

Joana Isabel Teixeira Salgueiro

Edulcorantes como marcadores da qualidade das águas

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Isabel Teixeira Salgueiro

Edulcorantes como marcadores da qualidade das águas

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Isabel Teixeira Salgueiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2009009158, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 22 de junho de 20015

(Joana Isabel Teixeira Salgueiro)

Agradecimentos

À Professora Doutora Celeste Lino, orientadora da minha monografia, agradeço a disponibilidade, o apoio, as sugestões e as críticas assertivas necessárias a este trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por tudo o que me ensinou nestes 5 anos, através dos seus Professores, Funcionários, Amigos e Colegas.

Aos meus pais, irmã e namorado por serem o meu pilar, o meu porto seguro e pelo carinho e compreensão incondicional sempre demonstrados. Por estarem sempre presentes e por me terem ensinado a ver o mundo de outra forma o meu mais sincero e profundo Obrigada!

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	5
Introdução.....	8
1. Edulcorantes: O que são?.....	9
2. Caraterísticas dos Edulcorantes.....	12
3. Edulcorantes em águas.....	14
4. Métodos de determinação.....	21
Conclusão.....	23
Bibliografia.....	25

Lista de Abreviaturas

ACE-K - Acessulfame de potássio

ADI - Ingestão diária admissível

ASP - Aspartame

CCAH - Comité Científico da Alimentação Humana

CYC - Ciclamato

DKP - Diketopiperazina

EFSA - European Food Safety Authority

ETAR - Estações de tratamento de águas residuais

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA - Food (US) and Drug Administration

GC – FID - Gas chromatography with flame ionization detection

GRAS - Generally recognized as safe

HPLC–ESI–MS/MS - High performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

HPLC–ES–MS/MS - Ultra-high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives

LC–MRMS - Liquid chromatography high resolution mass spectrometry

LC–MS/MS - Liquid chromatography mass spectrometry

LC–RP - Liquid chromatography reversed phase

LC/TOF - Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry

LC–UV - Liquid chromatography ultra-violet

PPCPs - Pharmaceuticals and Personal Care Products

SAC - Sacarina

SPE - Solid Phase Extraction

SUC - Sucralose

UPLC–MS/MS - Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

WHO - World Health Organization

RESUMO

O presente estudo pretende explanar o tema dos edulcorantes enquanto marcadores da qualidade das águas. Serão salientados os aspetos da sua presença e estabilidade na água e como é que a presença dos mesmos na água é um possível indicador de contaminação de águas subterrâneas e de superfície. Tendo em conta que estes são contaminantes das águas e que esta contaminação se processa de uma forma específica, face a outros contaminantes, serão salientados estudos realizados em diversos pontos do globo que procuram explicar esta temática, levantando questões e sobretudo salientando quais os edulcorantes que manifestam uma maior tendência ao nível da contaminação dos meios aquáticos e, quais é que se constituem- face aos outros- como marcadores de água. O estudo, inicia-se pela caracterização dos edulcorantes e a sua origem. Serão referenciadas de seguida algumas das características mais importantes dos mesmos, como a estabilidade, sabor, poder edulcorante entre outras e ainda a posição de alguns países em todo o mundo quanto a sua utilização. Seguidamente será realizada uma abordagem que se centra na análise dos edulcorantes na água, ou seja, no que se concerne à sua contaminação ambiental em concreto na água. Seguindo os pressupostos enunciados para a elaboração do presente estudo, serão apresentados quais os edulcorantes mais persistentes na água, sendo que serão referidos os resultados da análise da água em alguns países em todo o mundo. Por fim, serão apresentadas quais as metodologias analíticas para os extrair/purificar e também identificar e quantificar. Serão por fim, tiradas as devidas conclusões.

Palavras chave: edulcorantes; marcadores de água; águas de superfície/ subterrâneas/ residuais/ canalizada; análise; determinação e espectrometria de massa.

ABSTRACT

This study aims to explain the subject of sweeteners as water markers. They will be highlighted aspects of their presence and stability in the water and how their presence in water is a possible indicator of contamination of groundwater and surface. Given that these are contaminating the waters and that this contamination is processed in a specific way, compared to other contaminants, will be highlighted studies in several parts of the world that seek to explain this issue, raising questions and particularly emphasizing what sweeteners that manifest a greater tendency to aquatic environments contamination level, and which constitute - face to others- as water markers. The study begins with the sweeteners characterization and their origin. It will be referenced below some of the most important features, such as stability, sweetening power, flavor among several others and also the position taken by some countries of the world related to the use of artificial sweeteners. Previously it will be done an approach that focuses on the analysis of sweeteners in water and how they're becoming a factor of ambiental contamination in water.

Following all the subjects that I've mencioned, I will present what are the most persistent artificial sweeteners in water, and in the same time I will show some studies that where done in some countries of the world.

In the end I will present all of the analytical methodologies to extract/purify/identify/quantify them (the artificial sweeteners), finishing with a general conclusion.

Keywords: sweeteners; water markers; surface/ground/waste/tap water; analyzes; determination and mass spectrometry.

Introdução

O presente estudo constitui-se numa abordagem ao tema dos edulcorantes, em que medida se encontram presentes na vida humana e como é que estes se constituem enquanto marcadores da qualidade da água.

Desde tempos imemoriais que o homem procura alimentos (mel, fruta, etc) e bebidas doces e o açúcar (sacarose) sempre foi usado para adoçar os alimentos. O consumo de açúcar aumentou consideravelmente desde o início do século XX, sendo uma fonte importante de energia. Contudo, está também associado a dois problemas de saúde muito graves nos nossos dias que são a diabetes e a obesidade. Nas últimas décadas, o desejo pelo sabor doce tem sido, em parte, satisfeito pelos edulcorantes (A. Porto, U. Lisboa, 2010).

Os edulcorantes têm sido usados como os substitutos da sacarose de modo a reduzirem o consumo calórico, para a proteção dental e para o controlo da diabetes. Apesar destas vantagens existem estudos que revelam a sua presença em rios, lagos e águas subterrâneas em todo o mundo, pois possuem a capacidade de se manterem inalterados após tratamento das águas residuais (Spoelstra, Schiff, & Brown, 2013). Segundo (Buerge, Buser, Kahle, Müller, & Poiger, 2009) existem edulcorantes que reúnem as características de marcador ideal da qualidade das águas.

A quantificação destes compostos em vários tipos de água, incluindo a água destinada ao consumo humano, é o primeiro passo para entendermos o significado deste tema (Mawhinney, Young, Vanderford, Borch, & Snyder, 2011).

Existem vários métodos para avaliar a presença dos edulcorantes artificiais nas águas, sendo deles exemplo a extração em fase sólida seguida de cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa (Ordóñez, Quintana, Rodil, & Cela, 2012).

Assim, o presente estudo passa por primeiramente realizar uma caracterização acerca dos edulcorantes sintéticos e da estrutura e respetivas propriedades. De seguida, tendo em conta o tema do trabalho, será realizada uma exposição do estado da arte acerca da temática, ou seja, dos edulcorantes enquanto marcadores da qualidade de água, quer sejam as de superfície ou subterrâneas. Serão simultaneamente apresentados estudos realizados por diversos autores, em diferentes partes do mundo, que salientam a presença dos edulcorantes no meio aquático e de que forma se constituem enquanto marcadores da qualidade das águas apresentando também quais é que se encontram estáveis nos meios aquáticos, não produzindo assim riscos acrescidos para a saúde pública.

I. Edulcorantes: O que são?

Os edulcorantes podem ser caracterizados por serem um componente artificial, que na atualidade é usado no mundo inteiro como forma de substituição do açúcar. Este é usado em alimentos, bebidas, sendo também utilizado em produtos de higiene, nomeadamente anti-sépticos bucais e ainda medicamentos (Kroger e Kava, 2006).

Os edulcorantes, tal como os açúcares naturais e outros produtos químicos que contêm sabor doce, possuem estruturas moleculares, sendo que podem ser designadas por sistema AB, B (Yang *et al.*, 2011). Estes componentes são os responsáveis pela ocorrência de uma interação molecular entre o edulcorante e o receptor que gerará o sabor ou o gosto doce.

Contudo, os edulcorantes só devem ser utilizados na alimentação mediante uma avaliação que deve ser feita de forma rigorosa e por entidades competentes, como é o caso por exemplo do: Comité Científico da Alimentação Humana (CCAH); da European Food Safety Authority (EFSA); Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) e Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

As apreciações realizadas pelas entidades supra citadas têm como função a realização de estudos competentes ao nível da avaliação da toxicidade quer seja crónica ou aguda, bem como análises metabólicas e cancerígenas. No que se concerne aos estudos de âmbito toxicológico são estabelecidos e corrigidos os parâmetros com a finalidade de obter a Ingestão Diária Admissível (ADI), que são apresentados em mg/kg peso/dia (ASAE, 2006).

Os edulcorantes são utilizados como substitutos da sacarose em quantidades consideráveis quer nos produtos alimentares e bebidas, medicamentos e produtos de higiene, não fornecendo assim uma energia que seja considerável, ou seja, os níveis de insulina não são afetados pelo seu consumo, pelo que os torna um recurso desejável para os diabéticos. Ao mesmo tempo, estes possuem ainda a capacidade de ajudar na redução de ingestão de calorias, dando ainda uma sensação de doce que é mais elevada do que o açúcar natural. Na mesma linha, os adoçantes de alta intensidade, usados em pequenas quantidades, fazem com que a ingestão de calorias seja reduzida de forma significativa, mesmo para os edulcorantes que são metabolizados (EU, 1994).

Uma das características do uso de edulcorantes é a de que estes podem ajudar a que não surjam cáries dentárias, na medida em que a grande maioria deles não é metabolizada como os açúcares, sendo apenas fermentada de forma leve pela microflora bucal (Imfeld, 1993 & Strubig, 1988).

O uso dos edulcorantes desde sempre criou discussões, nomeadamente ao nível dos potenciais riscos e segurança para a saúde. Existem, portanto, um sem número de fóruns, jornais, relatórios e publicações de cariz científico que abordam esta temática, quer no âmbito das questões relacionadas com a segurança e os possíveis riscos que o uso dos mesmos pode acarretar para a saúde do ser humano (Grice, e Goldsmith 2000 a); Kroger *et al.*, 2006; Magnuson *et al.*, 2007; Weihrauch e Diehl, 2004)

Face ao exposto, existem cinco edulcorantes que são aprovados pela Food (US) and Drug Administration (FDA), sendo que são considerados como seguros nos EUA, sendo eles: acesulfame-K (ACE-K); aspartame (ASP); neotame (NEO); sacarina (SAC) e sucralose (SUC) (FDA, 2006).

Na União Europeia, o CYC é aprovado ao contrário do que acontece nos EUA (EU, 2003). O uso do CYC é proibido desde a década de 70 nos EUA dado que de acordo com Oser *et al.* (1975) é tido como um causador de cancro em experiências realizadas em laboratório com ratos, nos quais se observou a ocorrência de cancro do estômago. Esta situação fez com que o Departamento de Saúde, Educação e Bem- Estar dos EUA removesse o CYC da lista das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (Generally Recognized As Safe - GRAS).

Contudo, outros estudos realizados neste âmbito não demonstram que exista uma relação entre o CYC e o cancro, no entanto, continua proibido nos EUA, aguardando uma renovação para que possa novamente ser reconhecido pela FDA (CFSAN, 2009).

No que diz respeito ao ACE-K, o seu poder edulcorante é 200 vezes superior ao da sacarose. Possui também um sabor amargo. O ACE-K é utilizado em cerca de 90 países nos quais, de acordo com Kroger *et al.*, (2006) não existem problemas de saúde que estejam associados ao seu consumo e que estejam referenciados cientificamente. Foi aprovado em 1994 através da Diretiva 94/35/CE.

Contudo, no ano de 2008, Bandyopadhyay *et al.* publicaram um estudo em que mostram a ocorrência de danos no DNA devido à exposição ao ACE-K.

Na década de 80 foram também publicados estudos referentes ao uso de SAC na dieta alimentar de animais, sendo que, de acordo com Renwick (1986), existia alta incidência de cancro da bexiga em ratos, derivado da aplicação de doses altas de SAC na dieta alimentar destes animais, o que levou a que fosse proibida no Canadá. Posto isto, nos EUA, todos os produtos que continham SAC tiveram que ser rotulados, derivado da ocorrência de cancro em animais de laboratório. Contudo, no ano de 2001, os EUA removeram a SAC

da lista dos aditivos potencialmente cancerígenos, pois não existia uma correlação que estabelecesse perigosidade para o consumo humano (Cohen, 2008).

Desta forma, o Canadá¹ através de um memorando restabeleceu o uso da SAC como aditivo alimentar. Simultaneamente, na UE, foi aprovado um memorando em que constava a ingestão diária admissível, tendo sido fixado na ordem de 0-5 mg/kg do peso corporal.

No que diz respeito ao ASP este é 180 vezes mais doce que a sacarose, sendo que são necessárias apenas pequenas quantidades para adoçar alimentos e bebidas. Ao mesmo tempo, ao contrário do ACE-K, o ASP não é estável ao calor, pelo que este se deteriora nos líquidos quando são armazenados por longos períodos de tempo. O ASP é o éster metílico do ácido aspártico e da fenilalanina. No que se concerne aos seus metabolitos, o ASP é hidrolisado originando fenilalanina, ácido aspártico e metanol.

É ainda de denotar que nos casos dos indivíduos que possuem défice de fenilalanina hidroxilase pode gerar atrasos mentais do crescimento, microcefalia, convulsões, tremores entre outros. Os doentes não tratados subsequentemente desenvolvem deficiência intelectual, alterações comportamentais (hiperatividade) e alterações motoras. Por esta razão todos os produtos que contenham ASP têm que estar devidamente rotulados, para que esteja assinalada a fonte de fenilalanina (Simintzi *et al.*, 2007).

O ASP tem gerado controvérsia, sendo que é um dos edulcorantes que mais questões levanta ao nível dos potenciais problemas de saúde associados ao seu consumo. Contudo, a EFSA considera este edulcorante como seguro, tendo em conta os estudos clínicos e toxicológicos realizados (Simintzi *et al.*, 2007).

No que diz respeito à SUC, ela é termicamente estável, sendo eliminada de forma inalterada através das fezes (Roberts *et al.*, 2000). De acordo com Grice e Goldsmith (2000 a) existem mais de cem estudos de segurança que comprovam que o consumo de SUC não constitui qualquer tipo de risco para a segurança humana. A SUC foi descoberta no ano de 1976, estando presente na atualidade em mais de 80 países. Nos EUA, a autorização da SUC surgiu no ano de 1998, sendo que apenas em 1999 é que se verificou o seu alargamento ao nível de bebidas e alimentos (US/FDA, 1999) e na EU em 2003 através da Diretiva 2003/115/CE.

¹ HealthCanada, Ottawa (2007) http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/sweetener-edulcor/saccharin_prop-eng.php

2. Características dos Edulcorantes

De entre os edulcorantes intensos, sintéticos mais usados e com maior incidência no meio aquático, destacam-se o ACE-K, o ASP, o CYC, a SAC e a SUC.

As características, estruturas e propriedades dos edulcorantes intensos apresentam-se nas tabelas 1 e 2, respetivamente.

Assim no que se refere às características, pode destacar-se que o ACE-K consegue manter a sua estabilidade a altas temperaturas, sendo mais utilizado nas bebidas e chocolates. Possui uma doçura de fácil perceção, tendo também um poder adoçante duzentas vezes maior que a sacarose.

Por sua vez, o ASP não suporta temperaturas elevadas, na medida em que perde o seu poder edulcorante, no entanto, tem uma boa dissolução em líquidos quentes. É ainda o edulcorante que mais se assemelha à sacarose, possuindo igualmente um poder adoçante 200 vezes superior ao da SAC.

O CYC não perde o seu sabor a temperaturas elevadas, podendo desta forma ir ao fogo tendo um poder adoçante cerca de quarenta vezes mais elevado que a SAC.

A SAC possui a capacidade de adoçar quando combinada com temperaturas elevadas. Tem um sabor que se caracteriza por um gosto residual doce, tendo um poder adoçante trezentas vezes maior do que a SAC.

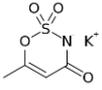
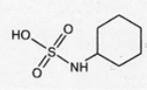
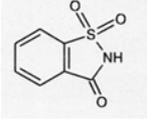
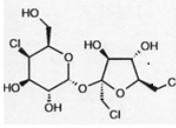
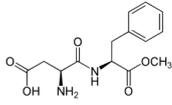
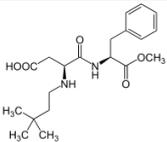
A SUC resiste bem a temperaturas altas, sendo também parecido com a sacarose. Foi sintetizada a partir da molécula do açúcar de cana, tendo sido introduzidos três átomos de cloro. Possui um sabor entre seiscentas a oitocentas vezes superior à da sacarose.

No caso do NEO, a sua estrutura relaciona-se estreitamente com o ASP. É entre 7.000 a 13.000 vezes mais doce do que a sacarose. Embora idêntica ao ASP a libertação de fenilalanina é quase insignificante. Os produtos que contêm NEO não são obrigados a possuírem um rótulo que designe fontes possíveis de fenilalanina (Duffy e Sigman-Grant, 2004).

Tabela I - Principais características dos edulcorantes sintéticos (United States Recommended Daily Allowance (USRDA)).

Edulcorante	Estabilidade	Sabor	Poder edulcorante relativamente e à sacarose	Quantidade equivalente a 1 colher de sopa de sacarose	Calorias (Kcal/g)	Tipo
Acesulfame -K	Estável a altas temperaturas. Muito utilizado em bebidas, chocolates, geleias, produtos lácteos, gomas e em panificação.	Sem sabor residual. Sabor doce de fácil percepção	200 vezes superior	24 mg	0	Artificial. Derivado de ácido acético
Aspartame	Perde o poder de adoçar a altas temperaturas. Boa dissolução em líquidos quentes.	É o mais parecido com sacarose	200 vezes superior	24 mg	4	Artificial. Éster metílico da fenilalanina e do ácido aspártico
Ciclamato	Suporta alta temperatura não perdendo o seu poder edulcorante	Possui sabor residual agri-doce	40 vezes superior	121,5 mg	0	Artificial. Derivado do petróleo
Sacarina	Suporta alta temperatura não perdendo o seu poder edulcorante	Deixa gosto residual, metálico	300 vezes superior	16 mg	0	Artificial. Derivado do petróleo
Sucralose	Resiste bem a altas temperaturas	Idêntico à sacarose, não deixa gosto residual	600 a 800 vezes superior	6 g	0	Artificial. Obtida a partir da molécula de açúcar de cana modificada em laboratório
Neotame	É estável ao calor, podendo ser utilizado a temperaturas elevadas durante o cozimento, tornando-o adequado como um substituto do açúcar em produtos assados.	Tem um sabor doce mesmo em níveis residuais.	7 000 a 13 000 vezes superior		0	

Tabela 2 - Estruturas e propriedades dos edulcorantes intensos (adaptado de Lange, Scheurer & Brauch, 2012).

	ACE-K	CYC	SAC	SUC	ASP	NEO
Estrutura						
Forma Molecular	C ₄ H ₅ NO ₄ S	C ₆ H ₁₃ NO ₃ S	C ₇ H ₅ NO ₃ S	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅
Massa Molecular em (g/mol)	163.15	179.24	183.19	397.63	294.31	378.47
Equivalência à sacarose	200	30	300	600	160-220	7000-13000
Solubilidade em água (g/L) (°C)	270 (20 °C)	1000, 133	4	283 (20 °C)	~10 (25 °C)	12.6
pK_a^a	2.0	1.9	2.2	11.8 ^c	3.19 e 7.87	3.01 e 8.02
Log Kow^b	-1.33	-1.61	0.91	-1.00 - 0.51 ±0.05	0.07	2.39 (espécie não iônica)
Excreção humana	100 % inalterado	Principalmente inalterado, variações inter-individuais na conversão para ciclohexilamina	Principalmente inalterado	> 92% inalterado	Degradação metabólica completa em ácido aspártico, fenilalanina e metanol	<2% desesterificação principal via metabólica
ADI mg/kg peso corpo	9	7	5	15	40	2

3. Edulcorantes em águas

Os edulcorantes, tal como já foi referenciado, são usados como um substituto do açúcar, seja nos alimentos, bebidas ou em produtos de higiene e de farmácia. Contudo a presença destes neste meios tem vindo a ser alvo de preocupação para vários investigadores, que levaram a cabo estudos com o intuito de determinar qual ou quais os edulcorantes que mais se encontram presentes nos meios aquáticos.

Os edulcorantes são contaminantes de águas residuais. A sua contaminação ocorre de forma muito específica. Face a outros contaminantes emergentes, como os da indústria

farmacêutica e os produtos de higiene pessoal, os edulcorantes artificiais têm sido reconhecidos nas ciências ambientais (Giger, 2009).

Os edulcorantes artificiais têm vindo a receber bastante atenção por parte dos investigadores, devido ao fato de se encontrarem presentes de forma permanente nos ambientes aquáticos (Buerge *et al.*, 2009; Houtman, 2010; Scheurer *et al.*, 2009; Van Stempvoort *et al.*, 2011).

Desde 2009 surgiu uma preocupação e uma emergência na realização de estudos sobre os efeitos da contaminação dos edulcorantes ao nível ambiental, nomeadamente no que diz respeito ao ACE-K e à SUC, provavelmente devido à sua maior estabilidade. Estes começaram a surgir em ambientes aquáticos em concentrações consideráveis, sendo que estas começaram a ser mais elevadas do que para a maioria dos produtos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal (PPCPs), ou de outros produtos químicos e orgânicos de águas residuais (Buerge *et al.*, 2009).

A ocorrência destas concentrações de ACE-K e de SUC manifestam persistência, para além de uma elevada solubilidade na água, fazendo com que sejam considerados marcadores químicos seguros. Assim, ao usar-se o ACE como um marcador químico de água, consegue-se detetar até 1% mesmo nos recursos que derivam das águas residuais (Buerge *et al.*, 2009).

Portanto, e o ACE e a SUC constituem-se enquanto mecanismos de utilidade ao nível de marcadores de água, da mesma forma, alguns edulcorantes são também precursores de produtos de oxidação que se podem formar durante o processo de tratamento de águas residuais, ou ainda por tratamento com ozono que ocorre através dos processos de ozonização na distribuição de água (Scheurer *et al.*, 2011).

Tendo em conta que os edulcorantes se utilizam como aditivos alimentares, estes são testados de forma sistemática, com o intuito de se despistarem eventuais danos prejudiciais, ou efeitos adversos para a saúde dos indivíduos (Kroger *et al.*, 2006; Renwick, 1986; Schilfan *et al.*, 1993).

Uma vez que a concentração de determinados edulcorantes é da ordem de microgramas por litro, ao nível de águas superficiais, subterrâneas e de água potável, existe uma margem de segurança bastante considerável que previne potenciais efeitos prejudiciais para a saúde, atendendo ao facto que as ADIs recomendadas se encontram num intervalo situado entre 5 a 50 mg/kg de peso corporal por dia (Kroger *et al.*, 2006).

Vários estudos têm sido feitos nos diferentes tipos de águas e em várias regiões do globo, de modo a inferir da presença de edulcorantes e, no caso de existirem, qual a sua concentração. Serve a tabela 3, para demonstrar o acima citado.

Tabela 3 - Níveis de edulcorantes intensos em diferentes tipos de água.

País	Tipo de Água	Concentração (ng/L)						Bibliografia
		ACE-K	ASP	CYC	NEO	SAC	SUC	
China Tianjin	Residuais:							(Gan, Sun, Feng, Wang, & Zhang, 2013)
	• ETAR afluente	1.16×10 ⁴	64.7	2.76×10 ⁴	36.6	1.03×10 ⁴	2.06×10 ³	
	• ETAR efluente	1.03×10 ⁴	n.d.	133	n.d.	242	1.85×10 ³	
	Superficiais:							
	• Rios (n=3)	2.73×10 ³ 4.65×10 ³	n.q. – 76.8	205 – 313	n.q. – 25.4	193 –746	287 – 311	
	• Mares (n=3)	875 – 3.55×10 ³	n.d.	62.7 – 252	n.d.	99.7 – 249	53.9 – 97.4	
	Subterrâneas (n=2)	24.8 – 45.7	n.d.	6.10 – 50.6	n.d.	11.3 – 80	n.d. - 12.9	
	Torneira (n=3)	786 – 824	n.d.	29 – 35.4	n.d.	47.5 – 65.1	113 - 171	
Canadá								(Spoelstra et al., 2013)
Brantford	Superficiais:	550 – 1590	-	< mdl (6)	-	180 –	-	
	• Rios (n=7)			, 240		350		
Cambridge	Subterrâneas	<mdl (4) , <	-	<mdl (8)	-	<mdl (7)	-	
	ARS (n=9)	n.q. (3) 40 – 390	-	, 10	-	, <n.q. (2)	-	
Kitchener	Subterrâneas	80 – 120	-	<mdl (4)	-	<n.q. (3)	-	
	ARS (n=4)					, 70		
Waterloo	Subterrâneas (n=8)	50 – 120	-	<mdl (8)	-	<mdl (2) <n.q. (6)	-	
Grand River	Superficiais (n=57)	<mdl – 3600	-	<mdl – 880	-	<mdl - 7200	<mdl - 21000	

Tabela 3 - Níveis de edulcorantes intensos em diferentes tipos de água (continuação).

País	Tipo de Água	Concentração (ng/L)						Bibliografia
		ACE-K	ASP	CYC	NEO	SAC	SUC	
EUA	Canalizada	-	-	-	-	-	<mdl – 2900	(Spoelstra et al., 2013)
	Engarrafada (n=22)	-	-	-	-	<mdl	<mdl – 1800	
	Residual (n=26)	-	-	-	-	-	<mdl - 10000	
Europa								
Alemanha	Superficiais (n=23)	270 – 2700	-	30 – 320	-	10 – 350	10 – 110	(Spoelstra et al., 2013)
	Subterrânea (n=3-4)	2000*	-	250*	-	10*	50*	
	Canalizada (n=24)	2100 – 3600	-	100 – 240	-	30 – 110	120 – 160	
Suécia	Superficiais (n=15)	-	-	-	-	-	<mdl – 3560	
	Engarrafada (n=3)	-	-	-	-	-	110 – 410	
Suiça	Superficiais (n=80)	<mdl – 10000	-	-	-	-	-	
	Subterrânea (n=20)	<mdl – 6900	-	<mdl – 130	-	<mdl – 180	<mdl – 600	

n.d. = não detetada (<LOD);

n.q. = detetada mas não quantificada (<LOQ);

< mdl = inferior ao limite de deteção mínimo;

ARS = esquema de recarga artificial;

* = valor máximo reportado;

- = não avaliado.

Em 2009, Buerge *et al.*, realizaram investigações na Suíça com o intuito de documentar a ocorrência generalizada de edulcorantes nas águas residuais, afluentes e efluentes, águas subterrâneas, rios e água de consumo. Neste estudo destacou-se a presença de quatro principais edulcorantes: ACE, CYC, SAC e SUC.

Estudos levados a cabo na Suécia, em duas estações de tratamento de águas residuais (ETAR), e na Suíça, em quatro ETARs, demonstraram que, em águas com bastante lama, não existe uma absorção significativa dos edulcorantes, nomeadamente de ACE-K, CYC, SAC e SUC (Buerge *et al.*, 2009; Brorström-Lundén, 2007).

Nos EUA, foram analisadas cinco afluentes de águas residuais, provenientes de três locais distintos, tendo em conta o ASP, a SAC e a SUC, sendo que a maior parte dos dados sobre a ocorrência de edulcorantes artificiais em águas residuais encontra-se apenas disponível para a SUC. Estas análises ocorreram em afluentes de estações de tratamento de águas, tendo sido realizados estudos em países como a Suécia, Suíça, Alemanha, Canadá. (Thurman, 2010)

De acordo com Mead *et al.*, (2009), no caso dos EUA, apenas os dados de oito fossas sépticas é que se encontram disponíveis, na medida em que a partir das análises realizadas nos afluentes, as diferenças concretas de cada país no consumo de SUC podem ser reconhecidas de forma clara.

Na Suíça, tendo em conta as estimativas calculadas, o ACE-K foi o edulcorante mais detetado de forma sistemática nas amostras de água. Assim, devido à sua persistência contra a degradação microbiana, o ACE-K pode constituir-se enquanto um marcador de água para águas municipais (Buerge *et al.*, 2009, 2011).

Os estudos realizados por Mead *et al.*, (2009), Buerge & Poiger (2011), Minten *et al.*, (2011), Scheurer *et al.*, (2011), Soh *et al.*, (2011) e Torres *et al.*, (2011) corroboram outros estudos realizados em que o ACE é o edulcorante mais frequentemente detetado nos meios aquáticos. Para além deste, a SAC, o CYC e a SUC afiguram-se também presentes, mas com concentrações bastante mais baixas em relação ao ACE que se apresenta em teores mais elevados. Por sua vez a dicetopiperazina (DKP), um metabolito do ASP, foi também detetada mas apenas em águas residuais, com uma concentração de até 200 ng/L. Esta situação poderá ser explicada pelo fato de que a DKP não possuir estabilidade na água.

O ACE-K e a SUC são os edulcorantes que mais se mantêm inalterados, o que denota a sua estabilidade (Grice e Goldsmith, 2000). Os estudos realizados demonstram contudo que estes edulcorantes são seguros, quer para animais, quer para humanos, sendo que são substâncias de uso frequente, estando aprovadas em mais de 70 países.

De acordo com Scheurer *et al.*, (2010) e Minten *et al.*, (2011) só é possível eliminar uma proporção significativa de SUC através de tratamentos com carvão ativado. De acordo com os autores supra, este será o método ideal para que ocorra uma diminuição substancial da sua presença. Assim, face ao exposto tanto a SUC como o ACE devido à combinação das suas características – grande estabilidade, alta solubilidade em água e ainda o seu uso generalizado pelos seres humanos – são potenciais marcadores ideais entre as atividades humanas no âmbito do ambiente aquático (Mead *et al.*, 2009; Soh *et al.*, 2011).

Os estudos efetuados nas águas de superfície sobre a ocorrência de edulcorantes artificiais, incluindo águas doces e do mar, mostraram que a SUC é o edulcorante mais estudado. Este estudo abrangeu 20 países da UE, nos quais foram recolhidas 120 amostras (Loos *et al.*, 2009).

Em 2008, na Suíça os estudos realizados para avaliar a presença de SUC em quatro lagos, demonstraram a sua ausência. As razões de tal situação podem ser de várias ordens, nomeadamente o limite de quantificação ser alto (0,2 µg/L), ou ainda pelo facto de este edulcorante ter entrado tarde no mercado deste país, em comparação com outros edulcorantes (Buerge *et al.*, 2009).

Para além dos estudos relativos à água doce, outros incidem sobre a água do mar, no qual se detetou a presença de SUC. De acordo com Mead *et al.*, (2009), a SUC foi assinalada em concentrações que oscilam de 0,0008 a 0,39 mg/L em águas do mar do litoral nos EUA, sendo que mesmo com a colheita de duas amostras das correntes do Golfo, a presença deste edulcorante foi encontrada em baixa concentração, apresentando valores de 0,0008 e 0,068 mg/L.

No que se concerne às águas subterrâneas, estas têm merecido a atenção por parte dos investigadores, na medida em que a sua contaminação pode resultar da infiltração das águas de superfície (Buerge *et al.*, 2009 & Scheurer *et al.*, 2010 a)

Os estudos intensivos de Buerge *et al.*, (2009) mostram que os quatro principais edulcorantes analisados, ACE-K, CYC, SAC e SUC, e que foram detetados em águas residuais, foram também encontrados nos aquíferos subterrâneos. Destes, destacou-se o ACE-K, que se revelou mais persistente, tendo sido encontrado de forma frequente nas amostras de água subterrânea, manifestando concentrações mais elevadas face a todos os outros edulcorantes analisados.

Ainda na Suíça, mais concretamente em Zurich, o ACE foi encontrado em 65 das 100 amostras analisadas, com concentrações até 4,7 µg/L. Ao mesmo tempo, os valores mais elevados de edulcorantes em águas subterrâneas foram encontrados no Canadá, com valores

máximos de 34 µg/L para o ACE, 0,98 µg/L para o CYC, 10 µg/L para a SAC e 24 µg/L para a SUC (Lange *et al.*, 2012).

Em águas subterrâneas, em que haja impacto de águas residuais, ou em amostras de águas subterrâneas rasas, VanStempvoort *et al.*, (2011b) detetaram elevada presença de ACE. Nas águas residuais de uma fossa séptica de um acampamento, os teores encontrados foram de várias dezenas de microgramas por litro, quando comparados com outros edulcorantes investigados, como é o caso do CYC, SAC e SUC.

O segundo edulcorante que revela índices de persistência mais elevados é a SUC, no entanto esta é detetada de forma menos frequente nas águas subterrâneas ou margens de rios. Esta deteção mais baixa também pode resultar de alguns fatores, nomeadamente a sua quantificação e a introdução mais tardia nos países em que decorreu a análise. Nos estudos de Scheurer *et al.*, (2010 a) foi encontrado CYC e SAC em águas subterrâneas e ribeirinhas, no entanto as informações que estes estudos dispõem não conseguem dar uma imagem única da presença estável destes edulcorantes nestas massas de água.

Contudo em Isarael, Scheurer *et al.*, (2010 a) encontraram uma redução maior da presença de SUC em relação ao ACE-K, sendo que neste estudo o tempo de residência da amostragem do afluyente estudado era de cerca de um ano e meio. O processo de redução da SUC pode ter diversas origens, como é o caso da absorção no subsolo, ou ainda e de forma mais frequente, a degradação parcial do aquífero.

Face ao exposto, os processos de atenuação natural podem passar por várias etapas, como é o caso da filtração de bancos de água, passagem subterrânea, processos biológicos e filtros ativos. Ao mesmo tempo, devido à boa solubilidade dos edulcorantes na água, existe a tendência para que haja uma baixa absorção por parte dos solos (Buerge *et al.*, 2011).

Tendo em conta os edulcorantes analisados, apenas o CYC e a SAC podem ser removidos de forma eficaz nos processos de tratamento acima mencionados. Nos estudos de Scheurer *et al.*, (2010 a) foram analisados três edulcorantes nas margens do rio Rhine. No leito do próprio rio encontravam-se presentes de forma permanente CYC e SAC. Apesar de apresentarem uma baixa taxa de incidência, esta permanência poderá ser justificada, de acordo com os autores, como resultado de uma degradação biológica. Na mesma experiência, e após a ocorrência de um atraso de cerca de uma semana no tratamento, observou-se uma degradação rápida, sendo que o CYC e a SAC foram removidos de forma completa num período de tempo entre 15 a 20 dias.

No entanto, é de realçar que tanto o ACE como o SUC mantêm-se praticamente inalterados aquando dos processos de tratamento de esgotos.

4. Métodos de determinação

No que se concerne à determinação dos edulcorantes em ambientes aquáticos, não existem quer a nível internacional ou nacional, métodos padronizados, no entanto são vários os métodos que vão sendo publicados na literatura científica, sendo que a instrumentação analítica usada permite a determinação simultânea dos edulcorantes artificiais mais comuns existentes na água e inclui várias etapas: extração, purificação, deteção e quantificação (tabela 4).

A primeira etapa consiste na filtração das amostras recorrendo a filtros de membrana de nitrato de celulose, filtros de fibra de vidro, ou recurso a um filtro biológico que permite a precipitação do grupo fosfato seguida de nitrificação/desnitrificação. Segue-se um processo de purificação recorrendo a extração em fase sólida (tabela 4).

Os edulcorantes são posteriormente detetados e quantificados por cromatografia líquida com detecção por massa (LC-MS/MS, LC-HMRS, LC-TOF/MS, UHPL-MS/MS, HPLC-ESI-MS/MS e UPLC-MS/MS) (Buerge *et al.*, 2009; Ferrer e Thurman, 2010; Gan *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2012; Ordóñez *et al.*, 2012; Perkola e Sainio, 2014; Scheurer, Brauch e Lange, 2009; Tran, Hu e Ong, 2013; Wu *et al.*, 2014).

No que diz respeito à cromatografia em camada fina, alguns investigadores recorrem à sua utilização para a determinação de SUC em afluentes de esgotos, águas de superfície e de consumo (Morlock *et al.*, 2011).

Ao nível da estabilização, pode-se referir que esta é de especial importância nas amostras de águas residuais face aos edulcorantes não persistentes, destacando-se o SAC e CYC. Nos seus estudos, Oppenheimer *et al.*, (2011) referem que adicionaram às amostras azida de sódio e ácido ascórbico para destruir qualquer oxidante residual. Contudo, referem que a aplicação deste procedimento de estabilização, apenas foi plausível através do processo de comparação com os procedimentos de estabilização usados em PPCPs, não sendo aplicados e testados de forma concreta na SUC.

Tabela 4 - Metodologias analíticas usadas para determinação de edulcorantes intensos em águas.

Tipo de água	Edulcorantes	Extração/Purificação	Deteção e Quantificação	Bibliografia
Residual Canalizada Rio Mar Subterrânea	ACE-K; ASP; CYC; SAC; NEO; SUC	Filtração por filtros de membrana de nitrato de celulose (0.45 µm, 47 mm) SPE: Colunas Poly-Sery PWAX (60 mg, 3 mL)	LC – MS/MS	(Gan <i>et al.</i> , 2013)
Residual Superficial Subterrânea Costeira	ACE-K; ASP; CYC; SAC; SUC	Filtração SPE	LC – MS/MS LC – HRMS	(Lange <i>et al.</i> , 2012)
Superficial	ACE-K; ASP; CYC; SAC; NEO; SUC	Precipitação do grupo fosfato seguida de nitrificação/desnitrificação usando um filtro biológico SPE: Bakerbond SDBI (200 mg; 6 mL)	LC – MS/MS (I200 SL HPLC) LC – RP (Zorbax Eclipse XDB-C8)	(Scheurer, Brauch, & Lange, 2009)
ETAR	ACE-K; CYC; SAC; SUC	SPE Online	LC – MS/MS (API 4000)	(Buerge <i>et al.</i> , 2009)
Superficial Residual	ACE-K; ASP; CYC; SAC; SUC	Filtração combinando pré-filtros de fibra de vidro e filtros de nitrocelulose (0.45 µm) SPE: colunas Oasis HLB (200 mg)	LC – High Pressure (ProStar 210)	(Ordóñez <i>et al.</i> , 2012)
Subterrânea Residual	ASP; SAC; SUC	Filtros de membrana (0.2 µm) SPE: colunas Oasis HLB (500 mg, 6 mL)	LC/TOF – MS (Agilent Series I200)	(Ferrer & Thurman, 2010)
Subterrânea Superficial Residual	ASP; CYC; SAC; SUC	Filtração combinada de filtros de fibra de vidro (1.2 µm) e filtros de membrana (0.45 µm) SPE: Chromabond HR-X (500 mg, 6 mL)	HPLC – ESI – MS/MS	(Tran, Hu, & Ong, 2013)
Potável	ACE-K; SUC	Filtração	UHPLC – MS/MS Deteção LC – UV LC – MS/MS GC – FID	(Wu <i>et al.</i> , 2014)
Lagos Rios	ACE-K; CYC; SAC; SUC	Filtros de fibra de vidro (GF/A 1.6 µm) SPE: Oasis WAX (150 mg, 6 mL)	LC – UPLC – MS/MS	(Perkola & Sainio, 2014)

Conclusão

Os edulcorantes artificiais foram recentemente encontrados em águas residuais, superficiais, subterrâneas e canalizadas. A quantificação destes compostos nos vários tipos de água é o primeiro passo para perceber a importância deste tema (Mawhinney *et al.*, 2011).

Após a exposição dos estudos, salienta-se que são seis os edulcorantes, ACE-K, ASP, CYC, SAC, SUC e NEO, que mais se destacam nas análises realizadas em meios aquáticos, sendo que dentro deste grupo destaca-se o ACE-K, CYC, SAC e SUC, com maior ocorrência nos ciclos de água.

É de salientar que alguns apresentam uma concentração elevada na água, sendo que a sua presença no meio ambiente diminui consoante se desenvolve a degradação biológica, principalmente a SAC, o CYC e em determinada medida a SUC. A sua diminuição também ocorre através da diluição, como são os casos da SUC e do ACE-K. Os níveis destes dois últimos edulcorantes, nas águas de superfície e subterrâneas ou águas destinadas ao consumo humano, podem ter uma variação de microgramas por litro.

Os edulcorantes artificiais mais persistentes são o ACE-K e a SUC, considerados marcadores antropogénicos na maioria das publicações, e constituem-se como uma das variações poluentes antropogénicas mais conhecidas (Lange *et al.*, 2012).

Tem sido cada vez mais possível uma quantificação precisa dos edulcorantes nas águas residuais, superficiais e de consumo, o que é extremamente importante. Devido ao uso dos edulcorantes como aditivos alimentares, a sua ocorrência no ambiente aquático deverá ter especial atenção, principalmente no que diz respeito à qualidade da água para consumo uma vez que esta poderá ser negativamente influenciada pelos potenciais metabolitos cujo efeito até a data não é completamente conhecido (Scheurer *et al.*, 2009).

É de salientar ainda que a ocorrência de edulcorantes na água pode diferir muito de país para país. Tal facto depende das situações e dos anos de aprovação, ou seja, se já se encontram há mais anos no mercado ou não, e do próprio uso.

A literatura científica salienta também que não existem ainda muitos estudos sobre as questões ecotoxicológicas do impacto da SUC, na medida em que este foi o primeiro edulcorante a ser detetado no ambiente, ao mesmo tempo sendo o ACE-K, o segundo edulcorante mais persistente.

O ACE-K é um exemplo de um edulcorante que permanece estável em águas residuais tratadas e não tratadas, sendo portanto difícil distinguir a origem da contaminação. Assim

sendo, os edulcorantes artificiais podem servir como indicadores da ação antropogénica do homem ou outros contaminantes das águas residuais, subterrâneas e superficiais.

Em suma, os efeitos reais dos edulcorantes artificiais nos biotas aquáticos, águas de superfície e subterrâneas são de certa forma desconhecidos.

Bibliografia

- ASAE. (2006). Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Disponível em: <http://www.asae.pt/>.
- Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S., Mukherjee, A. (2008). **Drug Chem Toxicol** 31:447–457.
- Brorström-Lundén, E., Svenson, A., Viktor, T., Woldegiogis, A., Remberger, M., Kaj, L., Dye, C., Bjerke, A., Schlabach, M. (2008). Swedish Environmental Institute LtdBuerge, I. J., Buser, H. R., Kahle, M., Müller, M. D., & Poiger, T. (2009). *Environmental Science and Technology*, 43(12), 4381–4385.
- Buerge, I.J., Buser, H.R., Kahle, M., Muller, M.D., Poiger, T. (2009). *Environ Sci Technol* 43:4381–4385
- CFSAN/Office of Food Additive Safety. (2009). *U.S. Food and Drug Administration*. Silver Spring
- Cohen, S.M., Arnold, L.L., Emerson, J.L. (2008). *Agro Food Ind Hi Tec* 19:24.
- Duffy, V.B., Sigman-Grant, M. (2004). *J Am Diet Assoc* 104:255–275.
- EU (1994) European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on sweeteners for use in foodstuffs.
- EU (2003) European Parliament and Council Directive 2003/115/ EC of 22 December 2003 amending Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs.
- FDA (2006) *FDA Consum Mag* 40:27–28.
- Ferrer, I., Thurman, E. M. (2010). *J Chromatogr A* 1217:4127–4134.
- Gan, Z., Sun, H., Feng, B., Wang, R., & Zhang, Y. (2013). *Water Research*, 47(14), 4928–4937.
- Giger, W. (2009). *Anal Bioanal Chem.* 393:37–44.
- Grice, H.C., Goldsmith, L.A. (2000a). *Food Chem Toxicol* 38 (Supplement 2):1–6.
- Grice, H.C., Goldsmith, L.A. (2000b). Sucralose – an overview of the toxicity data. *Food Chem. Toxicol.* 38, 1–6.

Imfeld, T. (1993). *Caries Res.*27:50–55.

Kroger, M., Meister, K., Kava, R. (2006). *Compr Rev Food Sci Food Safety* 5:35–47.

Lange, F. T., Scheurer, M., & Brauch, H. J. (2012). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2503–2518.

Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. (2009). *Environ Pollut* 157:561–568.

Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R., Williams, G.M. (2007). *Crit Rev Toxicol* 37:629–727.

Mead, R.N., Morgan, J.B., Avery, J., Kieber, R.J., Kirk, A.M., Skrabal, S.A., Willey, J.D. (2009). *Mar Chem.* 116:13–17.

Mawhinney, D. B., Young, R. B., Vanderford, B. J., Borch, T., & Snyder, S. a. (2011). *Environmental Science and Technology*, 45(20), 8716–8722.

Ordóñez, E. Y., Quintana, J. B., Rodil, R., & Cela, R. (2012). *Journal of Chromatography A*, 1256, 197–205.

Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Björlenius, B., Alsberg, T. (2011). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (4), 357–366.

Morlock, G.E, Schuele, L., Grashorn, S. (2011). *J Chromatogr. A* 1218:2745–2753.

Oppenheimer, J., Eaton, A., Badruzzaman, M., Haghani, A.W., Jacangelo, J.G. (2011). *Water Res.* 45:4019–4027.

Oser, B.L., Carson, S., Cox, G.E., Vogin, E.E., Sternberg, S.S. (1975). *Toxicology* 4:315–330.

Perkola, N., & Sainio, P. (2014). *Environmental Pollution*, 184, 391–396.

Porto, A. D. de M. em C. de Q. e T. dos A. apresentada à F. de F. da, & Lisboa, U. de L. (2010). *Universidade de Lisboa. Biologia* (Vol. I).

Renwick, A.G. (1986). *Xenobiotica*. 16:1057–1071.

- Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., Snodin, D.J.(2000). *Food Chem Toxicol* 38(Supplement 2):31–41
- Scheurer, M., Brauch, H. J., & Lange, F. T. (2009). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1585–1594.
- Spoelstra, J., Schiff, S. L., & Brown, S. J. (2013). *PLoS ONE*, 8(12).
- Scheurer, M., Storck, F.R., Brauch, H.J., Lange, F.T. (2010). *Water Res.* 44:3573–3584.
- Scheurer, M., Brauch, H.J., Lange, F.T. (2010). *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1585–1594.
- Scheurer, M., Godejohann, M., Wick, A., Happel, O., Ternes, T., Brauch, H.J., Ruck, W., Lange, F.T.(2011). *Environ Sci Pollut Res Int.*
- Schiffman, S.S; Gatlin, C.A. (1993). *Neurosci Biobehav. Rev* 17:313–345.
- Schmid, T.S., Singer, H., Longree, P., Bader, H.P., Scheidegger, R., Wittmer, A., Andersson, J.C.M. (2010). *Sci Total Environ.* 408:3261–3269.
- Simintzi, I., Schulpis, K.H., Angelogianni, P., Liapi, C., Tsakiris, S. (2007). *Pharmacol Res* 56:155–159.
- Strubig, W. (1988). *Oralprophylaxe.* 10:68–73.
- Soh, L., Connors, K.A., Brooks, B.W. (2011). *Environ. Sci. Technol.* 45 (4), 1363–1369.
- Thurman, E.M., *PLoS ONE* (2010).
- Tran, N. H., Hu, J., & Ong, S. L. (2013). *Talanta*, 113, 82–92.
- Van Stempvoort, D.R., Roy, J.W., Brown, S.J., Bickerton, G. (2011a). *J Hydrol* 401:126–133.
- Van Stempvoort, D.R., Robertson, W.D., Brown, S.J. (2011b). *Ground Water Monit Remediat.* 31:95–102.
- Weihrauch, M.R., Diehl, V. (2004). *Ann Oncol.* 15:1460–1465.
- Yang, X.Y., Chong, Y., Yan, A.X., Chen, J.C. (2011). *Food Chem.* 128:653–658.