



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 12 • 2023 • art. 6

Impactos da contaminação por fármacos em ecossistemas de águas subterrâneas

Os ecossistemas subterrâneos são uma importante fonte de água potável, da qual depende a maioria da população humana. A água subterrânea é também um importante ecossistema, repleto de espécies únicas que vivem em completa escuridão, a chamada estigofauna. Estas cujas comunidades têm pouca redundância funcional, sendo muito vulneráveis a perturbações de origem antropogénica. Os aquíferos são poluídos por grande diversidade de contaminantes, entre os quais se encontram os fármacos, administrados em humanos e animais. Estes infiltram-se nas águas subterrâneas, transportando os fármacos originais e os seus metabolitos. A contaminação por fármacos causa efeitos perniciosos em organismos subterrâneos e nos serviços de ecossistemas que desempenham, relacionados com a manutenção da qualidade da água. Neste artigo, revemos o conhecimento atual sobre fármacos encontrados em águas subterrâneas e principais vias de contaminação, sobre a avaliação dos seus efeitos ecotoxicológicos em espécies estigóbias, e sobre os seus potenciais efeitos em ecossistemas subterrâneos. Por fim, identificamos as principais lacunas no conhecimento, e lançamos perspetivas futuras para uma melhor proteção destes ecossistemas vulneráveis.

Palavras-chave

Produtos farmacêuticos
aquíferos
ecotoxicologia
poluição
estigofauna
estigóbios

Cláudia Duarte¹

Ana Sofia P. S. Reboleira^{1*}

¹ Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c) & CHANGE – Instituto das Alterações Globais e Sustentabilidade, e Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal.

* asreboleira@fc.ul.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2023 Autores

INTRODUÇÃO

Fármacos são substâncias administradas em animais com o objetivo de preservar a saúde animal e humana ou promover o seu crescimento (Di Guardo & Finizio, 2017; Kim et al., 2018). O desenvolvimento da produção animal intensiva tem sido acompanhada pelo aumento do uso destas substâncias (Kim et al., 2018), levando a um aumento da sua excreção e, conseqüentemente, da sua biodisponibilidade no ambiente (Di Guardo & Finizio, 2017).

Os fármacos são desenhados para atingir sítios específicos no organismo animal, estes são frequentemente otimizados para possuírem uma alta estabilidade e mobilidade, acabando por não ser facilmente biodegradáveis (Balzer et al., 2016). Os compostos ativos e os seus metabolitos são excretados nas fezes e na urina, atingindo assim os solos, através de escorrências que ocorrem aquando do tratamento dos resíduos, pela aplicação de estrume na fertilização dos campos agrícolas (Balzer et al., 2016; Tolls, 2001; Watanabe et al., 2010), pelos efluentes das estações de tratamento de águas residuais, os efluentes de indústrias farmacêuticas, ou as descargas ilegais de resíduos (Fernandes et al., 2021). A biodisponibilidade dos fármacos depende de diversos fatores, como: a via de administração, a percentagem de metabolização do organismo, o nível de degradação no período de armazenamento das excreções do animal, e da utilização de estrume contaminado para a fertilização de solos agrícolas (Di Guardo & Finizio, 2017). Fármacos com elevada mobilidade possuem o potencial para atingir aquíferos ou outras massas de água, conseqüentemente afetando organismos aquáticos para a qual os fármacos não foram desenhados (Tolls, 2001). Adicionalmente, vários fármacos encontram-se frequentemente a ser libertados para o ambiente, pelo que vários tipos de fármacos coexistem em simultâneo nas massas de água, podendo resultarem efeitos sinérgicos ou antagonistas (Fernandes et al., 2021).

Os resíduos de fármacos contaminam águas de superfície e sedimentos através dos resíduos domésticos e hospitalares (uma vez que existem fármacos usados em medicina humana assim como em medicina veterinária), contaminando de seguida as águas subterrâneas através de processos de infiltração e lixiviação (Gaston et al., 2019; Gros et al., 2019). As águas subterrâneas são as mais importantes reservas de água doce planetárias, portanto a sua contaminação, uma problemática crítica que afeta a integridade da saúde humana e dos ecossistemas (Figura 1) (Castaño-Sánchez et al., 2020b, 2021a,b; Hose et al., 2023). A contaminação destas águas compromete também serviços de ecossistema que relacionados com a purificação da água e a manutenção do ciclo de nutrientes (Griebler & Avramov, 2015; Hose et al., 2022).

A Comissão Europeia (CE) criou regulamentos de forma a combater a problemática relacionada com a deterioração da qualidade das massas de água. A Diretiva Quadro da Água “*Water Framework Directive*” (WFD) (2000/60/EC) pressiona os estados-membros a gerir os recursos hídricos numa abordagem integrada, em que considera todos os ecossistemas aquáticos e todos os ecossistemas dependentes e interligados. O principal objetivo da WFD é atingir um bom status ecológico em todas as águas de superfície, assim como um bom estado na avaliação química e quantitativa em todas as águas subterrâneas (Directive 2000/60/EC, 2000).

As indicações atuais para a Avaliação do Risco Ambiental (ARA) recomendam estimar o efeito em organismos cavernícolas a partir dos testes ecotoxicológicos em organismos de superfície (EMA, 2018). Para estimar o valor em que se prevê ausência de efeito em estigóbios ($PNEC_{gw}$) é necessário dividir o valor

de conversão 10 ao valor em que se prevê ausência de efeito em organismos de superfície ($PNEC_{sw}$) (EMA, 2018), como demonstrado na equação 1:

$$PNEC_{gw} = \frac{PNEC_{sw}}{10} \text{ (Equação 1)}$$

Valores de concentrações quantificadas em águas subterrâneas (MEC_{gw}), também podem ser estimadas a partir de concentrações quantificadas em águas de superfície (MEC_{sw}), a partir da multiplicação do fator de conversão 0,25, como é possível observar na equação 2:

$$MEC_{gw} = MEC_{sw} \times 0,25 \text{ (Equação 2)}$$

$PNEC_{gw}$ e MEC_{gw} são valores fundamentais para o cálculo do quociente de risco em ecossistemas subterrâneos (RQ_{gw}), fórmula presente na equação 3:

$$RQ_{gw} = \frac{MEC_{gw}}{PNEC_{gw}} \text{ (Equação 3)}$$

Neste artigo, realizamos uma (i) revisão do conhecimento atual dos fármacos e dos seus potenciais efeitos nos ecossistemas subterrâneos, (ii) analisamos os valores máximos quantificados dos fármacos em águas subterrâneas, (iii) os efeitos ecotoxicológicos conhecidos em estigóbios e (iv) identificamos as principais lacunas no conhecimento, lançando perspectivas futuras sobre esta área de investigação.



FIGURA 1: Organismos estigóbios, crustáceos aselídeos adaptados à vida em águas subterrâneas do maciço calcário Estremenho, centro de Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os valores de toxicidade aguda foram obtidos através da consulta da base de dados disponibilizada pela Agência de Proteção Ambiental (APA), a ECOTOX (EPA (Environmental Protection Agency), 2022). A pesquisa de cada fármaco foi realizada pelo seu número de CAS, e a informação foi filtrada para a recolha da LC50 (concentração letal para 50% da população) e EC50 (concentração efetiva para 50% da população) de peixes, crustáceos e algas. Adicionalmente, o teste ecotoxicológico teve de ser realizado em meio de água doce, com um fim dentro de 96 horas. Para espécies com mais de um valor nas mesmas condições, a média geométrica foi calculada.

Os valores de concentrações detetadas nas massas de água foram obtidas através de pesquisa bibliográfica, na plataforma Web of Science. As palavras-chaves utilizadas para a pesquisa foram “veterinary medicinal pharmaceuticals”, “groundwater”, “toxicity”, “crustaceans”, “aquatic environment”, “stygobitic” e “environmental risk assessment”.

Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao R Studio, versão 4.0.3 (R Team, 2023). Com os valores de toxicidade aguda criou-se gráficos de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD), criados através de “ssdtools” (Thorley & Schwarz, 2018) e “ggplot2” (Wickham, 2016).

RESULTADOS

Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINE)

Os AINEs são a classe de fármacos frequentemente usada devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas, e analgésicas (Rastogi et al., 2021). Esta classe é considerada uma das mais preocupante, devido ao seu elevado consumo por parte da população em geral (Jurado et al., 2021). Compostos ativos desta classe são considerados persistentes, tendo sido detetados em várias massas de água nas quantidades de ng/L e µg/L (Jurado et al., 2021; Rastogi et al., 2021).

A degradação microbiológica é uma via possível de remoção de AINE, com estudos a demonstrarem a degradação e mineralização de diclofenaco, ibuprofeno e naxopreno através do uso dos fungos *Trametes versicolor* (Lloyd, 1920) e *Phanerochaete sordida* (Karst, 1889) YK-624 (Rastogi et al., 2021). Esta degradação é obtida por processos de descarboxilação, oxidação, hidrólise, eliminação do grupo HCL (Rastogi et al., 2021).

O paracetamol é uma das substâncias mais populares para o tratamento de febres e dores variadas (Wu et al., 2012). Devido a esta popularidade, o paracetamol tem sido detetado em várias massas de água, desde rios até águas subterrâneas, tendo sido detetado em quantidades tão elevadas como 1036 µg/L, levantando preocupações a nível da saúde pública e ambiental (Lin et al., 2015). Até ao momento, não existe conhecimento sobre o efeito de paracetamol nos ecossistemas subterrâneos. A informação disponível indica que o organismo mais sensível é *Daphnia magna* (Straus, 1820), após uma exposição de 48 horas, com o LC₅₀ estimado a ser 18.89 mg/L. No espectro oposto, o organismo mais tolerante é *Branchionus*

calycifloris (Pallas, 1766), que sofre de efeitos letais apenas a concentrações de 5305,32 mg/L, como é possível observar na Figura 2. Uma vez que não existe informação sobre o efeito do paracetamol a organismos estigóbios, todos os quocientes de risco calculados utilizam valores estimados partir dos resultados obtidos em testes ecotoxicológicos em espécies de superfície.

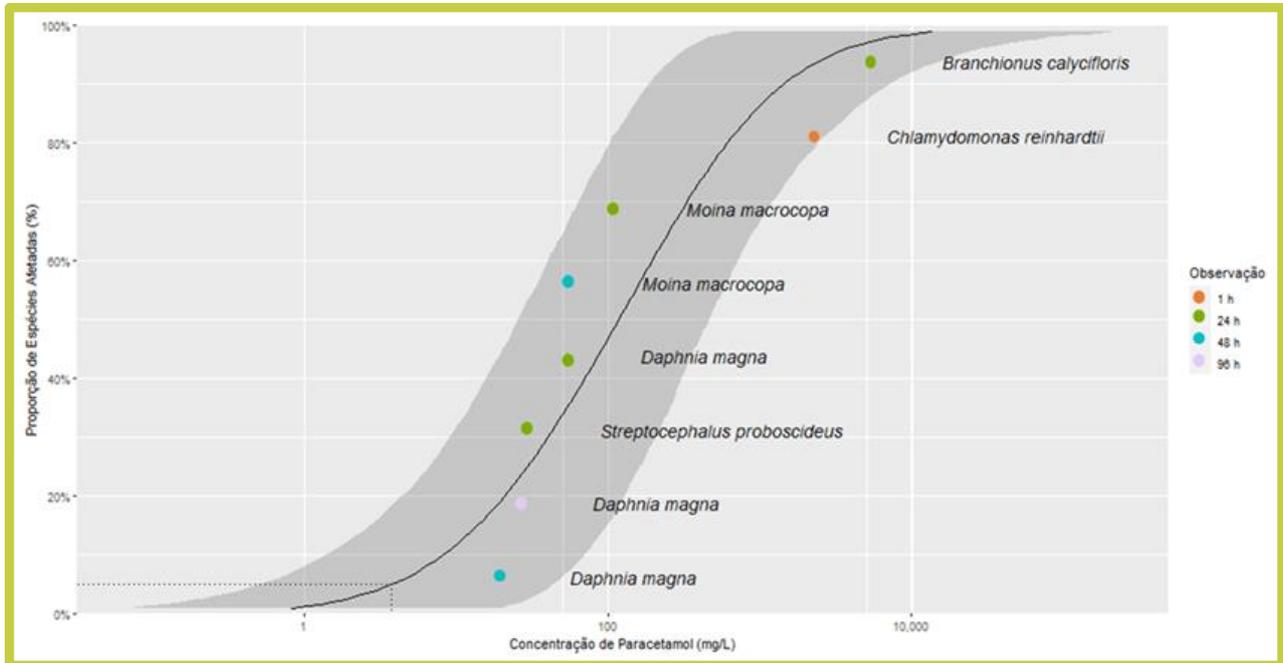


FIGURA 2: Valores de sensibilidade de espécies expostas a paracetamol. A vermelho está representado o valor obtido após 1 hora, a roxo o valor obtido após 24 horas, a azul o valor observado após 48 horas, e a rosa o valor obtido após 96 horas.

A informação disponível para o diclofenaco de sódio indica que o peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822) é a espécie mais sensível, com um LC₅₀ de 5,3 mg/L. A espécie mais tolerante é a alga *Chlamydomonas reinhardtii* (P.A. Dangeard, 1888), com um LC₅₀ de 1776 mg/L. Este fármaco foi testado numa espécie cavernícola, *Nitocrella achaiiae* (Pesce, 1981), tendo sido estimado o LC₅₀ de 12,01 mg/L, como é possível observar na Figura 3.

Antibióticos

Os antibióticos são utilizados para tratar e prevenir doenças infecciosas, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, e para promover o crescimento e rendimento animal, nas explorações agropecuárias (Balzer et al., 2016; Liu et al., 2018; Viana et al., 2021).

Estes compostos sofrem um baixo metabolismo e são fracamente absorvidos pelo trato intestinal, sendo excretados maioritariamente por urina e pelas fezes (Liu et al., 2018; Viana et al., 2021). Uma vez que os processos de tratamentos de águas residuais não removem completamente estes compostos, existe uma contínua libertação destes para o ambiente (Liu et al., 2018; Viana et al., 2021). Consequentemente, o aumento da biodisponibilidade de antibióticos no ambiente pode resultar no aumento da pressão da comunidade microbiana nas águas, levando ao surgimento de resistência aos antibióticos, o que por sua

vez pode afetar o uso terapêuticos destes compostos tanto em animais como em humanos (Liu et al., 2018; Viana et al., 2021).

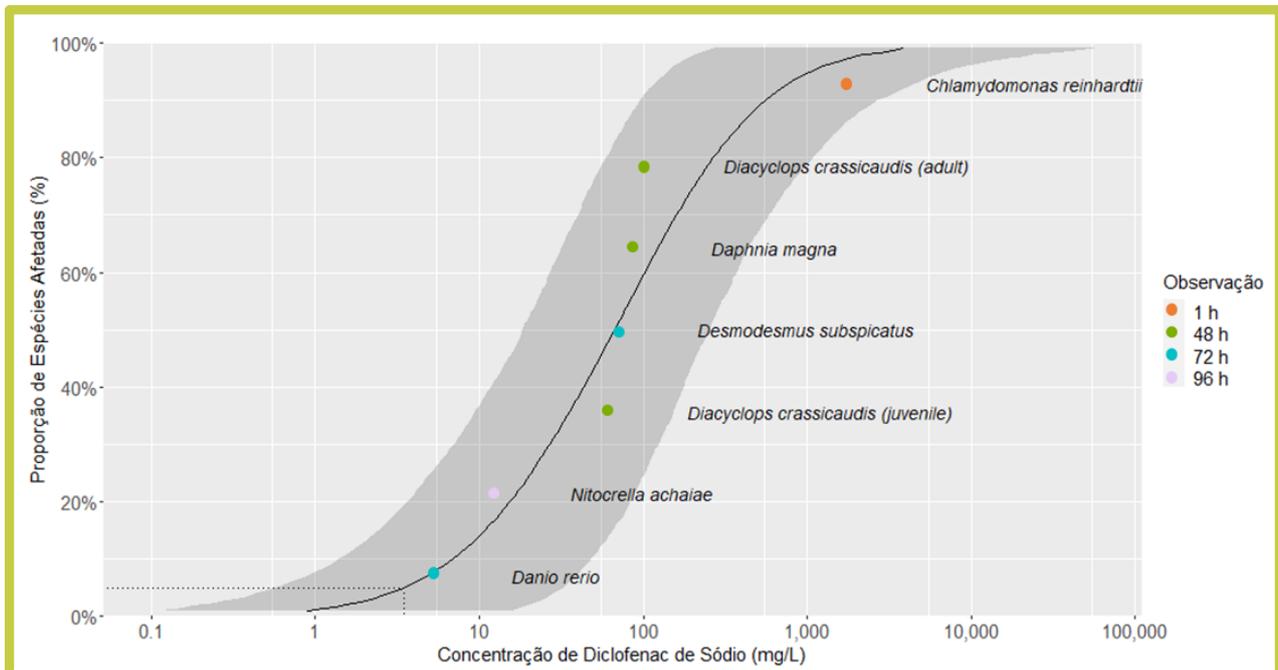


FIGURA 3: Valores de sensibilidade de espécies expostos a diclofenaco de sódio. A vermelho está representado o valor obtido após 1 hora, a roxo o valor obtido após 24 horas, a azul o valor observado após 48 horas, e a rosa o valor obtido após 96 horas.

A clortetraciclina é um antibiótico de largo espectro da classe tetraciclina, usada no tratamento de doenças provocadas por várias bactérias Gram positivas e negativas (Dzomba & Zaranyika, 2021). Nos testes ecotoxicológicos disponíveis, o organismo mais sensível é um peixe, o *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846), com um LC₅₀ estimado de 78,9 mg/L. A espécie mais resistente corresponde à *Moina macrocopa* (Strauss, 1820), com um LC₅₀ estimado de 515 mg/L, como é possível observar na Figura 4.

Outro antibiótico de grande preocupação é a eritromicina, um macrólido (Minski et al., 2021). A espécie mais sensível é *Anabaena* sp. (*Nostoc*), com um LC₅₀ de 0,022 mg/L, enquanto o menos sensível corresponde à *B. calycifloris*, com um LC₅₀ de 27,53 mg/L, como é possível observar na Figura 5.

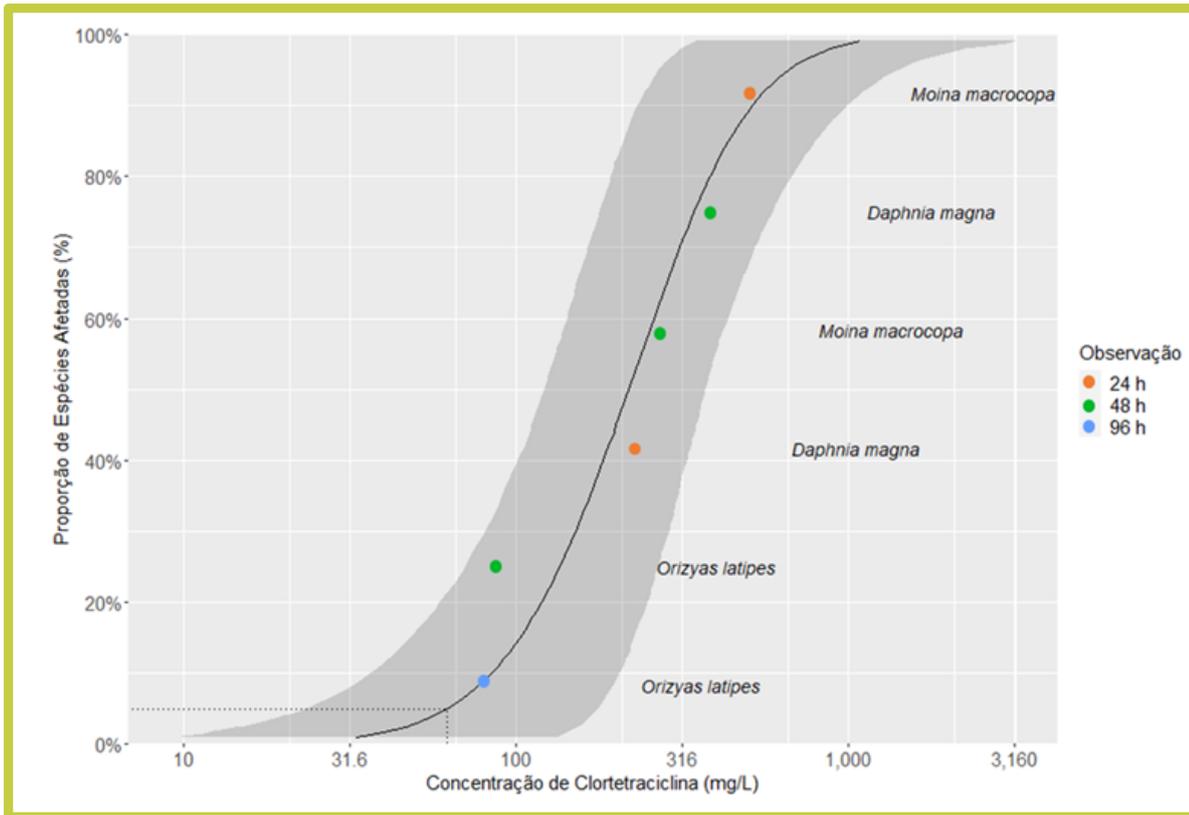


FIGURA 4: Valores de sensibilidade de espécies expostos a clortetraciclina. A vermelho está representado o valor obtido após 24 horas, a verde o valor observado após 48 horas, e a azul o valor obtido após 96 horas.

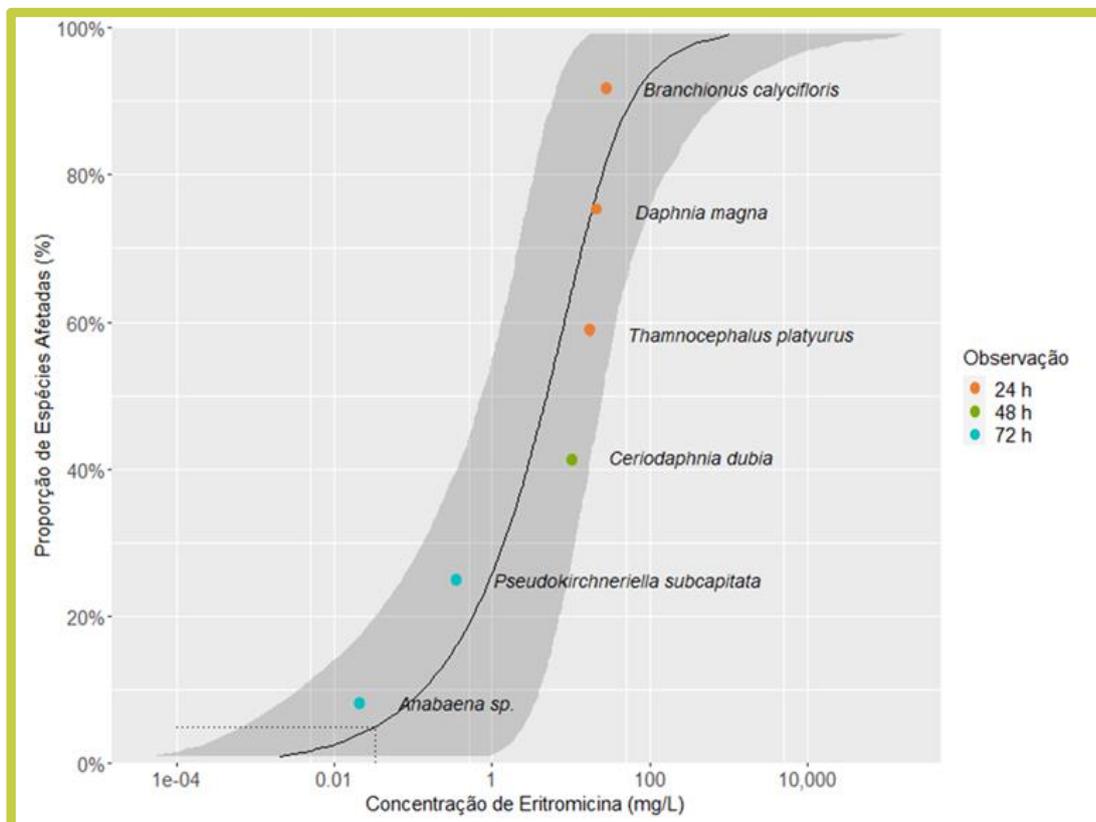


FIGURA 5: Valores de sensibilidade de espécies expostos a eritromicina. A vermelho está representado o valor obtido após 24 horas, a verde o valor observado após 48 horas, e a azul o valor obtido após 72 horas.

β -Bloqueadores

Os β -Bloqueadores são utilizados no tratamento de patologias cardiovasculares, como hipertensão, arritmias e angina de peito (Piram et al., 2008; Ramil et al., 2010; Yi et al., 2020). Estes compostos são principalmente excretados através da urina, com quantidades até 75% a serem expelidas na sua forma original, sem qualquer metabolização (Yi et al., 2020). Devido ao seu elevado consumo, elevada persistência, e à ineficiência do processo de tratamento de águas residuais na remoção destes compostos, a sua deteção em massas de água é frequente (Godoy et al., 2015).

Os peixes possuem recetores β -adrenérgicos similares aos de mamíferos, pelo que a sua exposição a esta classe de fármacos pode levar a disfunção cardiovascular. Quando expostos a propranolol (PRO), a fecundidade de *O. latipes* e o ritmo cardíaco de *D. magna* diminuíram (Ramil et al., 2010). Consequências como redução da taxa de reprodução, comportamentos anómalos e disrupção dos níveis de testosterona também foram observados noutros organismos aquáticos (Yi et al., 2020). A toxicidade de PRO foi testada em *Diacyclops belgicus* (Kiefer, 1936), com o LC₅₀ estimado a 96 horas foi de 5 mg/L, a 15°C.

Fármacos psiquiátricos

Os fármacos psiquiátricos, ou psicoativos, têm sido detetados nas massas de água, assim como os seus metabolitos (Tanoue et al., 2019). Estas deteções são esperadas, dado que existe uma vasta variedade disponíveis no mercado, para o tratamento de várias patologias como os distúrbios de ansiedade, insónias e depressão, e serem usados como anestésicos e analgésicos (Cunha et al., 2017; Tanoue et al., 2019).

Estes compostos são de degradação difícil, com os processos de tratamento de águas residuais a serem ineficientes na completa remoção destes compostos (Grabicová et al., 2020; Wang et al., 2020). Adicionalmente, um dos compostos resultantes da degradação de diazepam é oxazepam, também um fármaco comercializado (Cunha et al., 2017). Este facto enfatiza que os metabolitos não devem de ser ignorados, uma vez que não deixam de ser compostos ativos que podem provocar efeitos perniciosos.

Quando expostos a estes fármacos, observam-se mudanças no comportamento dos organismos (como por exemplo, nas relações presa-predador), na taxa de alimentação, no ritmo circadiano, na reprodução e nas estratégias de migração, o que pode levar a mudanças ecológicas relevantes (Grabicová et al., 2020; Tanoue et al., 2019). Devido à sua natureza hidrofóbica, é possível que a absorção imediata pelos organismos não ocorra (Tanoue et al., 2019). Até ao momento, não existe qualquer informação sobre os efeitos destes fármacos nos organismos estigóbios.

DISCUSSÃO

As áreas cársicas são caracterizadas pela fraca capacidade de filtração e por uma elevada capacidade de infiltração (Kogovšek & Petrič, 2013). Deste modo, os aquíferos de zonas cársicas encontram-se particularmente vulneráveis a contaminantes, com as águas subterrâneas em áreas profundas em maior risco do que inicialmente pensado (Reberski et al., 2022). Exceto em situações específicas (fenofibrato), os contaminantes quantificados encontram-se em quantidades mais elevadas nas águas superficiais do que

nas águas subterrâneas (Reberski et al., 2022). No entanto, mais estudos são necessários para clarificar o estado de contaminação das águas subterrâneas.

A realização de testes ecotoxicológicos em espécies subterrâneas possui vários obstáculos. Estes organismos habitam locais de difícil acesso, tendem a ser difíceis de encontrar e coletar, e possuem uma distribuição espacial normalmente restrita (Di Lorenzo et al., 2019a; Di Lorenzo et al., 2019b). Como resultado, os organismos são normalmente colhidos em números inferiores aos necessários para a realização de testes ecotoxicológicos. Adicionalmente, estas espécies são extremamente difíceis de manter e multiplicar em ambiente laboratorial, tornando a análise da mortalidade em organismos juvenis praticamente impossível (Di Lorenzo et al., 2019a; Di Lorenzo et al., 2019b). Estes obstáculos ajudam a explicar o ritmo fastidioso dos estudos que surgem na área da ecotoxicologia subterrânea. Os ritmos metabólico e de consumo de oxigénio diferem entre as espécies subterrâneas e de superfície. Devido a esta diferença existem questões sobre que se a metodologia aplicada, inicialmente otimizada para espécies de superfície, é adequada para a realização dos testes ecotoxicológicos nas espécies subterrâneas (Avramov et al., 2013). Organismos estigóbios demonstraram ter um ritmo de consumo de oxigénio duas vezes mais lento do que as espécies de superfície, assim como de 1.2 a 8.6 vezes menos níveis de atividade enzimática de enzimas regulatórias chave (Avramov et al., 2013). Assim, pode-se debater os organismos estigóbios possam sofrer um atraso na manifestação de efeitos ecotoxicológicos, e que um teste de longa exposição devesse ser considerado para a avaliação do efeito de um fármaco em ecossistemas subterrâneos (Avramov et al., 2013).

A proteção de espécies desconhecidas para a comunidade científica é um objetivo complexo. Os ecossistemas subterrâneos são de difícil acesso, sendo que a maioria dos habitats subterrâneos permanecem por explorar (Ficetola et al., 2019; Griebler et al., 2014). Isto afeta o nosso conhecimento sobre a biodiversidade, um fenómeno conhecido como o impedimento de Racovitza (Ficetola et al., 2019). Julga-se que estes habitats possuem uma grande, e subestimada, quantidade de espécies, cuja proteção é complexa mas necessária (Ficetola et al., 2019).



PERSPETIVAS FUTURAS

Organismos com características únicas exigem protocolos específicos (Di Lorenzo et al., 2019b; Castaño-Sánchez et al., 2020b, 2021a). Fatores de conversão conservadores são importantes para a proteção de um ecossistema ainda vastamente desconhecido, no entanto é necessário continuar a investigação nesta área (Di Lorenzo et al., 2019b).

Alguns dos obstáculos presentes na ecologia subterrânea incluem ausência de conhecimento do comportamento e ciclos de vida de organismos estigóbios, levando à dificuldade na realização de testes ecotoxicológicos agudos em juvenis, e na realização de testes ecotoxicológicos crónicos (Castaño-Sánchez et al., 2020a, 2021a).

Adicionalmente, a monitorização e avaliação da qualidade de água subterrânea são ferramentas úteis para a identificação de ameaças existentes e prevenção de contaminantes futuros (Castaño-Sánchez et al., 2020a). Ferramentas de aviso prévio, como os biomarcadores, podem informar sobre impactos a níveis sub-

letais em espécies estigóbias, sendo o seu uso muito relevante para perceber a magnitude da perturbação ambiental sobre fármacos em águas subterrâneas (Duarte et al., 2023).

Por último, a identificação dos efeitos que estes fármacos provocam em organismos estigóbios é apenas possível através da otimização de protocolos ecotoxicológicos adequados para as características destas espécies.

agradecimentos • Este trabalho foi apoiado pelo projeto "Sustentabilidade dos ecossistemas subterrâneos" financiado pelo Protocolo de Cooperação com o Município de Alcanena, e por Fundos Nacionais Portugueses através da "Fundação para a Ciência e a Tecnologia" (FCT) no âmbito da Unidade de financiamento cE3c UIDB/00329/2020.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avramov, M., Schmidt, S. I., & Griebler, C. (2013). A new bioassay for the ecotoxicological testing of VOCs on groundwater invertebrates and the effects of toluene on *Niphargus inopinatus*. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.023>
- Balzer, F., Zöhlke, S., & Hannappel, S. (2016). Antibiotics in groundwater under locations with high livestock density in Germany. *Water Science and Technology: Water Supply*, 16(5), 1361–1369. <https://doi.org/10.2166/ws.2016.050>
- Castaño-Sánchez, A., Hose, G. C., & Reboleira, A. S. P. S. (2020a). Ecotoxicological effects of anthropogenic stressors in subterranean organisms: A review. *Chemosphere*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125422>
- Castaño-Sánchez, A., Hose, G. C., & Reboleira, A. S. P. S. (2020b). Salinity and temperature increase impact groundwater crustaceans. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69050-7>
- Castaño-Sánchez, A., Malard, F., Kalčíkova, G., & Reboleira, A. S. P. S. (2021a). Novel Protocol for Acute In Situ Ecotoxicity Test Using Native Crustaceans Applied to Groundwater Ecosystems. *Water*, 13(8), 1132. <https://doi.org/10.3390/w13081132>
- Castaño-Sánchez, A., Pereira, J.L., Gonçalves, F., & Reboleira, A.S.P.S. (2021b). Sensitivity of a widespread groundwater copepod to different contaminants. *Chemosphere*, 274, 129911. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129911>
- Cunha, D. L., de Araujo, F. G., & Marques, M. (2017). Psychoactive drugs: Occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(31), 24076–24091. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- Di Guardo, A., & Finizio, A. (2017). Sustainable use of veterinary pharmaceuticals on the territory (Sust-PHarm): Linking available database of manure management and environmental fate models. *Science of the Total Environment*, 575, 1014–1026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.168>
- Di Lorenzo, T., Di Cicco, M., Di Censo, D., Galante, A., Boscaro, F., Messana, G., & Paola Galassi, D. M. (2019). Environmental risk assessment of propranolol in the groundwater bodies of Europe. *Environmental Pollution*, 255, 113189. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113189>
- Di Lorenzo, T., Di Marzio, W. D., Fiasca, B., Galassi, D. M. P., Korbel, K., Iepure, S., Pereira, J. L., Reboleira, A. S. P. S., Schmidt, S. I., & Hose, G. C. (2019). Recommendations for ecotoxicity testing with stygobiotic species in the framework of groundwater environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 681, 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.030>
- Duarte, C., Gravato, C., Di Lorenzo, T. & Reboleira, A.S.P.S. (2023). Acetaminophen induced antioxidant and detoxification responses in a stygobitic crustacean. *Environmental Pollution*, 330, 121749. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121749>
- Dzomba, P., & Zaranyika, M. F. (2021). Persistence and fate of chlortetracycline in the aquatic environment under sub-tropical conditions: Generation and dissipation of metabolites. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*

- Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 56(2), 181–187. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1854009>
- EPA (Environmental Protection Agency). (2022). *ECOTOX*. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/search.cfm>
- European Medicines Agency. (2006). EMA Guidance for RA. *Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, June*, 1–12.
- Ficetola, G. F., Canedoli, C., & Stoch, F. (2019). The Racovitzan impediment and the hidden biodiversity of unexplored environments. *Conservation Biology*, 33(1), 214–216. <https://doi.org/10.1111/cobi.13179>
- Gaston, L., Lapworth, D. J., Stuart, M., & Arnscheidt, J. (2019). Prioritization Approaches for Substances of Emerging Concern in Groundwater: A Critical Review. *Environmental Science and Technology*, 53(11), 6107–6122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04490>
- Godoy, A. A., Kummrow, F., & Pamplin, P. A. Z. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment—A review. *Chemosphere*, 138, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>
- Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Kolářová, J., Turek, J., Brooks, B. W., & Randák, T. (2020). Psychoactive pharmaceuticals in aquatic systems: A comparative assessment of environmental monitoring approaches for water and fish. *Environmental Pollution*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114150>
- Griebler, C., & Avramov, M. (2015). Groundwater ecosystem services: A review. *Freshwater Science*, 34(1), 355–367. <https://doi.org/10.1086/679903>
- Griebler, C., Malard, F., & Lefébure, T. (2014). Current developments in groundwater ecology—from biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.018>
- Gros, M., Mas-Pla, J., Boy-Roura, M., Geli, I., Domingo, F., & Petrović, M. (2019). Veterinary pharmaceuticals and antibiotics in manure and slurry and their fate in amended agricultural soils: Findings from an experimental field site (Baix Empordà, NE Catalonia). *Science of the Total Environment*, 654, 1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.061>
- Hose, G. C., Chariton, A., Daam, M. A., Di Lorenzo, T., Galassi, D. M. P., Halse, S. A., Reboleira, A. S. P. S., Robertson, A. L., Schmidt, S. I., & Korbel, K. L. (2022). Invertebrate traits, diversity and the vulnerability of groundwater ecosystems. *Functional Ecology*, 36(9), 2200–2214. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14125>
- Hose, G. C., Di Lorenzo T., Fillinger L., Galassi D. M. P., Griebler C., Hahn H. J., Handley K., Korbel, K., Korbel, K., Reboleira, A. S. P. S., Siemensmeyer, T., Spengler, C., Weaver, L., Weigand, A. (2023). Assessing groundwater ecosystem health, status, and services. *Groundwater Ecology and Evolution*, 501–524. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819119-4.00022-6>
- Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., & Pujades, E. (2021). Urban Groundwater Contamination by Non-Steroidal. *Water*, 13(5), 720. <https://doi.org/10.3390/w13050720>
- Kim, C., Ryu, H. D., Chung, E. G., & Kim, Y. (2018). Determination of 18 veterinary antibiotics in environmental water using high-performance liquid chromatography-q-orbitrap combined with on-line solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1084(March), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.038>
- Kogovšek, J., & Petrič, M. (2013). Increase of vulnerability of karst aquifers due to leakage from landfills. *Environmental Earth Science*, 900–912. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-2180-3>
- Lin, Y. C., Lai, W. W. P., Tung, H. Hsin, & Lin, A. Y. C. (2015). Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(5). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4497-3>
- Liu, X., Lu, S., Guo, W., Xi, B., & Wang, W. (2018). Antibiotics in the aquatic environments: A review of lakes, China. *Science of the Total Environment*, 627, 1195–1208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.271>
- Lukač Reberski, J., Terzić, J., Maurice, L. D., & Lapworth, D. J. (2022). Emerging organic contaminants in karst groundwater: A global level assessment. *Journal of Hydrology*, 604. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2021.127242>
- Medina, M. J., Antic, D., Borges, P. A. V., Borko, S., Fišer, C., Lauritzen, S. E., Martin, J. L., Oromí, P., Pavlek, M., Premate, E., Puliafico, K., Sendra, A., & Reboleira, A. S. P. S. (2023). Temperature variation in caves and its significance for subterranean ecosystems. *Scientific Reports*, 13, 20735. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48014-7>
- Minski, V. T., Garbinato, C., Thiel, N., & Siebel, A. M. (2021). Erythromycin in the aquatic environment: Deleterious effects on the initial development of zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 84(2), 56–66. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1834477>
- Piram, A., Salvador, A., Verne, C., Herbretau, B., & Faure, R. (2008). Photolysis of β -blockers in environmental waters. *Chemosphere*, 73(8), 1265–1271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.018>

- Ramil, M., El Aref, T., Fink, G., Scheurer, M., & Ternes, T. A. (2010). Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: Sorption and biotransformation. *Environmental Science and Technology*, 44(3), 962–970. <https://doi.org/10.1021/es9027452>
- Rastogi, A., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management*, 300, 113694. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113694>
- Ravn, N. R., Michelsen, A., & Reboleira, A. S. P. S. (2020). Decomposition of Organic Matter in Caves. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 554651. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.554651>
- Reboleira, A.S.P.S., Bodawatta, K.H., Ravn, N., Lauritzen, S.E., Øvrevik Skoglund, R., Thomas-Poulsen, M., Michelsen, A., & Jønsson, K.A. (2022). Nutrient-limited subarctic caves harbour more diverse and complex bacterial communities than their surface soil. *Environmental Microbiome*, 17, 41. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00435-z>
- RStudio Team (2023). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (4.0.3.). <http://www.rstudio.com/>
- Tanoue, R., Margiotta-Casaluci, L., Huerta, B., Runnalls, T. J., Eguchi, A., Nomiya, K., Kunisue, T., Tanabe, S., & Sumpter, J. P. (2019). Protecting the environment from psychoactive drugs: Problems for regulators illustrated by the possible effects of tramadol on fish behaviour. *Science of the Total Environment*, 664, 915–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.090>
- Thorley, J., & Schwarz, C. (2018). {ssdtools}: An R package to fit Species Sensitivity Distributions. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1082. <https://doi.org/10.21105/joss.01082>
- Viana, P., Meisel, L., Lopes, A., De Jesus, R., Sarmento, G., Duarte, S., Sepodes, B., Fernandes, A., Dos Santos, M. M. C., Almeida, A., & Oliveira, M. C. (2021). Identification of antibiotics in surface-groundwater. A tool towards the ecopharmacovigilance approach: A portuguese case-study. *Antibiotics*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080888>
- Wang, Z., Gao, S., Dai, Q., Zhao, M., & Yang, F. (2020). Occurrence and risk assessment of psychoactive substances in tap water from China. *Environmental Pollution*, 261, 114163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114163>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wu, S., Zhang, L., & Chen, J. (2012). Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 875–884. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4414-4>
- Yi, M., Sheng, Q., Sui, Q., & Lu, H. (2020). β -blockers in the environment: Distribution, transformation, and ecotoxicity. *Environmental Pollution*, 266, 115269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115269>