

Estrona, estradiol, etinilestradiol e diclofenac em águas superficiais portuguesas e sua contextualização internacional

Maria João Rocha^{1,2*} e Eduardo Rocha^{1,2}

¹ Laboratório de Histologia e Embriologia, Departamento de Microscopia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (U.Porto), Portugal

² Equipa de Histomorfologia, Fisiopatologia e Toxicologia Aplicada, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), U.Porto, Portugal.

* Autor correspondente. Email: mjrocha@icbas.up.pt

RESUMO: No espaço comunitário europeu a ocorrência de micropoluentes no ambiente tem vindo a ser motivo de grande preocupação. Neste sentido, além da criação em 2000 da Diretiva Quadro da Água (DQA), existe a Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão, que define uma lista de contaminantes de preocupação emergente, cuja monitorização deverá ser sistemática em todas as águas superficiais da União Europeia. Entre estes, realçam-se, pelo seu potencial de elevada atividade e toxicidade, três estrogénios (estrone, E₁; 17-β-estradiol, E₂; e 17-α-etinilestradiol, EE₂), e vários produtos farmacêuticos, entre eles um anti-inflamatório não esteroide (diclofenac, DCF). O principal objetivo deste trabalho de revisão é oferecer uma síntese integrada de estudos feitos em Portugal e no Mundo, versando o pertinente problema da ocorrência dos micropoluentes supracitados no ambiente aquático. Faz-se aqui a comparação das zonas estudadas em Portugal, entre si e contextualizando-as de um ponto de vista internacional, com recurso a dados bibliográficos. Por outro lado, e do ponto de vista biológico, alude-se neste artigo à questão dos potenciais impactos fisiológicos e ambientais dos compostos pesquisados, segundo as concentrações em causa e enquadrando-os nas listas dos químicos considerados nocivos, ou sob vigilância, segundo a DQA. Por fim, pondera-se a pertinência e perspetiva de novos estudos nesta matéria.

Palavras-chave: Diretiva Quadro da Água (DQA); Decisão de Execução 2015/495; Micropoluentes aquáticos; Substâncias prioritárias

ABSTRACT: In the common European space, the occurrence of micropollutants in the environment has been a matter of great concern. Therefore, in addition to the creation of the Water Framework Directive (WFD) in 2000, there is a list of contaminants of emerging concern, included in Commission Implementing Decision 2015/495, which should be systematically monitored in all surface waters of the European Union. Among these, three oestrogens (estrone, E₁; 17-β-estradiol, E₂; and 17-α-ethynylestradiol, EE₂), and several pharmaceutical products, including a non-steroidal anti-inflammatory (diclofenac, DCF), are highlighted for their potential high activity and toxicity. The main objective of this review is to offer an integrated synthesis of the existing studies in Portugal and in the world, on a pertinent fundamental problem that consists of the occurrence of the aforementioned micropollutants in the aquatic environment, comparing the areas studied in Portugal among them and contextualizing them from an international point of view, using bibliographic data. On the other hand, and from the biological point of view, this paper refers to the issues of potential physiological and environmental impacts of the researched compounds, according to the concentrations in question and in view of their inclusion in the lists of chemicals considered harmful, or under surveillance, according to the WFD. Finally, the relevance and perspective of further studies in this area are considered.

Keywords: Water Framework Directive (WFD); Commission Implementing Decision 2015/495; aquatic micropollutants; priority substances.

1. INTRODUÇÃO

Devido à importância fulcral que a água tem para a vida, a sua disponibilidade e qualidade têm sido objeto de intensa preocupação (e disputa) por parte de múltiplos agentes, incluindo naturalmente as populações e autoridades a diversos níveis. A comunidade científica tem intervindo de forma crescente, nomeadamente por via de diversas formas de investigação, incluindo ações de monitorização ambiental. Apesar disto, verifica-se, em todo o Mundo, que tanto ações passadas como a atual expansão irrefreável de atividades antropogénicas continuam a afetar, de forma extremamente negativa, a qualidade da água e, de uma forma mais geral, os vastos ecossistemas aquáticos a ela associados. De entre vários problemas está o da poluição da água. O tipo de poluentes que entra no ambiente aquático é vasto, estimando-se que, em paralelo, centenas de novos compostos com potencial poluente sejam registados diariamente na CAS® (*Chemical Abstracts Service*, www.cas.org/cas-home). Assim, o assunto “Qualidade da Água” tem sido alvo de muitas reflexões, particularmente no espaço europeu, onde de um modo geral, todos os estados membros da União Europeia (UE) se têm mostrado muito preocupados quanto à possibilidade de num futuro próximo não haver água suficiente, tanto em quantidade como em qualidade, para todos (Barnett *et al.*, 2005). Relativamente a este aspeto, uma das preocupações da UE quanto ao ambiente aquático está relacionada com o aumento das concentrações bem como a distribuição de micropoluentes, i.e., os que apresentam concentrações desde ng/L até µg/L. No sentido de limitar a presença destes compostos no meio aquático, desde o início deste milénio que a UE adotou legislação apropriada ao propósito: a “Diretiva do Parlamento e do Conselho Europeu para o Estabelecimento de um Quadro para a Ação Comum do Domínio da Política da Água”, mais conhecida por “Diretiva Quadro da Água 2000/60/CE” (UE-Diretiva, 2000). A DQA preconiza uma abordagem abrangente e integrada de proteção e gestão de todos os tipos de águas continentais — superficiais, costeiras e subterrâneas — com o objetivo fundamental de se alcançar um bom estado químico e ecológico das mesmas em 15 anos, a partir da data de publicação da Diretiva. Para atingir estes requisitos, em todos os estados da UE foram estabelecidos objetivos temporais, graduais, no sentido de garantir o sucesso do programa. Decidiu-se, entre outras medidas: a) aplicar multas aos infratores responsáveis pela deterioração do estado de todos os corpos de água superficiais; b) reduzir gradualmente a poluição provocada

por compostos prioritários, suprir as emissões, descargas e perdas de compostos perigosos prioritários para o ambiente; c) alcançar um bom potencial ecológico e um bom estado químico para todos os corpos de águas artificiais.

No entanto, como a situação hídrica entre os vários países da UE era (e ainda é) distinta, tem sido necessário proceder a ajustes à DQA original. De facto, apenas um ano após a sua publicação, a DQA 2000/60/CE sofreu a sua primeira reforma, passando a vigorar outra mais recente (UE-Decisão, 2001). Neste novo documento foi estabelecida a necessidade de cada estado membro da UE gerar, até 2009, um programa de medidas de proteção ambiental para cada uma das suas regiões hidrográficas. Além disto, foi ainda publicada (UE-Decisão, 2001) uma lista de trinta e três compostos considerados de monitorização prioritária/obrigatória face aos efeitos nocivos que produzem no ambiente. De acordo com a referida DQA, a utilização destes compostos deverá ser reduzida e as suas emissões deverão obedecer a valores limites aí estabelecidos. Entre estes compostos destacam-se os poluentes orgânicos persistentes (POPs), como pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e alquilfenóis. Foram ainda contempladas na DQA medidas de seleção de novos compostos prioritários, o que permite a revisão e atualização da lista anteriormente referida, no mínimo a cada quatro anos. No entanto, como a legislação europeia é muito complexa quanto à monitorização de compostos nocivos, o Regulamento 850/2004/CE (UE-Retificação, 2004) visou completar e uniformizar a legislação anterior, de modo a evitar incongruências jurídicas entre os textos comunitários e os nacionais e favorecer uma aplicação prática mais coerente no que se refere à produção, comercialização, uso e eliminação daqueles compostos. Assim, foram estabelecidos um conjunto de orientações e de valores de referência, atribuindo-se a cada estado membro a obrigação de definir detalhadamente quais as soluções institucionais e legislativas a adotar no sentido do seu cumprimento.

Posteriormente, a Diretiva 2008/105/CE (UE-Diretiva, 2008) alterou algumas normas de qualidade ambiental, no domínio da política da água, e, além de manter o número dos compostos prioritários em trinta e três, também estabeleceu uma lista de onze novas substâncias sujeitas a revisão, para eventual identificação como substâncias prioritárias ou substâncias perigosas prioritárias; ficando as referidas substâncias em fase dita de vigilância. Neste sentido, a Diretiva 2013/39/EU (UE-Diretiva, 2013) e a Decisão de Execução 2015/495

(UE-Decisão, 2015) integraram novas substâncias, agora totalizando quarenta e cinco. Entre estas, destacam-se duas hormonas esteroides naturais, como a estrona (E_1) e o 17β -estradiol (E_2), além de vários compostos usados em preparações farmacêuticas, como o 17α -etinilestradiol (EE_2), princípio ativo usado em pílulas anticoncepcionais, o diclofenac (DCF), fármaco anti-inflamatório, três antibióticos da família dos macrólidos (eritromicina, claritromicina e azitromicina), e um filtro UV usado em filtros solares, o 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo (Figura 1).

Estão em curso em todo o espaço da UE trabalhos para a elaboração de novos Planos de Gestão de Região Hidrográfica (PGRH) para o período 2016-2021, ao mesmo tempo que ainda decorrem os trabalhos de implementação dos planos para o período 2010-2015, aprovados em Portugal ao abrigo da Lei n.º 58/2005, Lei da Água (LA, 2005), que transpõe para o direito interno a Diretiva 2000/60/CE (UE-Diretiva, 2000).

Neste sentido, embora sejam extremamente relevantes todas as substâncias referidas na lista de vigilância para monitorização a nível da UE, este trabalho de revisão versa a presença em ambientes aquáticos de duas hormonas naturais (E_1 e E_2) e de dois micropoluentes de origem farmacêutica,

o estrogénio sintético EE_2 e o anti-inflamatório DCF, numa perspetiva nacional enquadrada numa alargada panorâmica internacional.

2. PRESENÇA DE ESTROGÉNIOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

2.1 Modo de ação dos estrogénios em organismos aquáticos (peixes)

De acordo com o *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS), desreguladores endócrinos são compostos naturais ou fabricados pelo Homem, que podem mimetizar ou interferir com a função de hormonas num organismo, produzindo uma diversidade de efeitos adversos sobre, *e.g.*, a biologia do desenvolvimento ou os sistemas reprodutivo, neurológico e imunológico, tanto em seres humanos como em animais domésticos e selvagens (NIEHS, 2010).

No caso dos EDCs com atividade estrogénica, em teleósteos, estas substâncias podem atuar em vários locais do seu organismo (Figura 2):

- No hipotálamo, inibindo a libertação de hormonas libertadoras de gonadotropinas (Tena-Sempere and Aguilar, 2005);

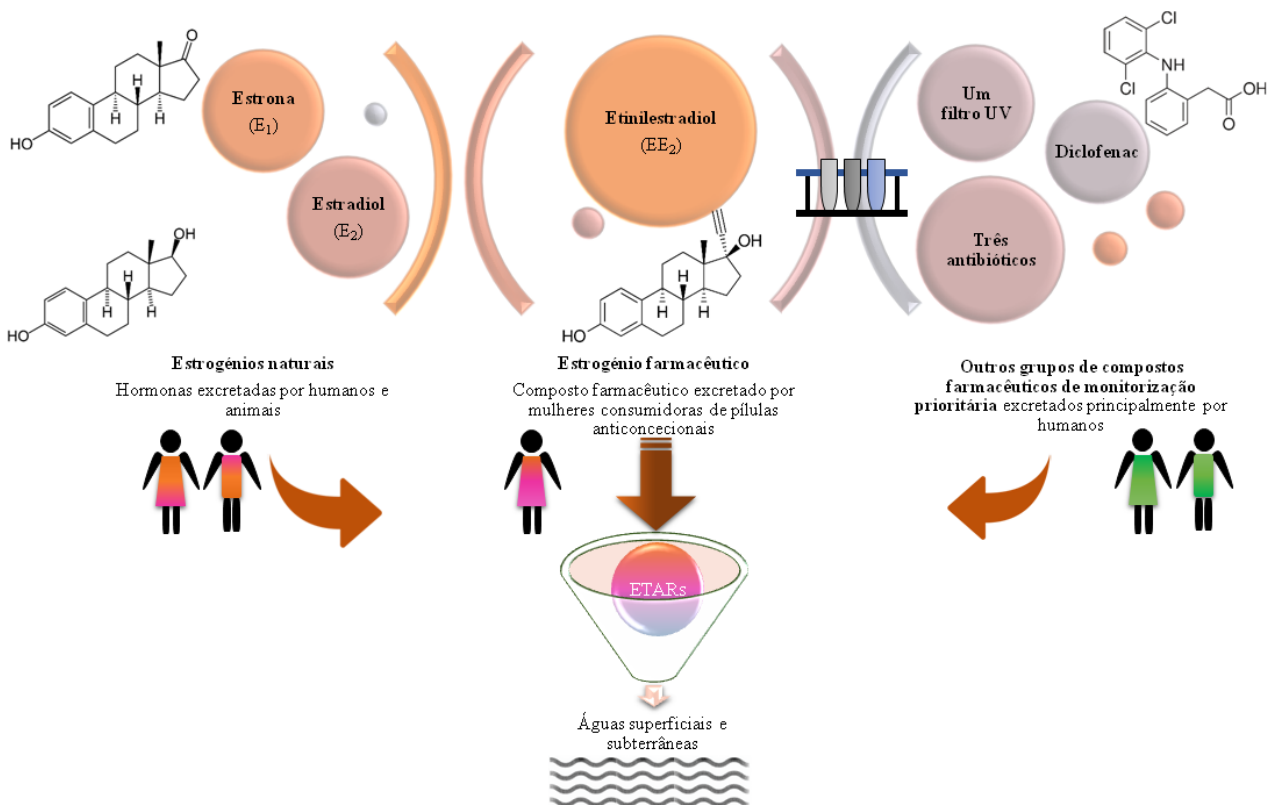


Figura 1. Origens e principal via de entrada no ambiente aquático de alguns dos quarenta e cinco compostos incluídos na lista de substâncias de monitorização obrigatória de acordo com a DQA (UE-Decisão, 2015).

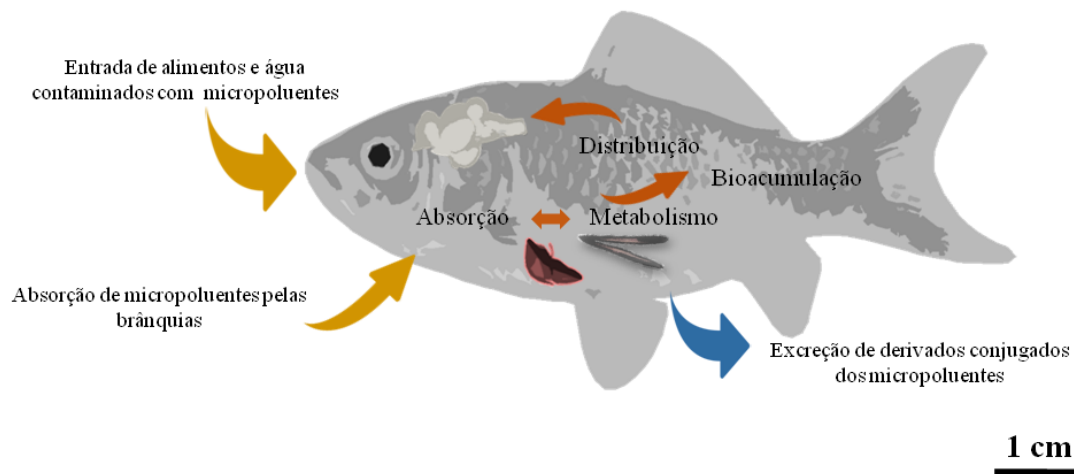


Figura 2. Vias de entrada, circulação e locais de ação dos compostos micropoluentes. Este trabalho de revisão centra-se em compostos com atividade reconhecidamente estrogénica, *in vitro* e *in vivo*, e que têm sido um foco de investigação em estudos feitos em Portugal e noutros países. A seleção de substâncias foi feita considerando três estrogénios, de entre os compostos desreguladores endócrinos (EDCs) mais potentes, e o anti-inflamatório mais consumido a nível nacional e mundial (Lonappan *et al.*, 2016).

- b) Na hipófise, inibindo a libertação de gonadotropinas (Tena-Sempere and Aguilar, 2005);
- c) Nas gónadas, interferindo na produção de hormonas esteroides, nomeadamente de estradiol (Kennedy *et al.*, 2013);
- d) Na circulação endógena de hormonas, visto terem a capacidade de se ligarem aos mesmos transportadores, e na sua metabolização (Tena-Sempere and Aguilar, 2005);
- e) Nas gónadas, agora ligando-se aos mesmos recetores celulares destinados às hormonas endógenas, podem inclusivamente causar alterações estruturais, como as situações de *ovotestis* reportadas em peixes (machos), *i.e.*, presença de ovócitos em testículos — já verificado em Portugal (Carrola *et al.*, 2012, Ferreira *et al.*, 2004).

2.2 Características de estrogénios e sua origem em ambientes aquáticos

Os estrogénios sexuais naturais e os sintéticos, designadamente o E_1 , o E_2 e o EE_2 (Figura 1) podem induzir, mesmo em baixas concentrações ambientais, efeitos nocivos sobre o sistema endócrino (Gutendorf and Westendorf, 2001). Tais consequências estão descritas numa ampla

gama de espécies, entre moluscos, crustáceos, peixes, aves e mamíferos (Hotchkiss *et al.*, 2008, Matthiessen, 2008, McLachlan *et al.*, 2006, Milnes *et al.*, 2006, Scott *et al.*, 2007, Sumpter, 2005).

Para além das alterações endócrinas anteriormente referidas, tem sido também observada diminuição de respostas do sistema imunitário, tanto em animais aquáticos como terrestres, inclusive em humanos (Chalubinski and Kowalski, 2006, Dunbar *et al.*, 2012, Erin *et al.*, 2011, Rogers *et al.*, 2013, Waring and Harris, 2005). Estes estudos, em conjunto com os factos anteriormente referidos, justificaram a incorporação de E_1 , E_2 e EE_2 na lista de compostos sob vigilância (UE-Decisão, 2015, UE-Diretiva, 2013). Assim, com o objetivo de se conhecer quais as concentrações destes EDCs nas águas superficiais, foram encetados estudos no sentido de monitorizar a presença e evolução temporal destes compostos no ambiente, nos mais diversos locais de todos os continentes. No ambiente aquático, a origem primária destes compostos corresponde à excreção de E_1 e E_2 pela urina e fezes de animais e de EE_2 através da urina de mulheres consumidoras de pílulas anticoncepcionais contendo este fármaco (Belfroid *et al.*, 1999). Assim, tanto os efluentes provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs) — estruturas que nem sempre são eficazes na remoção destes EDCs (Zhou and Smith, 2002) — como as eventuais descargas

diretas de esgotos (portanto sem tratamento) em cursos de água, transportam estes compostos para rios, estuários e zonas de costa, em concentrações capazes induzirem desregulação endócrina após exposição.

De facto, embora as concentrações ambientais de estrogénios sejam geralmente na ordem dos ng/L (Figuras 3 e 4), tem-se comprovado experimentalmente que tais concentrações são potencialmente nefastas, nomeadamente para peixes. Por exemplo, concentrações de apenas ≈ 4 ng/L de E_2 resultaram na formação de *ovotestis* em machos do medaka japonês (*Oryzias latipes*) (Metcalf *et al.*, 2001). Noutro exemplo, machos do fundulo (*Fundulus heteroclitus*), expostos a ≈ 100 ng/L de EE_2 , diminuíram os níveis

plasmáticos de 11-ceto-testosterona, aumentando a síntese hepática de vitelogenina e o índice gonadossomático (Peters *et al.*, 2010). Acresce que a exposição de machos do peixe zebra (*Danio rerio*) a concentrações compreendidas entre ≈ 2 e ≈ 10 ng/L de EE_2 resultaram num elevado número de espermatozoides com malformações (Xu *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2014). Ainda em peixe zebra, mas agora relativamente a consequências para a progénie, verificou-se uma diminuição das taxas de eclosão, a par de alteração da natação normal, após exposição de embriões a 100 ng/L de EE_2 (Versonnen and Janssen, 2004). Muitos outros exemplos de efeitos negativos em peixes após exposição a E_2 ou a EE_2 (em ng/L) podem ser encontrados na literatura.

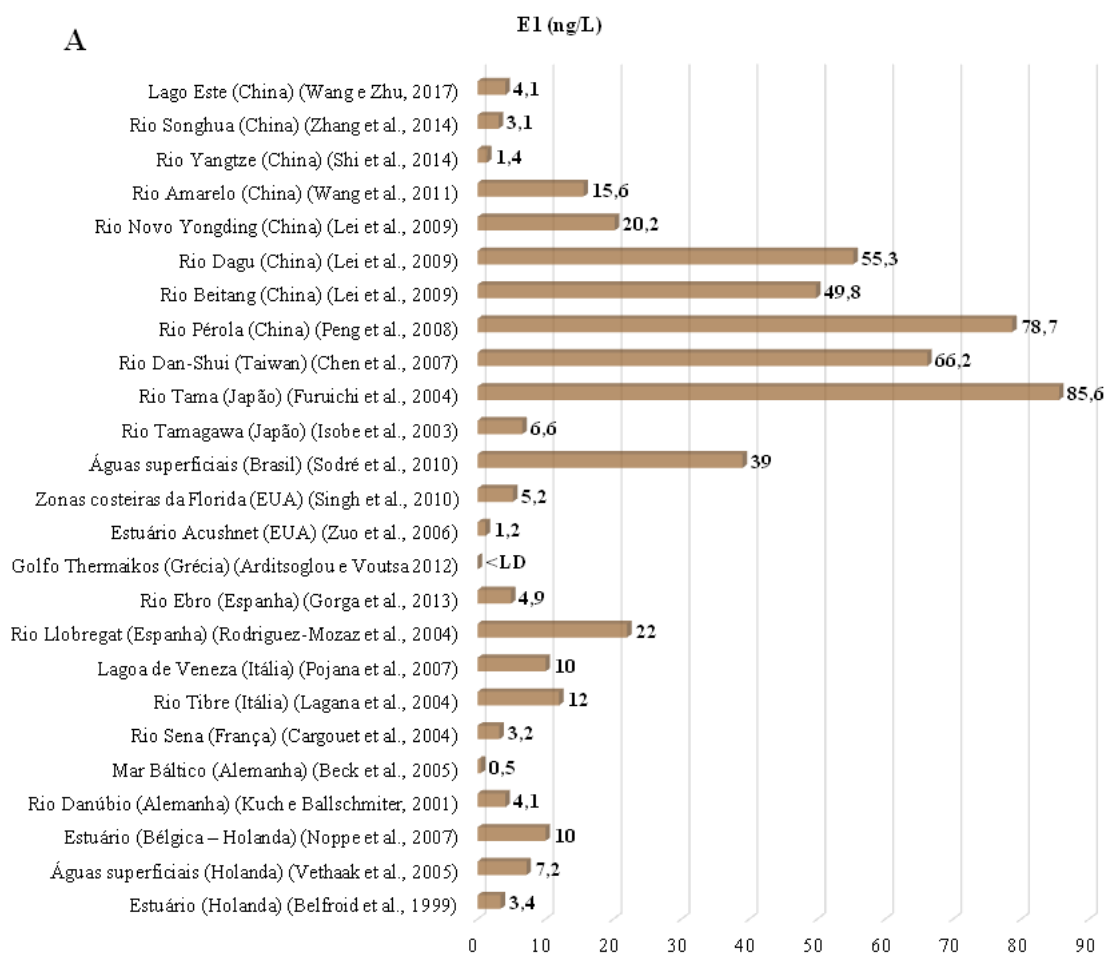


Figura 3. Concentrações de estrogénios naturais em vários pontos do Mundo. As colunas representam valores máximos para E_1 (A) e E_2 (B) (Arditsoglou and Voutsas, 2012, Aydin and Talinli, 2013, Beck *et al.*, 2005, Belfroid *et al.*, 1999, Cargouët *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2007, Furuichi *et al.*, 2004, Gorga *et al.*, 2013, Isobe *et al.*, 2003, Kuch and Ballschmiter, 2001, Laganà *et al.*, 2004, Lei *et al.*, 2009, Noppe *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2008, Pojana *et al.*, 2007, Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2010, Sodré *et al.*, 2010, Vethaak *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2017, Wang and Zhu, 2017, Wang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2014, Zuo *et al.*, 2006). LD – limites de deteção do método usado na avaliação.

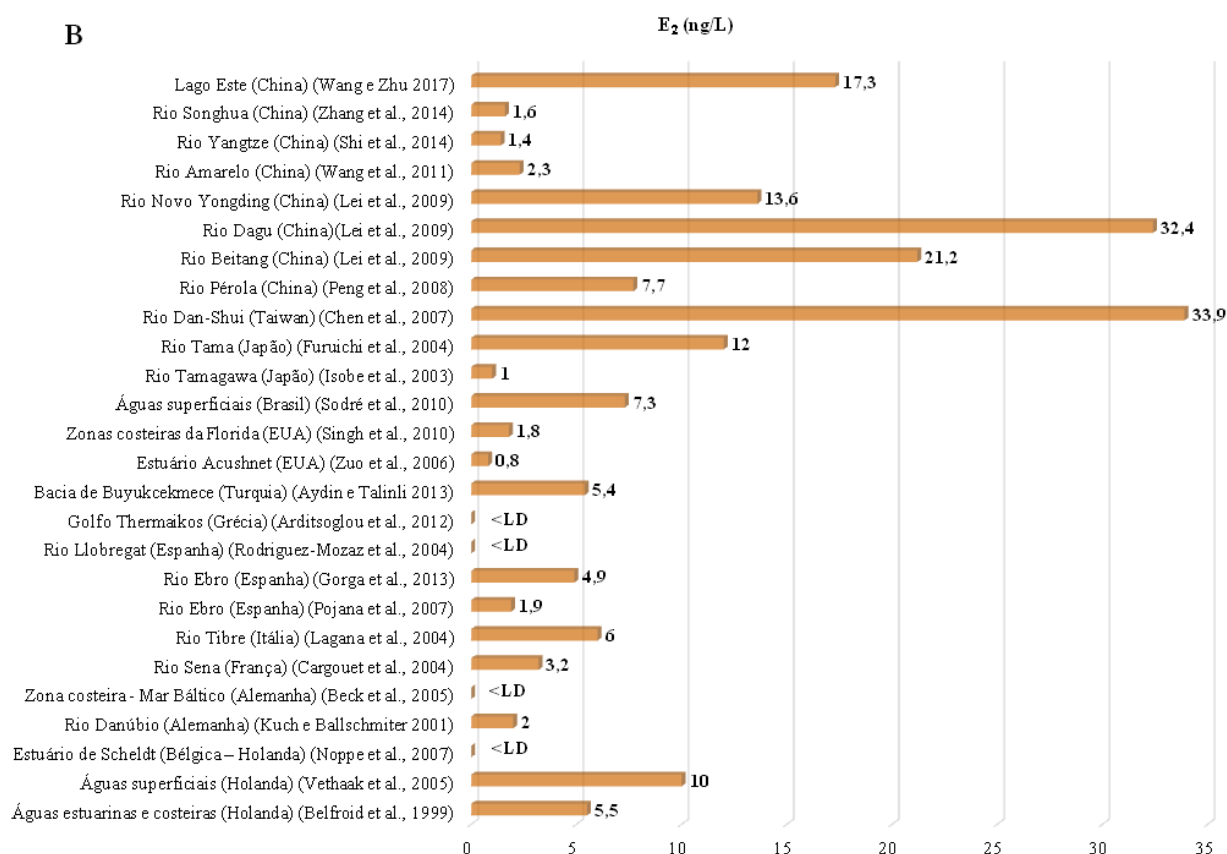


Figura 3 (continuação). Concentrações de estrogénios naturais em vários pontos do Mundo. As colunas representam valores máximos para E_1 (A) e E_2 (B) (Arditsoglou and Voutsas, 2012, Aydin and Talinli, 2013, Beck *et al.*, 2005, Belfroid *et al.*, 1999, Cargouët *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2007, Furuichi *et al.*, 2004, Gorga *et al.*, 2013, Isobe *et al.*, 2003, Kuch and Ballschmitter, 2001, Laganà *et al.*, 2004, Lei *et al.*, 2009, Noppe *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2008, Pojana *et al.*, 2007, Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2010, Sodré *et al.*, 2010, Vethaak *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2017, Wang and Zhu, 2017, Wang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2014, Zuo *et al.*, 2006). LD – limites de deteção do método usado na avaliação.

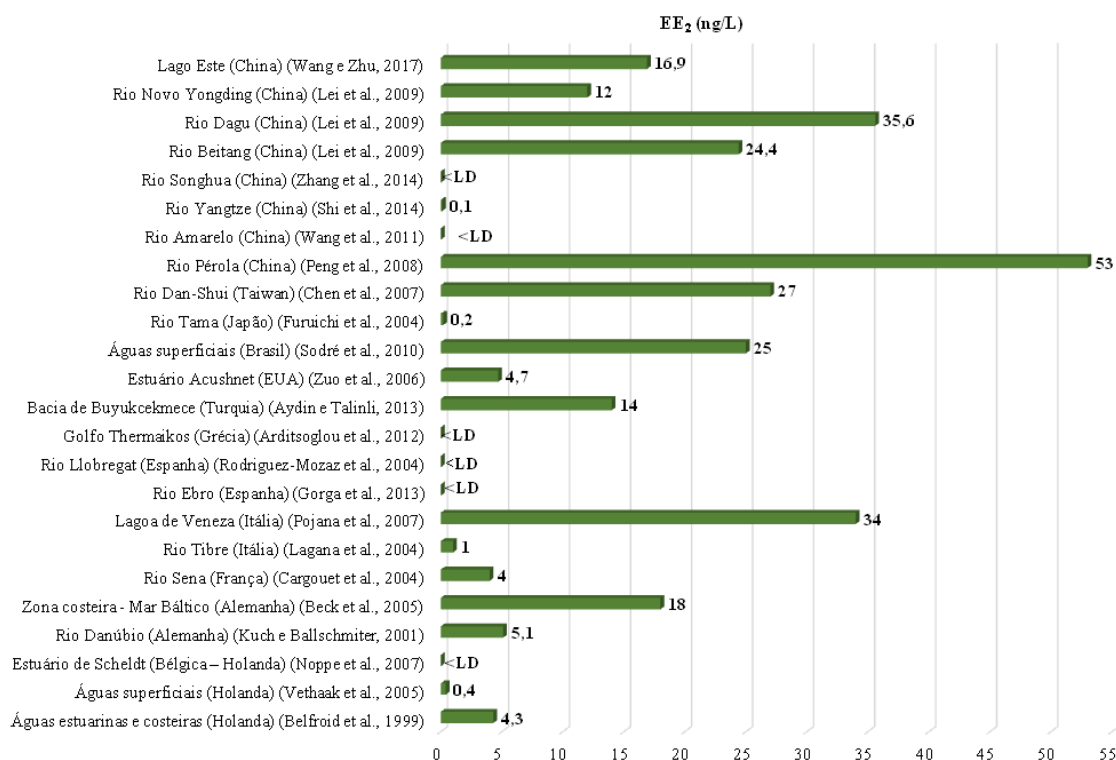


Figura 4. Concentrações de EE_2 em vários pontos do Mundo. As colunas representam valores máximos de EE_2 (Arditsoglou and Voutsas, 2012, Aydin and Talinli, 2013, Beck *et al.*, 2005, Belfroid *et al.*, 1999, Cargouët *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2007, Furuichi *et al.*, 2004, Gorga *et al.*, 2013, Isobe *et al.*, 2003, Kuch and Ballschmitter, 2001, Laganà *et al.*, 2004, Lei *et al.*, 2009, Noppe *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2008, Pojana *et al.*, 2007, Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004, Shi *et al.*, 2014, Singh *et al.*, 2010, Sodré *et al.*, 2010, Vethaak *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2017, Wang and Zhu, 2017, Wang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2014, Zuo *et al.*, 2006). LD – limites de deteção do método usado na avaliação.

2.3 Presença de estrogénios em águas superficiais Portuguesas

Portugal é um dos estados membros da UE que se comprometeu com a Comissão Europeia (CE) a cumprir as diretivas referidas no documento da DQA. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa envidou esforços sistemáticos para criar e desenvolver métodos analíticos adequados à quantificação de EDCs em águas superficiais provenientes de rios, estuários e costa atlântica adjacentes aos mesmos. A compilação dos resultados provenientes de áreas localizadas tanto a norte como a sul de Portugal Continental permitem inferir a existência de potenciais riscos relacionados com a presença de EDCs nas nossas águas. Assim, alerta-se a comunidade e os decisores sobre os possíveis impactos ambientais causados por estes compostos, de modo a que possam tomar medidas que conduzam à redução e quiçá à erradicação de EDCs nestes habitats.

De um modo geral, observou-se que os valores médios de estrogénios (naturais e sintéticos) nas águas Portuguesas foram de ≈ 13 ng/L para E_1 , ≈ 12 ng/L para E_2 e ≈ 15 ng/L para EE_2 ; o que de acordo com os estudos *in vivo* anteriormente referidos (entre outros) são quantidades capazes de causar efeitos disruptivos em animais aquáticos; e mesmo em humanos (Safe 2000). Este facto torna-se particularmente relevante tendo em conta que a maior parte das águas das zonas por nós estudadas são habitualmente utilizadas, por residentes e/ou turistas, tanto para fins recreativos como para a pesca.

Analisando os valores da Tabela 2, inferimos que de norte a sul de Portugal a maioria das águas superficiais analisadas apresentam deficiências de qualidade no que respeita à presença de estrogénios. Como se discute na bibliografia citada para cada zona, a elevada dispersão dos valores mínimos e máximos medidos para cada composto estrogénico analisado resultará de descargas, tanto de efluentes de ETARs como de esgotos domésticos. Estas inferências estão diretamente correlacionadas com os dados obtidos no último censo realizado em 2011, onde é revelado um elevado número de habitações (mais de 17000) sem qualquer tipo de ligação a redes de esgoto (CENSUS, 2011). Para além destas situações, pouco compatíveis com as obrigações inerentes aos acordos internacionais assumidos por Portugal aquando da aprovação da DQA, é ainda relevante realçar a forma aparentemente pouco eficiente (pelo menos para os EDCs focados), quiçá mal dimensionada, das ETARs que suportam o tratamento de esgotos na

maioria das zonas avaliadas. A propósito, destaca-se ainda que durante os períodos de verão — ocasião em que várias das zonas estudadas são “inundadas” por turistas, que em muitos casos acrescem 50% ao número de habitantes (Rocha *et al.*, 2013a) — os níveis das substâncias em causa aumentam de forma significativa, tanto nos estuários como nas águas das praias situadas perto dos mesmos. A partir dos nossos estudos, e outros, torna-se patente que os parâmetros físico-químicos tipicamente usados para avaliar a qualidade de águas superficiais (e.g., temperatura, pH, O_2 dissolvido, nitritos, nitratos e fosfatos) — e mesmo adicionando-se parâmetros microbiológicos — não são suficientemente abrangentes para garantir a proteção da saúde ambiental e humana.

Comparando os valores compilados nas Figuras 3 a 5 conclui-se que, de modo geral, os níveis de estrogénios tendem a ser mais elevados em Portugal do que na Europa central/norte. De facto, os valores médios medidos para estas substâncias colocam Portugal ao nível de muitos países asiáticos. Apesar disto, exalta-se pela positiva os esforços de despoluição conduzidos no Rio Ave, seu estuário e costa Atlântica de Vila do Conde, visto no passado ter sido uma zona considerada muito poluída. É também de louvar os esforços que têm sido realizados por parte das autoridades portuguesas no sentido de serem cumpridos os compromissos assumidos por Portugal relativos à DQA. Por exemplo, comparando-se os resultados obtidos nos nossos primeiros estudos de monitorização no estuário do Rio Douro — colheitas anteriores a 2005 (Ribeiro *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2008) — com dados mais recentes, pode-se observar um decréscimo muito acentuado nas concentrações de EDCs nesta área, principalmente de E_1 e EE_2 (Rocha *et al.*, 2013c). No entanto, como em Portugal não existem dados anteriores a 2005 para os níveis destes compostos, não é possível estabelecer com certezas linhas de tendência relativas a uma diminuição progressiva das concentrações destes EDCs nos habitats avaliados. Pela negativa, destacamos: 1) níveis anormalmente elevados de EDCs medidos em várias zonas vulgarmente tidas como de “águas limpas” (e.g., Rio Mira) (Rocha *et al.*, 2016b); 2) subavaliação das estruturas de tratamento de esgotos, por exemplo, sem se considerar adequadamente enormes afluências turísticas durante o verão (e.g., Ria Formosa) (Rocha *et al.*, 2013a); 3) pouco estudo das correntes oceânicas e estuarinas que podem canalizar estes compostos para zonas protegidas (e.g., reserva natural do estuário do Rio Sado) (Rocha *et al.*, 2013b).

O conjunto de resultados resumidos na Tabela 1

para E_1 , E_2 e EE_2 , bem como os valores médios destes EDCs apresentados na Figura 6, é um dos mais sistemáticos disponíveis na literatura internacional sobre o status estrogénico de um determinado país. Esta informação, que pode ser vista como uma referência de base, alargada, para as concentrações de estrogénios nas águas portuguesas, permite-nos desde logo, enquanto país, monitorizar a eficácia da implementação de medidas que possam levar à redução dos níveis ambientais desses EDCs ao longo do tempo.

2.4 Efeitos de compostos estrogénicos em animais aquáticos e no Homem

Estimar com precisão qual a contribuição que a poluição ambiental por EDCs, nomeadamente os mencionados neste estudo, no aparecimento e desenvolvimento de doenças em seres humanos é extremamente difícil e até polémico (Briggs, 2003, Fucic *et al.*, 2012). Este facto advém da dificuldade que existe em correlacionar, e sobretudo de provar, o aparecimento de determinadas doenças em humanos com a presença de EDCs em águas superficiais. Desde logo, e ao contrário dos animais aquáticos, os seres humanos não se encontram permanentemente em contacto direto com águas

poluídas. No entanto, e apesar de existirem muitas variáveis que se deverão sempre considerar, estudos recentes têm relacionado a exposição humana a estrogénios, fitoestrogénios e xenoestrogénios com o desenvolvimento de uma série de distúrbios, que vão desde deficiências imunológicas, defeitos congénitos, doenças endócrinas crónicas e até ao aparecimento de cancro (Tabela 2). Portanto, pelo menos em teoria e seguindo o princípio da precaução, é concebível que o contato com água contaminada e/ou o consumo de peixes e/ou de mariscos provenientes de zonas poluídas com EDCs possam contribuir para o incremento deste tipo de alterações fisiológicas, como já anteriormente se discutiu (aa, Rocha *et al.*, 2013a, Rocha *et al.*, 2013b). Nessa perspetiva, durante a última década tem havido uma preocupação crescente em estabelecer relações entre presença de EDCs no ambiente e o aparecimento de doenças no Homem, nomeadamente de foro oncológico, cuja incidência e prevalência tem vindo a aumentar significativamente (Albini *et al.* 2014). Pensa-se que esta relação se deve ao facto das estruturas químicas dos EDCs estrogénicos se assemelharem à do E_2 , que é uma molécula fisiologicamente muito ativa e que se manteve conservada do ponto de

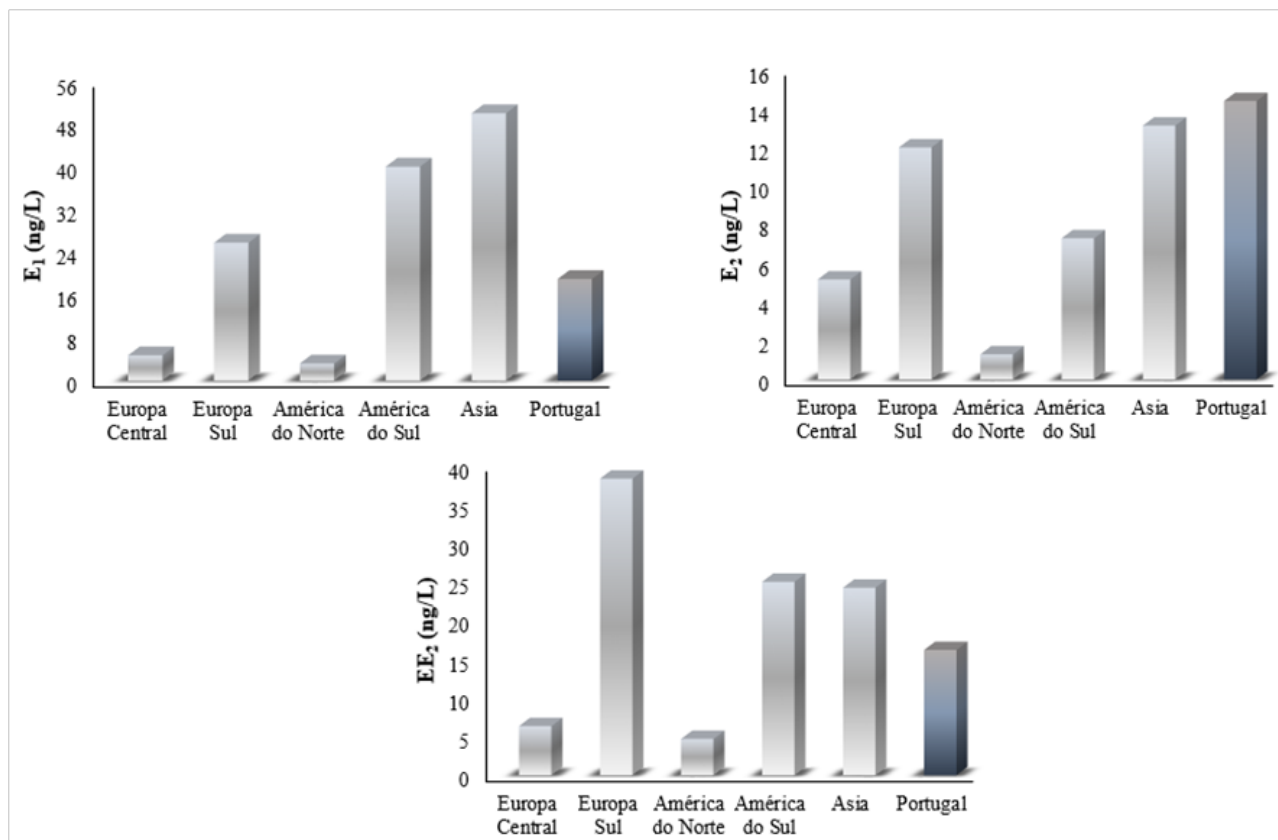


Figura 5. Valores médios de estrogénios em águas superficiais portuguesas, a par de outros calculados para o mesmo tipo de águas em outras partes do Mundo.

Tabela 1. Concentrações ambientais (médias mínimas – médias máximas) de estrogénios de origem natural e farmacêutica em águas superficiais Portuguesas.

EDC	Local	Concentração (ng/L)		Referências
E ₁	Rio Lima, estuário e costa Atlântica	4,6	- 36,3	(Rocha <i>et al.</i> , 2014a)
	Rio Ave, estuário e costa Atlântica	0,5	- 7,2	(Rocha <i>et al.</i> , 2013d)
	Rio Leça, estuário e costa Atlântica	4,9	- 10,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2012b)
	Estuário do Rio Douro	<5,0	- 176	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2007)
	Estuário do Rio Douro	<15,0	- 113	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009b)
	Estuário do Rio Douro	0,9	- 1,7	(Rocha <i>et al.</i> , 2012a)
	Estuário do Rio Douro e costa Atlântica	1,5	- 4,6	(Rocha <i>et al.</i> , 2013c)
	Ria de Aveiro	5,6	- 13,7	(Rocha <i>et al.</i> , 2016a)
	Estuário do Rio Mondego	1,0	- 14,6	(Rocha <i>et al.</i> , 2014b)
	Rio Tejo e seu estuário	2,4	- 4,0	(Rocha <i>et al.</i> , 2015)
	Rio Sado e seu estuário	1,0	- 9,8	(Rocha <i>et al.</i> , 2013b)
	Rio Mira e seu estuário	4,1	- 25,1	(Rocha <i>et al.</i> , 2016b)
	Ria Formosa	1,0	- 2,0	(Rocha <i>et al.</i> , 2013a)
E ₂	Rio Lima, estuário e costa Atlântica	2,4	- 24,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2014a)
	Rio Ave, estuário e costa Atlântica	1,6	- 9,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2013d)
	Rio Leça, estuário e costa Atlântica	3,3	- 5,9	(Rocha <i>et al.</i> , 2012b)
	Estuário do Rio Douro	<7,0	- 15,0	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2007)
	Estuário do Rio Douro	56,0	- 102	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009b)
	Estuário do Rio Douro	5,2	- 5,7	(Rocha <i>et al.</i> , 2012a)
	Estuário do Rio Douro e costa Atlântica	5,4	- 8,5	(Rocha <i>et al.</i> , 2013c)
	Ria de Aveiro	8,1	- 21,7	(Rocha <i>et al.</i> , 2016a)
	Estuário do Rio Mondego	<3,0		(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009a)
	Estuário do Rio Mondego	1,5	- 18,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2014b)
	Rio Tejo e seu estuário	4,4	- 10,1	(Rocha <i>et al.</i> , 2015)
	Rio Sado e seu estuário	1,2	- 10,8	(Rocha <i>et al.</i> , 2013b)
	Rio Mira e seu estuário	6,6	- 58,8	(Rocha <i>et al.</i> , 2016b)
Ria Formosa	1,3	- 10,1	(Rocha <i>et al.</i> , 2013a)	
EE ₂	Rio Lima, estuário e costa Atlântica	0,3	- 19,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2014a)
	Rio Ave, estuário e costa Atlântica	0,3	- 20,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2013d)
	Rio Leça, estuário e costa Atlântica	2,1	- 4,4	(Rocha <i>et al.</i> , 2012b)
	Estuário do Rio Douro	12,0	- 56,0	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2007)
	Estuário do Rio Douro	18,0	- 102	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009b)
	Estuário do Rio Douro	1,0	- 1,3	(Rocha <i>et al.</i> , 2012a)
	Estuário do Rio Douro e costa Atlântica	<1,3	- 4,5	(Rocha <i>et al.</i> , 2013c)
	Ria de Aveiro	9,6	- 33,2	(Rocha <i>et al.</i> , 2016a)
	Estuário do Rio Mondego	0,3	- 11,3	(Rocha <i>et al.</i> , 2014b)
	Rio Tejo e seu estuário	4,6	- 9,1	(Rocha <i>et al.</i> , 2015)
	Rio Sado e seu estuário	1,1	- 3,2	(Rocha <i>et al.</i> , 2013b)
	Rio Mira e seu estuário	4,6	- 42,2	(Rocha <i>et al.</i> , 2016b)
	Ria Formosa	12,1	- 25,0	(Rocha <i>et al.</i> , 2013a)

Tabela 2. Exemplos de doenças no Homem passíveis de serem promovidas por exposição a EDCs estrogénicos.

EDCs	Doença	Referências
E ₁ , E ₂ e EE ₂	Deficiências imunitárias	(Ansar, 2000, Chalubinski and Kowalski, 2006)
	Cancros da mama, ovário e útero	(Ganmaa and Sato, 2005)
	Cancro em crianças e adolescentes	(Pritchard-Jones <i>et al.</i> , 2006)
	Desenvolvimento anormal da próstata	(Schug <i>et al.</i> , 2011; Taylor <i>et al.</i> , 2011)

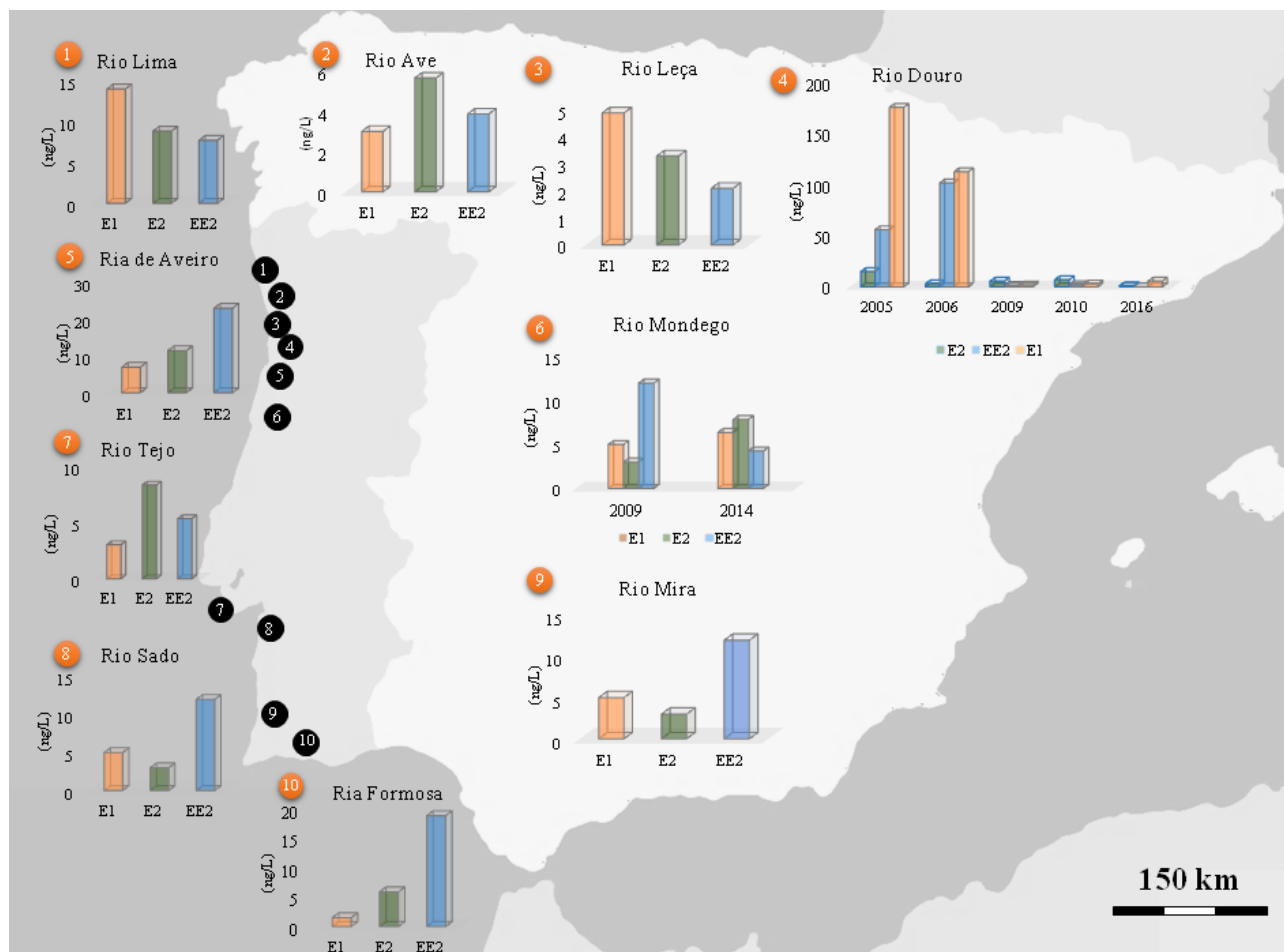


Figura 6. Concentrações médias de estrogénios naturais (E_1 e E_2) e sintético (EE_2) em Portugal. A bibliografia usada na elaboração desta figura teve como base os artigos referidos na Tabela 1. (1) - Rio Lima (Rocha *et al.*, 2014a); (2) - Rio Ave (Rocha *et al.*, 2013d); (3) - Rio Leça (Rocha *et al.*, 2012b); (4) - Rio Douro (Ribeiro *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2009b, Rocha *et al.*, 2012a, Rocha *et al.*, 2013c) e dados pessoais; (5) - Ria de Aveiro (Rocha *et al.*, 2016a); (6) - Rio Mondego (Rocha *et al.*, 2014b); (7) - Rio Tejo (Rocha *et al.*, 2015); (8) - Rio Sado (Rocha *et al.*, 2013b); (9) - Rio Mira (Rocha *et al.*, 2016b); (10) - Ria Formosa (Rocha *et al.*, 2013a).

vista filogenético (Fucic *et al.* 2012). Isto significa que a distribuição de recetores de estrogénio é ampla e que a exposição de mamíferos (inclusive de humanos) a EDCs pode, tal como em peixes e outros animais aquáticos, despoletar interferências funcionais em importantes vias metabólicas e fisiológicas, algumas das quais estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de cancro (Ganmaa and Sato 2005, Pritchard-Jones *et al.*, 2006, Taylor *et al.* 2011, Fucic *et al.* 2012, Albini *et al.* 2014). Acresce que níveis elevados de estrogénios podem induzir (em peixes e mamíferos) a produção de espécies reativas de oxigénio, provocando hipometilação e instabilidade microssatélite (Cavalieri *et al.* 1997, Liehr 2001). Estes fenómenos constituem um dos passos iniciais da carcinogénese e causam o aparecimento de adutos de ADN e outros danos genéticos, vistos, por exemplo, pelo

surgimento de micronúcleos. Estes últimos foram estudados em eritrócitos de peixes capturados em alguns dos estuários Portugueses aqui referidos, verificando-se uma frequência aumentada de micronúcleos nas zonas que apresentavam concentrações mais altas de EDCs estrogénios (Carrola *et al.* 2014).

3. PRESENÇA DE DICLOFENAC EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os compostos de origem farmacêutica são sintetizados para atuarem nos tecidos e órgãos alvo de forma célere e depois serem rapidamente metabolizados e eliminados. Regra geral, como estes produtos são muito hidrossolúveis é possível encontrarem-se em concentrações consideradas relevantes, i.e., até $\mu\text{g/L}$, no compartimento aquático.

3.1 Modo de ação do diclofenac em organismos aquáticos

O diclofenac (DCF) é um produto farmacêutico anti-inflamatório não esteroide (AINE) cujo mecanismo de ação envolve a inibição da biossíntese de prostaglandinas. Para tal, o fármaco inibe (de forma equipotente) duas ciclooxygenases (COX-1 e COX-2), enzimas que catalisam a síntese de prostaglandinas, a partir de ácido araquidónico, importantes em diversos processos, nomeadamente indução da resposta inflamatória, intervindo na fisiologia da reprodução, inclusivamente na ovulação (Smyth *et al.*, 2009).

Em peixes, as formas induzíveis de COX apresentam grande similaridade com a dos mamíferos (Zou *et al.*, 1999). No entanto, existem algumas diferenças a considerar uma vez que nem todos os peixes teleósteos têm as mesmas formas de COX (Ishikawa *et al.*, 2007). Já os invertebrados, como os corais, também apresentam dois genes COX, capazes de codificar isoenzimas COX, mas estes não demonstraram correspondência com as COX-1 e COX-2 dos vertebrados (Jarving *et al.*, 2004).

Comparando peixes com mamíferos, verificou-se que os processos biológicos envolvidos em ambos os grupos incluem as respostas inflamatórias e imunitárias, sugerindo um modo de ação que, tudo indica, é bastante similar (Cuklev *et al.*, 2011).

3.2 Características e origens do diclofenac em ambientes aquáticos

De entre todos os AINEs, o DCF é o mais amplamente usado a nível mundial (McGettigan and Henry, 2013). Devido à sua elevada polaridade os AINEs são ubíquos no meio aquático, principalmente em ecossistemas de água doce, onde podem ser encontrados em concentrações que variam entre ng/L a poucos mg/L (Halling-Sørensen *et al.*, 1998, Khetan and Collins, 2007).

No Homem, mais de 90% do diclofenac sódico administrado por via oral é absorvido, mostrando um metabolismo pré-sistémico de 40%. Como a

sua biotransformação é mínima, i.e., a partir da molécula mãe formam-se diretamente conjugados glucurónidos e hidroxilados (por hidroxilações simples e múltiplas), todos os metabolitos do DCF são biologicamente ativos (www.indice.eu/pt/medicamentos).

Como a principal via de excreção do DCF é a urina, é então plausível que a principal via de entrada deste composto no ambiente seja feita através dos esgotos onde são na sua maioria recolhidos nas ETARs (Figura 1). Realça-se que embora ETARs consigam remover cerca de 30 a 70% de DCF (Lonappan *et al.*, 2016), como o DCF é um fármaco muito utilizado, tanto a sua forma livre como a grande quantidade dos seus metabolitos acabam por atingir lagos, rios e estuários. Como na Europa, pelo menos a comunitária, incluindo Portugal, a maioria dos esgotos urbanos estão ligados a ETARs, são os seus efluentes os principais responsáveis pela introdução de DCF no ambiente aquático.

Alguns exemplos de concentrações de DCF encontradas em águas superficiais, maioritariamente de rios, tanto em Portugal como em várias partes do Mundo, são apresentados na Tabela 3 e Figuras 7 e 8. Comparando-se de um modo geral os valores compilados nestas Tabela e Figuras, os resultados disponíveis sugerem que os níveis de DCF, tal como já referido para os EDCs, tendem a ser mais elevados em Portugal do que em outros países europeus (Figura 8).

De facto, os níveis encontrados para o DCF no Rio Sousa coloca-o inclusivamente acima de alguns registos efetuados em países Asiáticos, com a exceção do Paquistão. Como não existem estudos abundantes e sistemáticos sobre o DCF em Portugal, torna-se ainda impossível estabelecer se tem de facto havido intenção/esforços específicos das autoridades Portuguesas em restringir a libertação deste composto através dos efluentes das ETARs. No entanto, a melhoria do funcionamento das ETARs pode ajudar muito à diminuição das concentrações ambientais deste composto (Vieno and Sillanpää, 2014).

Tabela 3. Concentrações ambientais (mínimas – máximas) do anti-inflamatório DCF em águas superficiais Portuguesas.

Fármaco	Local	Concentração (ng/L)		Referências
DCF	Costa litoral a Norte de Portugal	ND	- 241	(Lolić <i>et al.</i> , 2015)
	Rio Lis	ND	- 38	(Paíga <i>et al.</i> , 2016)
	Rios Mondego e Tejo	25,13	- 51,24	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
	Rio Ave	98	- 388	(Sousa <i>et al.</i> , 2019)
	Rio Sousa	≈ 500	- 3224	(Sousa <i>et al.</i> , 2019)

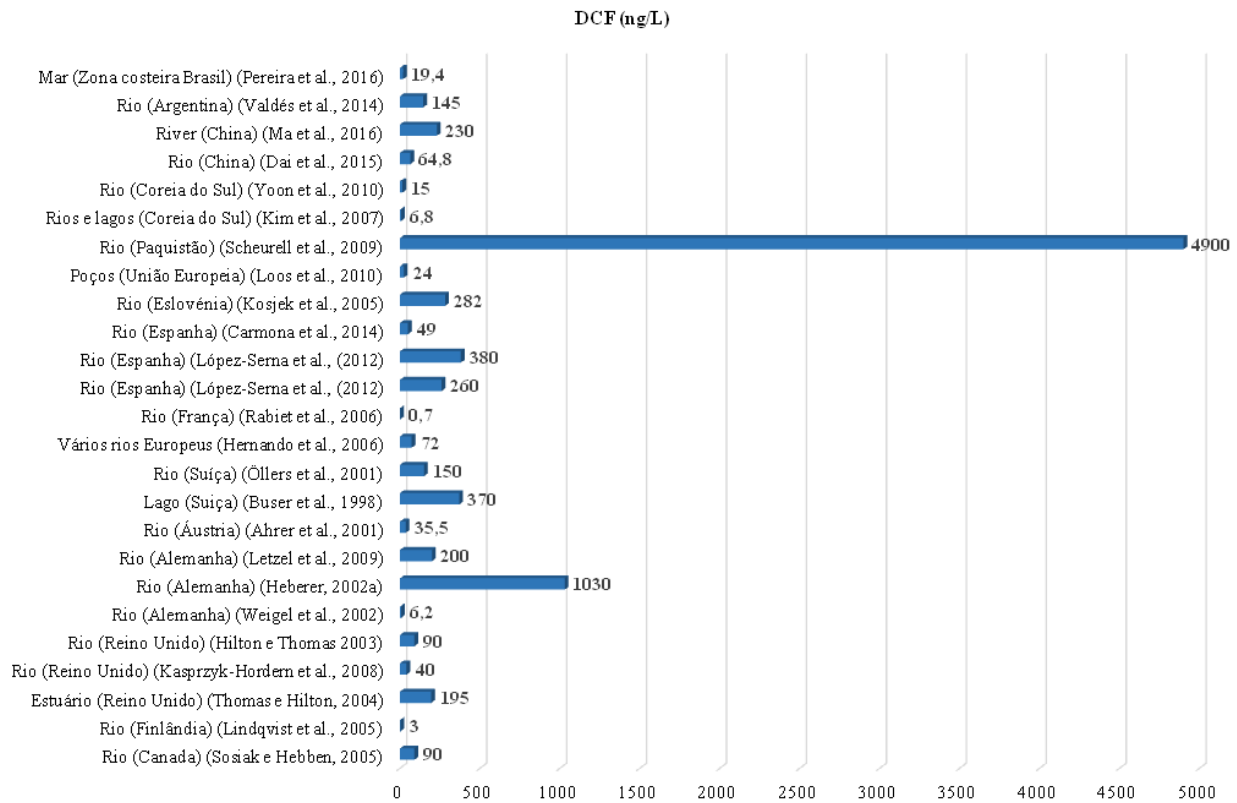


Figura 7. Concentrações máximas de DCF determinadas em vários pontos do Mundo (Ahrer *et al.*, 2001, Buser *et al.*, 1998, Carmona *et al.*, 2014, Heberer *et al.*, 1998, Hernando *et al.*, 2006, Hilton and Thomas, 2003, Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2007, Kosjek *et al.*, 2005, Letzel *et al.*, 2009, Lindqvist *et al.*, 2005, Loos *et al.*, 2010, López-Serna *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2016, Öllers *et al.*, 2001, Pereira *et al.*, 2016, Rabiet *et al.*, 2006, Scheurell *et al.*, 2009, Sosiak, 2002, Thomas and Hilton, 2004, Valdés *et al.*, 2014, Weigel *et al.*, 2002, Yoon *et al.*, 2010).

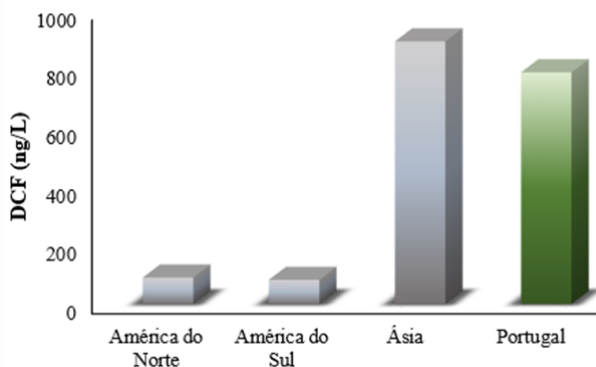


Figura 8. Valores médios de DCF em águas superficiais de Portugal e de várias regiões do Mundo.

3.3 Efeitos do diclofenac em animais aquáticos

Tal como se referiu anteriormente, devido à aparente similaridade do modo de ação do DCF em humanos e em vários animais aquáticos quando expostos aquele fármaco, vários testes têm vindo a ser realizados no sentido de se avaliar o potencial de toxicidade do composto. Assim, apesar dos

primeiros estudos realizados em bactérias, algas, microcrustáceos e peixes não mostrarem efeitos tóxicos preocupantes para o DCF (e.g., Ferrari *et al.*, 2003, Ferrari *et al.*, 2004), estudos posteriores levantaram essa possibilidade (e.g., Cleuvers, 2004, Hernando *et al.*, 2006). Vejamos alguns exemplos. Num estudo usando peixe zebra (*Danio rerio*) concluiu-se que em concentrações ambientais o DCF não acarretaria riscos para embriões daquele animal, dado que de entre um painel de parâmetros analisados apenas a muito elevadas concentrações (≥ 1 mg/L) se verificou um pequeno atraso na eclosão de embriões, sem mais diferenças em relação ao controlo (Hallare *et al.*, 2004). Já na truta castanha (*Salmo trutta*) observou-se que o DCF parece ter propensão para retenção no animal, e logo a bioacumular, pois não é excretado após a primeira passagem pelo fígado, sendo sujeito a recirculação entero-hepática (Hoeger *et al.*, 2008). Além disto, nesta espécie, concentrações (supra-ambientais) de 50 $\mu\text{g/L}$ de DCF provocaram danos considerados graves, nas brânquias, fígado e rim (Hoeger *et al.*, 2005). Na truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), além do fenómeno de bioacumulação, o DCF,

e agora em concentrações ambientais (1 µg/L), despoletou danos tecidulares, principalmente ao nível das brânquias (Mehinto *et al.*, 2010, Schwaiger *et al.*, 2004).

Em moluscos, estudos feitos com o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus* spp.) apontam para que o DCF não seja “inofensivo”. De facto, concentrações na ordem dos ng/L são capazes de induzirem peroxidação lipídica, facto que sugere a ocorrência de danos tecidulares (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014, Schmidt *et al.*, 2011).

Em paralelo, existe ainda a possibilidade de tanto o DCF como dos metabolitos derivados, em mistura entre si e/ou com outros produtos farmacêuticos provocarem efeitos ainda mais nefastos do que os reportados anteriormente para o DCF isolado. O facto daqueles derivados serem encontrados tanto em outros mamíferos como em peixes reforça a sugestão de haver um mecanismo de ação paralelo, comparável, nestes animais e em humanos (Kallio *et al.*, 2010, Naisbitt *et al.*, 2007). Além disto, observou-se que os metabolitos podem ser tanto ou mais ativos que o DCF e os seus efeitos tóxicos em mistura são até ao momento desconhecidos (Lonappan *et al.*, 2016).

3. ESTADO DAS ÁGUAS NO ESPAÇO DA UNIÃO EUROPEIA E EM PORTUGAL

Desde o início da implementação da DQA que a Comissão Europeia (CE) previa que não iria ser uma tarefa fácil conseguir que todos os estados membros atingissem os objetivos de qualidade propostos num período de tempo tão limitado — apenas quinze anos (2000/60/CE). Por isso, embora existam metas estritas a atingir, e comuns para todos os estados membros (EMs), existe alguma flexibilidade temporal no atingir de objetivos, já que se considera que cada país tem características ambientais (e sociais) próprias. Em 2007, um comunicado da CE revelou que dezanove EMs mostravam ainda deficiências na execução da DQA, pelo que chamou a atenção para o risco dos objetivos estabelecidos para 2015 não serem atingidos. Assim, no sentido de promover que todos os EMs cumprissem o maior número possível de requisitos inscritos na DQA, a CE designou a Agência Europeia do Ambiente (AEA) como aferidor periódico da situação em cada EM. Neste âmbito, durante a última avaliação pela AEA, Portugal foi identificado como não tendo ainda implementado um plano para a gestão de todas as bacias hidrográficas nacionais (Acórdão de 21 de junho de 2012, no processo C-223/11, Comissão/Portugal). Como esta caracterização foi considerada fundamental para a aplicação de vários artigos

inscritos na DQA, incluindo o Artigo 8º que visa a implementação de normas para monitorização das águas em cada EM, a falha teve como consequência a condenação de Portugal pelo Tribunal de Justiça da Comunidade Europeia. Os únicos países em que este incumprimento ocorreu foram, além de Portugal, a Espanha, a Grécia e o Luxemburgo. Em 2013 a AEA publicou uma lista de outros incumprimentos registados em vários EMs (Blueprint, 2013):

- Existência de lacunas severas quanto aos níveis de poluentes químicos de origem antropogénica nas águas superficiais;
- Sobre-exploração dos recursos hídricos subterrâneos em 60% das cidades;
- Poluição em 25% das águas subterrâneas;
- Mau estado ecológico de 47% das águas superficiais;
- Risco de extinção de 50% das zonas húmidas.

Relativamente ao primeiro Ponto acima descrito, demonstrou-se ao longo desta revisão a necessidade que Portugal tem de implementar programas de monitorização química das suas águas (as superficiais, mas certamente também as subterrâneas) de modo a garantir não só o cumprimento das metas definidas na DQA, visando um bom estado ecológico e a garantia de acesso de água com qualidade a todos os cidadãos. Mesmo se tivermos em conta somente os resultados dos nossos estudos sobre EDCs, introduzidos neste artigo, podemos concluir que, à data, todas as águas nacionais se encontravam contaminadas com uma série de compostos em concentrações, amiúde, compatíveis com a indução de disfunções fisiológicas, tanto em animais aquáticos como quicá no Homem. Ficou pois evidenciada a pertinência de uma monitorização química regular e da implementação de estratégias de redução dos níveis ambientais verificados.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Como se demonstrou pelos conteúdos desta revisão, no que respeita a compostos micropoluentes há ainda muito a fazer em Portugal. Deste modo seria muito útil conceber um plano nacional de monitorização, coordenado no tempo e no espaço (definindo-se a localização das zonas em avaliação), recorrendo a metodologias químicas, mas também biológicas (e.g., via uso de biomarcadores). Tal tipo de plano, para o qual poderiam contribuir sistematicamente, e em rede, agentes públicos e privados, tornaria possível avaliar se as medidas de prevenção e

de despoluição que vão sendo promovidas no terreno surtem, de facto, os efeitos desejados, à luz da execução das diretivas comunitárias. O não cumprimento destas “arrastará” Portugal, de novo, para penalizações pelo Tribunal de Justiça ou por outras entidades da UE, com os indesejáveis custos que tais situações acarretam, desde logo económicos, mas também políticos e sociais, com impactos negativos na imagem e credibilidade de Portugal.

REFERÊNCIAS

- Ahrer, W.; Scherwenk, E.; Buchberger, W. - Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 910. n.º 1 (2001). p. 69-78.
- Albini, A.; Rosano, C. Angelini, G.; Amaro, A.; Esposito, A. I.; Maramotti, S.; Noonan, D. M.; Pfeffer, U. - Exogenous hormonal regulation in breast cancer cells by phytoestrogens and endocrine disruptors. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 21 (2014) p. 1129-1145.
- Ansar A. S. - The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*. Vol. 150. n.º 1 (2000). p. 191-206.
- Arditsoglou, A.; Voutsas, D. - Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 64. n.º 11 (2012). p. 2443-2452.
- Aydin, Egemen; Talinli, Ilhan - Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere*. Vol. 90. n.º 6 (2013). p. 2004-2012.
- Barnett, T. P.; Adam, J. C.; Lettenmaier, D. P. - Potential impacts of a warming climate on water availability in snow-dominated regions. *Nature*. Vol. 438. (2005). p. 303-309.
- Beck, I. C.; Bruhn, R.; Gandrass, J.; Ruck, W. - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1090. n.º 1-2 (2005). p. 98-106.
- Belfroid, A. C.; Van der Horst, A.; Vethaak, A. D.; Schäfer, A. J.; Rijs, G. B. J.; Wegener, J.; Cofino, W. P. - Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*. Vol. 225. n.º 1 (1999). p. 101-108.
- Briggs, D. - Environmental pollution and the global burden of disease. *British Medical Bulletin*. Vol. 68. n.º 1 (2003). p. 1-24.
- Buser, H.-R.; Poiger, T.; Müller, M. D. - Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology*. Vol. 32. n.º 22 (1998). p. 3449-3456
- Cargouët, M.; Perdiz, D.; Mouatassim-Souali, A.; Tamisier-Karolak, S.; Levi, Y. - Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*. Vol. 324. n.º 1 (2004). p. 55-66.
- Carmona, E.; Andreu, V.; Picó, Y. - Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of the Total Environment*. Vol. 484. (2014). p. 53-63.
- Carrola, S. C.; Fontainhas-Fernandes, A.; Martinho, F.; Rocha, M. J.; Ferreira-Cardoso, J.; Gouveia, A.; Rocha, E. - Assessment of intersex severity in grey mullets from three Portuguese estuaries - Preliminary data. *Comparative Biochemistry and Physiology A -Molecular & Integrative Physiology*. Vol. 163. n.º 1 (2012). p. S37-S37.
- Cavalieri, E.; Stack, D.; Devanesan, P. - Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 94 (1997). p. 10937-10942.
- CENSUS - Instituto Nacional de Estatística.(<https://censos.ine.pt/>). 2011.
- Chalubinski, M.; Kowalski, M. L. - Endocrine disrupters – potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy*. Vol. 61. n.º 11 (2006). p. 1326-1335.
- Chen, C.-Y.; Wen, T.-Y.; Wang, G.-S.; Cheng, H.-W.; Lin, Y.-H.; Lien, G.-W. - Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*. Vol. 378. n.º 3 (2007). p. 352-365.

- Cleuvers, M. - Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 59. n.º 3 (2004). p. 309-315.
- Cuklev, F.; Kristiansson, E.; Fick, J.; Asker, N.; Förlin, L.; Larsson, D. G. J. - Diclofenac in fish: Blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 30. n.º 9 (2011). p. 2126-2134. Consult. em 2019/02/26.
- Dunbar, B.; Patel, M.; Fahey, J.; Wira, C. - Endocrine control of mucosal immunity in the female reproductive tract: Impact of environmental disruptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 354. n.º 1 (2012). p. 85-93.
- Erin, M. R. C.; Todd, M.; Dowd Jennifer, B. J.; Allison, E. A. - The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003–2006. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 119. n.º 3 (2011). p. 390-396.
- Ferrari, B.; Mons, R.; Vollat, B.; Fraysse, B.; Paxéaus, N.; Giudice, R. L.; Pollio, A.; Garric, J. - Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23. n.º 5 (2004). p. 1344-1354.
- Ferrari, B.; Paxéus, N.; Giudice, R. L.; Pollio, A.; Garric, J. - Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 55. n.º 3 (2003). p. 359-370.
- Ferreira, M.; Antunes, P.; Gil, O.; Vale, C.; Reis-Henriques, M. A. - Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. Vol. 69. n.º 4 (2004). p. 347-357.
- Fucic, A.; Gamulin, M.; Ferencic, Z.; Katic, J.; Krayner von Krauss, M.; Bartonova, A.; Merlo, D. F. - Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environmental Health*. Vol. 11 Suppl 1. (2012). p. S8.
- Furuichi, T.; Kannan, K.; Giesy, J. P.; Masunaga, S. - Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay. *Water Research*. Vol. 38. n.º 20 (2004). p. 4491-4501.
- Ganmaa, D.; Sato, A. - The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. *Medical Hypotheses*. Vol. 65. n.º 6 (2005). p. 1028-1037.
- Gonzalez-Rey, M.; Bebianno, M. J. - Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. Vol. 148. (2014). p. 221-230.
- Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. - Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1295. (2013). p. 57-66.
- Gutendorf, B.; Westendorf, J. - Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*. Vol. 166. n.º 1 (2001). p. 79-89.
- Hallare, A. V.; Köhler, H. R.; Triebkorn, R. - Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*. Vol. 56. n.º 7 (2004). p. 659-666.
- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhøft, H. C.; Jørgensen, S. E. - Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. Vol. 36. n.º 2 (1998). p. 357-393.
- Heberer, Th.; Schmidt-Bäumler, K.; Stan, H.-J. - Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. Vol. 26. n.º 5 (1998). p. 272-278.
- Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R.; Barceló, D. - Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. Vol. 69. n.º 2 (2006). p. 334-342.
- Hilton, M. J.; Thomas, K. V. - Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent

- and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1015. n.º 1 (2003). p. 129-141.
- Hoeger, B.; Dietrich, D. R.; Schmid, D.; Hartmann, A.; Hitzfeld, B. - Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 71. n.º 2 (2008). p. 412-418.
- Hoeger, Birgit; Köllner, Bernd; Dietrich, Daniel R.; Hitzfeld, Bettina - Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*. Vol. 75. n.º 1 (2005). p. 53-64.
- Hotchkiss, A. K.; Rider, Cynthia V.; Blystone, C. R.; Wilson, V. S.; Hartig, Phillip C.; Ankley, G. T.; Foster, Paul M.; Gray, Clark L.; Gray, L. Earl - Fifteen years after "Wingspread" - environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. Vol. 105. n.º 2 (2008). p. 235-259.
- Ishikawa, T.; Griffin, K. J. P.; Banerjee, U.; Herschman, H. R. - The zebrafish genome. *Biophysical Research Communications*. Vol. 352. n.º 1 (2007). p. 181-187.
- Isobe, T.; Shiraiishi, H.; Yasuda, M.; Shinoda, A.; Suzuki, H.; Morita, M. - Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 984. n.º 2 (2003). p. 195-202.
- Jarving, R.; Jarving, I.; Kurg, R.; Brash, A. R.; Samel, N. - On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279. n.º 14 (2004). p. 13624-33.
- Kallio, J.-M.; Lahti, M.; Oikari, A.; Kronberg, L. - Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. *Environmental Science & Technology*. Vol. 44. n.º 19 (2010). p. 7213-7219.
- Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. - The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*. Vol. 42. n.º 13 (2008). p. 3498-3518.
- Kennedy, C. J.; Osachoff, H. L.; Shelley, L. K. - Estrogenic endocrine disrupting chemicals in fish. Academic Press, 2013.
- Khetan, S. K.; Collins, T. J. - Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chemical Reviews*. Vol. 107. n.º 6 (2007). p. 2319-2364.
- Kim, S. D.; Cho, Jaeweon; Kim, I. S.; Vanderford, B. J.; Snyder, S. A. - Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*. Vol. 41. n.º 5 (2007). p. 1013-1021.
- Kosjek, T.; Heath, E.; Krbavčič, A. - Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International*. Vol. 31. n.º 5 (2005). p. 679-685.
- Kuch, H. M.; Ballschmiter, K. - Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC–(NCI)–MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*. Vol. 35. n.º 15 (2001). p. 3201-3206.
- LA - Lei da Água nº 58/2005, transpondo para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas. *Diário da República Portuguesa*. Vol. 249. (2005).
- Laganà, A.; Bacaloni, A.; De Leva, I.; Faberi, A.; Fago, G.; Marino, A. - Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 501. n.º 1 (2004). p. 79-88.
- Lei, B.; Huang, S.; Zhou, Y.; Wang, D.; Wang, Z. - Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere*. Vol. 76. n.º 1 (2009). p. 36-42.
- Letzel, M.; Metzner, G.; Letzel, T. - Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment International*. Vol. 35. n.º 2 (2009). p. 363-368.
- Liehr, J. - Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Human Reproduction Update*. Vol. 7. (2001). p. 273-281.
- Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. - Occurrence

- of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*. Vol. 39. n.º 11 (2005).
- Lolić, A.; Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Ramos, S.; Correia, M.; Delerue-Matos, C. - Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Science of The Total Environment*. Vol. 508. (2015). p. 240-250.
- Lonappan, L.; Brar, S. K.; Das, R. K.; Verma, M.; Surampalli, R.Y. - Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International*. Vol. 96. (2016). p. 127-138.
- Loos, R.; Locoro, G.; Contini, S. - Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Research*. Vol. 44. n.º 7 (2010). p. 2325-2335.
- López-Serna, R.; Petrović, M.; Barceló, D. - Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the Total Environment*. Vol. 440. (2012).
- Ma, R.; Wang, B.; Lu, S.; Zhang, Y.; Yin, L.; Huang, J.; Deng, S.; Wang, Y.; Yu, G. - Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk. *Science of the Total Environment*. Vol. 557-558. (2016). p. 268-275.
- Matthiessen, P. - An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. *Integrated Environmental Assessment and Management*. Vol. 4. n.º 3 (2008). p. 274-284.
- McGettigan, P.; Henry, D. - Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLOS Medicine*. Vol. 10. n.º 2 (2013).
- McLachlan, J. A.; Simpson, E.; Martin, M. - Endocrine disruptors and female reproductive health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 20. n.º 1 (2006). p. 63-75.
- Mehinto, A. C.; Hill, E. M.; Tyler, C. R. - Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology*. Vol. 44. n.º 6 (2010). p. 2176-2182.
- Metcalf, C. D.; Metcalf, T. L.; Kiparissis, Y.; Koenig, B. G.; Khan, C.; Hughes, R. J.; Croley, T. R.; March, R. E.; Potter, T. - Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 20. n.º 2 (2001). p. 297-308.
- Milnes, M. R.; Bermudez, D. S.; Bryan, T. A.; Edwards, T. M.; Gunderson, M. P.; Larkin, I. L. V.; Moore, B. C.; Guillette, L. J. - Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research*. Vol. 100. n.º 1 (2006). p. 3-17.
- Naisbitt, D. J.; Sanderson, L. S.; Meng, X.; Stachulski, A. V.; Clarke, S. E.; Park, B. K. - Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites. *Toxicology Letters*. Vol. 168. n.º 1 (2007). p. 45-50.
- NIEHS - Endocrine disruptors. National Institute of Environmental Health Sciences. U. S. Department of health and Human Sciences. (www.niehs.nih.gov/). 2010.
- Noppe, H.; Verslycke, T.; De Wulf, E.; Verheyden, K.; Monteyne, E.; Van Caeter, P.; Janssen, C. R.; De brabander, H. F. - Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 66. n.º 1 (2007). p. 1-8.
- Öllers, S.; Singer, Heinz P.; Fässler, P.; Müller, S. R. - Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A*. Vol. 911. n.º 2 (2001). p. 225-234.
- Paíga, P.; Santos, L. H. M. L. M.; Ramos, S.; Jorge, S.; Silva, J. G.; Delerue-Matos, C. - Presence of pharmaceuticals in the Lis River (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of The Total Environment*. Vol. 573. (2016). p. 164-177.
- Peng, X.; Yu, Y.; Tang, C.; Tan, J.; Huang, Q.; Wang, Z. - Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*. Vol. 397. n.º 1 (2008). p. 158-166.
- Pereira, A. M. P. T.; Silva, L. J. G.; Meisel, L. M.; Lino, C. M.; Pena, A. - Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and

- seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environmental Research*. Vol. 136. (2015). p. 108-119.
- Pereira, C. D. S.; Maranhão, L. A.; Cortez, F. S.; Pusceddu, F. H.; Santos, A.R.; Ribeiro, Daniel A.; Cesar, A.; Guimarães, L. L. - Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*. Vol. 548-549. (2016). p. 148-154.
- Peters, R. E.M.; Courtenay, S. C.; Hewitt, M. L.; MacLatchy, D. L. - Effects of 17 α -ethynylestradiol on early-life development, sex differentiation and vitellogenin induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Marine Environmental Research*. Vol. 69. n.º 3 (2010). p. 178.
- Pojana, G.; Gomiero, A.; Jonkers, N.; Marcomini, A. - Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*. Vol. 33. n.º 7 (2007). p. 929-936.
- Pritchard-Jones, K.; Kaatsch, P.; Steliarova-Foucher, E.; Stiller, C. A.; Coebergh, J. W. W. - Cancer in children and adolescents in Europe: Developments over 20 years and future challenges. *European Journal of Cancer*. Vol. 42. n.º 13 (2006). p. 2183-2190
- Rabiet, M.; T., Anne; Brissaud, F.; Seidel, J.-L.; Budzinski, H.; Elbaz-Poulichet, F. - Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment. *Environmental Science & Technology*. Vol. 40. n.º 17 (2006). p. 5282-5288.
- Ribeiro, C.; Pardal, M. A.; Martinho, F.; Margalho, R.; Tiritan, M. E.; Rocha, E.; Rocha, M. J. - Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 149. n.º 1-4 (2009a). p. 183-193.
- Ribeiro, C.; Tiritan, M. E.; Rocha, E.; Rocha, M. J. - Development and validation of a HPLC-DAD method for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 30. n.º 18 (2007). p. 2729-2746.
- Ribeiro, C.; Tiritan, M. E.; Rocha, E.; Rocha, M. J. - Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 56. n.º 1 (2008). p. 1-11.
- Ribeiro, C.; Tiritan, M. E.; Rocha, E.; Rocha, M. J. - Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 56. n.º 1 (2009b). p. 1-11.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Ferreira, C.; Rocha, E. - Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 94. n.º 2 (2012a). p. 252-261.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Peixoto, C.; Rocha, E. - Annual fluctuations of endocrine-disrupting compounds at the lower end of the Lima River, Portugal, and in adjacent coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 67. n.º 3 (2014a). p. 389-401.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Pardal, M. A.; Rocha, E. - Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 186. n.º 6 (2014b). p. 3337-3350.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Pardal, M. A.; Rocha, E. - Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 187. n.º 8 (2015). p. 1-16.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Pardal, M. A.; Rocha, E. - Pollution by endocrine disruptors in a southwest European temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 188. n.º 2 (2016a).
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Pardal, M. A.; Rocha, E. - Pollution by oestrogenic endocrine disruptors and β -sitosterol in a south-western European river (Mira, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 188. n.º 4 (2016b). p. 1-15.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Rocha, E.; Pardal, M. - Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 185. n.º 10 (2013a). p. 8215-8226.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Reis, M.; Rocha, E.; Pardal, M. A. - Determination of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal

- distribution in the Sado River Estuary (Portugal). *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 95. n.º 2 (2013b). p. 237-253.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Rocha, E. - Development and validation of a GC-MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters - their spatial and seasonal levels in Porto costal region (Portugal). *Journal of Water and Health*. Vol. 11. n.º 2 (2013c). p. 281-296.
- Rocha, M. J.; Cruzeiro, C.; Rocha, E. - Quantification of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Iberian Ave River and its coastline. *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 95. n.º 3 (2013d). p. 386-399.
- Rocha, M. J.; Ribeiro, M.; Ribeiro, C.; Couto, C.a; Cruzeiro, C.; Rocha, E. - Endocrine disruptors in the Leca River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 94. n.º 2 (2012b). p. 262-274.
- Rodriguez-Mozaz, S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. - Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1045. n.º 1 (2004). p. 85-92.
- Rogers, J. A.; Metz, L.; Yong, V. W. - Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*. Vol. 53. n.º 4 (2013). p. 421-430.
- Scheurell, M.; Franke, S.; Shah, R. M.; Hühnerfuss, H. - Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere*. Vol. 77. n.º 6 (2009). p. 870-876.
- Schmidt, W.; O'Rourke, K.; Hernan, R.; Quinn, B. - Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 62. n.º 7 (2011). p. 1389-1395.
- Schug, T. T.; Janesick, A.; Blumberg, B.; Heindel, J. J. - Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 127. n.º 3 (2011). p. 204-215.
- Schwaiger, J.; Ferling, H.; Mallow, U.; Wintermayr, H.; Negele, R. D. - Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. Vol. 68. n.º 2 (2004). p. 141-150.
- Scott, A. P.; Sanders, M.; Stentiford, G. D.; Reese, R. A.; Katsiadaki, I. - Evidence for estrogenic endocrine disruption in an offshore flatfish, the dab (*Limanda limanda* L.). *Marine Environmental Research*. Vol. 64. n.º 2 (2007). p. 128-148.
- Shi, J.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhang, H. - Spatial and seasonal distributions of estrogens and bisphenol A in the Yangtze River Estuary and the adjacent East China Sea. *Chemosphere*. Vol. 111. (2014). p. 336-343.
- Singh, S. P.; Azua, A.; Chaudhary, A.; Khan, S.; Willett, S. K. L.; Gardinali, P.R. - Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicology* Vol. 19. (2010). p. 338-350.
- Smyth, E. M.; Grosser, T.; Wang, M.; Yu, Y.; FitzGerald, G. A. - Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research*. Vol. 50 Suppl. n.º Suppl (2009). p. S423-S428.
- Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F. - Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. Vol. 96. n.º 1 (2010). p. 92-98.
- Sosiak, A. - Long-term response of periphyton and macrophytes to reduced municipal nutrient loading to the Bow River (Alberta, Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 59. n.º 6 (2002). p. 987-1001.
- Sousa, J. C. G.; Ribeiro, A. R.; Barbosa, M. O.; Ribeiro, C.; Tiritan, M. E.; Pereira, M. F. R.; Silva, A. M. T. - Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of the Total Environment*. Vol. 649. (2019). p. 1083-1095.
- Sumpter, J. P. - Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. Vol. 33. n.º 1 (2005). p. 9-16.
- Taylor, J. A.; Richter, C. A.; Ruhlen, R. L.; vom Saal, F. S. - Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *The Journal of steroid*

biochemistry and molecular biology. Vol. 127. n.º 1-2 (2011). p. 83-95.

Tena-Sempere, M.; Aguilar, E. - Biological effects and markers of exposure to xenostroids and selective estrogen receptor modulators (SERMs) at the hypothalamic-pituitary unit. . Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.

Thomas, K. V.; Hilton, M. J. - The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 49. n.º 5 (2004). p. 436-444.

UE-Decisão - Decisão da Comissão (2455/2001/CE) do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Diretiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* Vol. L 331. (2001). p. 1-5.

UE-Decisão - Decisão de execução (EU) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Vol. L 78. n.º 40-42 (2015).

UE-Diretiva - Diretiva 2000/60/EC do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Vol. L 327:1-72. n.º 1 (2000). p. 1-72.

UE-Diretiva - Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* Vol. L 348. (2008). p. 84-97.

UE-Diretiva - Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Agosto de 2013 que altera as diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. n.º L 226 (2013). p. 1-17.

UE-Retificação - Retificação ao regulamento (CE) 850/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de

29 de abril de 2004, relativo a poluentes orgânicos persistentes e que altera a Diretiva 79/117/CEE. *Documento 02004R0850 -20160930*. (2004). p. 1-22.

Valdés, M. E.; Amé, M. V.; Bistoni, M. A.; Wunderlin, D. A. - Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of the Total Environment*. Vol. 472. (2014). p. 389-396.

Vieno, N.; Sillanpää, M. - Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review. *Environment International*. Vol. 69 (2014). p. 28-39.

Versonnen, B. J.; Janssen, C. R. - Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*. Vol. 19. n.º 3 (2004). p. 198-206.

Vethaak, A. D.; Lahr, J.; Schrap, S. M.; Belfroid, A. C.; Rijs, G. B. J.; Gerritsen, A.; de Boer, J.; Bulder, A. S.; Grinwis, G. C. M.; Kuiper, R. V.; Legler, J.; Murk, T. A. J.; Peijnenburg, W.; Verhaar, H. J. M.; de Voogt, P. - An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*. Vol. 59. n.º 4 (2005). p. 511-524.

Wang, C.; Hou, Linlin; L., Jing; X., Z.; Gao, T.; Yang, J.; Zhang, H.; Li, X.; Du, P. - Occurrence of diazepam and its metabolites in wastewater and surface waters in Beijing. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 24. n.º 18 (2017). p. 15379-15389.

Wang, J.; Zhu, Y. - Occurrence and risk assessment of estrogenic compounds in the East Lake, China. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 52. (2017). p. 69-76.

Wang, L.; Ying, G.-G.; Zhao, J.-L.; Liu, S.; Yang, B.; Zhou, L.-J.; Tao, R.; Su, H.-C. - Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environmental Pollution*. Vol. 159. n.º 1 (2011). p. 148-156.

Waring, R. H.; Harris, R. M. - Endocrine disrupters: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 244. n.º 1 (2005). p. 2-9.

Weigel, S.; Kuhlmann, J.; Hühnerfuss, H. - Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of the Total Environment*. Vol. 295. n.º 1 (2002).

- Xu, H.; Yang, J.; Wang, Y.; Jiang, Q.; Chen, H.; Song, H. - Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. Vol. 88. n.º 1 (2008). p. 1-8.
- Xu, W.; Yan, W.; Huang, W.; Miao, Li; Zhong, L. - Endocrine-disrupting chemicals in the Pearl River Delta and coastal environment: sources, transfer, and implications. *Environmental Geochemistry and Health*. Vol. 36. n.º 6 (2014). p. 1095-1104.
- Yoon, Y.; Ryu, J.; Oh, J.; Choi, B.-G.; Snyder, S. A. - Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Science of the Total Environment*. Vol. 408. n.º 3 (2010). p. 636-643.
- Zhang, Z.; Ren, N.; Kannan, K.; Nan, Jun; Liu, L.; Ma, W.; Qi, H.; Li, Y. - Occurrence of endocrine-disrupting phenols and estrogens in water and sediment of the Songhua River, Northeastern China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 66. n.º 3 (2014). p. 361-369.
- Zhou, H.; Smith, Daniel W. - Advanced technologies in water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*. Vol. 1. n.º 4 (2002). p. 247-264.
- Zou, J.; Neumann, N. F.; Holland, J. W.; Belosevic, M.; Cunningham, C.; Secombes, C. J.; Rowley, A. F. - Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *The Biochemical Journal*. Vol. 340 (Pt 1). n.º Pt 1 (1999). p. 153-159.
- Zuo, Y.; Zhang, K.; Deng, Y. - Occurrence and photochemical degradation of 17 α -ethynylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere*. Vol. 63. n.º 9 (2006). p. 1583-1590.