guruge KS, Subedi B. A review of the

- occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017 Mar 1;137:113–20.
81. Creusot N, Casado-Martinez C, Chiaia-Hernandez A, Kiefer K, Ferrari BJD, Fu Q, et al. Retrospective screening of high-resolution mass spectrometry archived digital samples can improve environmental risk assessment of emerging contaminants: A case study on antifungal azoles. *Environ Int* [Internet]. 2020;139(April):105708. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105708>
82. Sallach JB, Thirkell TJ, Field KJ, Carter LJ. The emerging threat of human-use antifungals in sustainable and circular agriculture schemes. *Plants People Planet.* 2021;3(6):685–93.
83. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* (80-). 2018 May 18;360(6390):739–42.
84. aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem.* 2016 Apr 1;35(4):823–35.
85. Chen ZF, Ying GG. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environ Int* [Internet]. 2015;84:142–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.022>
86. Brüggemann RJM, Alffenaar JWC, Blijlevens NMA, Billaud EM, Kosterink JGW, Verweij PE, et al. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2022 Jun 19];48(10):1441–58. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/48/10/1441/424268>
87. Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, Müller MD, Poiger T. Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2022 Jun 19];42(19):7193–200. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es8009309>
88. Casado J, Rodríguez I, Ramil M, Cela R. Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2014;1339:42–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.087>
89. Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T. Application of dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC–MS/MS for the trace determination of clotrimazole in environmental water samples. *J Sep Sci* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2022 Jun 19];36(15):2514–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jssc.201300271>
 90. Peng X, Huang Q, Zhang K, Yu Y, Wang Z, Wang C. Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Sci Total Environ* [Internet]. 2012;426:311–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.067>
 91. Chen ZF, Ying GG, Lai HJ, Chen F, Su HC, Liu YS, et al. Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2012 Dec 10 [cited 2022 Jun 19];404(10):3175–88. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-6444-2>
 92. Wick A, Fink G, Ternes TA. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010 Apr 2;1217(14):2088–103.
 93. Van De Steene JC, Stove CP, Lambert WE. A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water. *Sci Total Environ*. 2010 Jul 15;408(16):3448–53.
 94. Lindberg RH, Fick J, Tysklind M. Screening of antimycotics in Swedish sewage treatment plants - Waters and sludge. *Water Res*. 2010;44(2):649–57.
 95. Adeleye AS, Xue J, Zhao Y, Taylor AA, Zenobio JE, Sun Y, et al. Abundance, fate, and effects of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments. *J Hazard Mater*. 2022 Feb 15;424:127284.
 96. Douziech M, Conesa IR, Benítez-López A, Franco A, Huijbregts M, Van Zelm R. Quantifying variability in removal efficiencies of chemicals in activated sludge wastewater treatment plants-a meta-analytical approach. *Environ Sci Process Impacts*. 2018 Jan 1;20(1):171–82.
 97. Clotrimazole | C22H17ClN2 - PubChem [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clotrimazole#section=Solubility>
 98. Zarn JA, Brüscheiler BJ, Schlatter JR. Azole Fungicides Affect Mammalian

- Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 α -Demethylase and Aromatase. [cited 2022 Jun 22]; Available from: <http://dx.doi.org/>
99. Trösken ER, Fischer K, Völkel W, Lutz WK. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2022 Jun 22];219(1–3):33–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330141/>
 100. Gyllenhammar I, Eriksson H, Söderqvist A, Lindberg RH, Fick J, Berg C. Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2009 Jan 31 [cited 2022 Jun 22];91(2):102–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19036460/>
 101. Porsbring T, Blanck H, Tjellström H, Backhaus T. Toxicity of the pharmaceutical clotrimazole to marine microalgal communities. *Aquat Toxicol*. 2009 Feb 19;91(3):203–11.
 102. Pérez-Rivera AA, Hu T, Aardema MJ, Nash JF. Evaluation of the genotoxicity of the imidazole antifungal climbazole: Comparison to published results for other azole compounds. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2009 Jan 10;672(1):27–39.
 103. Bromley MJ, Van Muijlwijk G, Fraczek MG, Robson G, Verweij PE, Denning DW, et al. Occurrence of azole-resistant species of *Aspergillus* in the UK environment. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014 Dec 1;2(4):276–9.
 104. Rocchi S, Godeau C, Crini G, Snelders E. Emergence of a Pathogenic Fungus Resistant to Triazole Antifungal Drugs. 2021;165–206.
 105. GLASS. Report of the 2nd Meeting of the Global AMR Surveillance System (GLASS) Collaborative Platform Meeting Report. Geneva, Switzerland; 2016.
 106. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis*. 2009 Dec 1;9(12):789–95.
 107. Assress HA, Nyoni H, Mamba BB, Msagati TAM. Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Jan 15;187:109868.