



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Pedro Samuel Vieira Pires

DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES
EM BIVALVES: UMA REVISÃO DO ESTADO DA ARTE

Dissertação no âmbito do Mestrado de Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e
coorientada pela Professora Doutora Lílina João Gatões Silva e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Pedro Samuel Vieira Pires

**DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO
ESTEROIDES EM BIVALVES: UMA REVISÃO DO
ESTADO DA ARTE**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientada pela Professora Doutora Liliana João Gatões Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2022

AGRADECIMENTOS

Volvidos 6 anos na Universidade de Coimbra, chego à reta final do meu percurso académico escrevendo esta dissertação como prova final. Tanto o meu percurso como esta dissertação não teriam sido possíveis sem as seguintes pessoas e entidades às quais deixo a minha sincera gratidão.

À Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e à Professora Doutora Liliana João Gatões da Silva por aceitarem serem minhas orientadoras, pela colaboração, conhecimento e disponibilidade que me deram apesar de todas as dificuldades e contratemplos.

À minha namorada Rita, que me conhece melhor que ninguém, por todo o caminho que me ajudou a percorrer e por nunca me ter deixado desistir, estando lá sempre para mim.

À minha mãe, pai, irmão e avó por sempre acreditarem em mim, apoiando-me em tudo o que precisava tanto financeiramente como emocionalmente bem como às minhas tias pelas palavras de força e coragem. Espero deixar-vos orgulhosos.

Aos meus amigos e colegas, tanto de licenciatura como de mestrado, pelos momentos de desabafo, entreaajuda e camaradagem. Entre todos os amigos e conhecidos que fiz ao longo deste longo percurso, um especial agradecimento ao João Reis, Bruno Costa, Gonçalo Pereira, João Sousa, Ricardo Carvalho, Cátia Torres, Inês Oliveira, João Monteiro, Diogo Gomes, João Robalo, Rita Barata e Maria João.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, onde tive o prazer de frequentar o Mestrado em Segurança Alimentar e me disponibilizou todas as condições e meios para a realização desta dissertação.

A Coimbra, cidade da saudade que me viu nascer e que fará sempre parte de mim.

A todos, um Obrigado!

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ACN – Acetonitrilo

AS – Ácido Salicílico

ASE – Extração Acelerada de Solvente

BCF – Fator de Bioconcentração

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CEC – Contaminantes de Preocupação Emergente

COX – *Cyclooxygenase* / Ciclo-oxigenase

DAD – Detetor de Fotodíodos

DE – Desregulador Endócrino

DIC – Diclofenac

DPR – Desvio Padrão Relativo

dSPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva

EMA – Agência Europeia do Medicamento

ESI – Ionização por *Electrospray*

EtOH – Etanol

FUSLE – Extração Sólida-Líquida Focalizada por Ultrassons

GC – Cromatografia Gasosa

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

HESI – Ionização por *Electrospray* aquecida

HPLC – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

IBU – Ibuprofeno

IMS – Estatísticas Médicas Intercontinentais

INE – Instituto Nacional de Estatística

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

KET – Cetoprofeno

LC – Cromatografia Líquida

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em tandem

LOD – Limite de Detecção

Log K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LOQ – Limite de Quantificação

MA – Ácido Mefenâmico

MAME – Extração Micelar Assistida por Micro-ondas

ME – Efeito Matriz

MeOH – Metanol

MRM – Monitorização de Reações Múltiplas

MS – Espectrometria de Massa

MUH – Medicamento de Uso Humano

MUV – Medicamento de Uso Veterinário

NAP – Naproxeno

NSAID – Anti-Inflamatórios Não Esteroides

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Economico

PAR – Paracetamol

PG – Prostaglandina

PHE – Fenazona

pKa – Constante de Dissociação Ácida

PPCP – Fármacos e Produtos de Uso Pessoal

PRO-PHE – Propifenazona

QqLIT – Quadrupolo Linear IT

QqQ – Analisador de Massa Triplo Quadrupolo

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

SLE – Extração Sólida-Líquida

SNS – Sistema Nacional de Saúde

SPE – Extração em Fase Sólida

SRM – Monitorização de Reações Seleccionadas

TXA – Tromboxano A

UE – União Europeia

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massa em tandem

RESUMO

Nos últimos anos, e devido ao avanço nas metodologias analíticas, têm sido reportadas substâncias químicas denominadas contaminantes de preocupação emergente (CECs) em diversas matrizes ambientais. Estes micropoluentes antropogênicos são detetados, em níveis residuais, que podem variar entre os nanogramas e os microgramas por litro, representando uma ameaça ecotoxicológica para os sistemas aquáticos.

Os fármacos são considerados CECs sendo o grupo farmacoterapêutico dos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) um dos mais prescritos e utilizados, bem como um dos mais detetados no ambiente aquático.

Os bivalves apresentam diversos benefícios como género alimentício, mas também como espécie bioindicadora. Estas características levam a que esta classe de moluscos seja considerada uma matriz ideal para avaliar a extensão da problemática dos fármacos, tanto numa vertente ecotoxicológica, como de segurança alimentar. Assim, o controlo destes resíduos em bivalves, é de extrema importância, de modo a salvaguardar a saúde ambiental e a saúde pública, assegurando também a segurança alimentar.

A presente dissertação tem como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica relativa aos NSAIDs em bivalves, nomeadamente, o seu consumo, características físico-químicas e mecanismos de ação; a sua ocorrência ambiental no meio aquático e na biota aquática; os seus efeitos no ecossistema e o enquadramento legal. Relativamente às metodologias analíticas para a determinação de anti-inflamatórios em bivalves, esta dissertação também revê as diferentes técnicas mais utilizadas na extração, purificação e análise instrumental deste tipo de amostras, bem como os parâmetros de validação a verificar nas metodologias a aplicar.

Palavras-chave: Bivalves; Bioindicadores; Fármacos; Anti-inflamatórios não Esteroides; Consumo; Ocorrência; Metodologias Analíticas.

ABSTRACT

In recent years, and due to advances in analytical methodologies, contaminants of emerging concern (CECs) have been reported in several environmental matrices. These anthropogenic micropollutants are detected at residual levels varying between nanograms and micrograms per litre, representing an ecotoxicological threat to aquatic systems.

Pharmaceuticals are considered CECs and the pharmacotherapeutic group of non-steroidal anti-inflammatories (NSAIDs) is one of the most prescribed and used, as well as one of the most detected in the aquatic environment.

Bivalves have several benefits as a foodstuff, but also as a bioindicator species. These characteristics lead to this class of molluscs being considered an ideal matrix to assess the extent of this problem, both in an ecotoxicological and food safety aspect. Thus, the control of these residues in bivalves is extremely important, in order to safeguard environmental and public health, also ensuring food safety.

This dissertation aims to carry out a literature review on NSAIDs in bivalves, namely, their consumption, physicochemical characteristics and mechanisms of action; its environmental occurrence in the aquatic environment and aquatic biota; its effects on the ecosystem and the legal framework. Regarding the analytical methodologies for the determination of anti-inflammatories in bivalves, this dissertation also reviews the most used different techniques in the extraction, purification and instrumental analysis steps, as well as the validation parameters to be verified in the methodologies to be applied.

Keywords: Bivalves; Bioindicators; Pharmaceuticals; non-steroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals; Consumption; Occurrence; Analytical Methodologies.

Índice

AGRADECIMENTOS	ii
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E EQUAÇÕES.....	ix
1. Bivalves	1
1.1. Como Género Alimentício	1
1.2. Segurança Alimentar	3
1.3. Como Bioindicadores de Contaminação Ambiental	3
2. Contaminantes de Preocupação Emergente	4
3. Fármacos	6
3.1. Consumo	7
3.2. Características Físico-Químicas	7
3.3. Fontes Emissoras, Disseminação e Destino Ambiental	8
3.4. Estações de Tratamento de Águas Residuais.....	10
4. Anti-Inflamatórios não Esteroides.....	11
4.1. Consumo.....	12
4.2. Características Físico-Químicas	13
4.3. Mecanismos de Ação	15
5. Ocorrência Ambiental de Anti-Inflamatórios Não Esteroides	17
5.1. Meio Aquático.....	17
5.2. Biota Aquática	21
6. Efeitos dos Anti-Inflamatórios não Esteroides no Ecossistema.....	23
7. Enquadramento Legal	24
8. Metodologias analíticas para a determinação de anti-inflamatórios em bivalves	26
8.1. Preparação das Amostras	37
8.1.1. Pré-tratamento.....	37
8.1.2. Extração.....	38
8.1.3. Purificação	41
8.2. Análise Instrumental	44
8.2.1. Cromatografia	45
8.2.2. Detetores	49
8.3. Eficiência Analítica	50
8.3.1. Linearidade e Curva de Calibração	51
8.3.2. Limites Analíticos.....	52
8.3.3. Precisão e Exatidão	53

8.3.4. Seletividade	56
8.3.5. Efeito de Matriz.....	57
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E EQUAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma representativo das fontes emissoras, das vias de disseminação e qual o destino dos fármacos no ambiente	10
Figura 2 – Mecanismo de ação geral dos NSAIDs, onde ocorre a inibição das COX 1 e/ou COX 2 e consequente supressão da produção das PGs	16
Figura 3 – Fluxograma das etapas que se devem seguir no desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de fármacos em matrizes da biota aquática	26
Figura 4 – Esquema das etapas na SPE.....	42
Figura 5 – Esquema representativo dos componentes típicos de um sistema HPLC	47
Figura 6 – Esquema que relaciona a exatidão e a precisão.....	56
Tabela 1 – Valores representativos da composição dietética de algumas espécies de bivalves por 100 g crus da parte edível	2
Tabela 2 – Designação, número CAS, fórmula química e molecular, peso molecular, log Kow, pKA e solubilidade dos principais NSAIDs.	13
Tabela 3 – Concentrações médias e máximas (em µg/L) dos NSAIDs detetados ubiquamente nas cinco regiões definidas pela ONU.....	18
Tabela 4 – Ocorrência de NSAIDs em diferentes locais nos vários corpos aquáticos.	19
Tabela 5 – Ocorrência de NSAIDs, em diferentes locais, em várias espécies de bivalves.	22
Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs	28
Tabela 7 – Compilação de diferentes técnicas analíticas e respetivas condições na determinação analítica de NSAIDs em bivalves.....	33
Tabela 8 – Condições da SPE da bibliografia revista.....	43
Equação 1 – Limite de Detecção (LOD).....	53
Equação 2 – Limite de Quantificação (LOQ)	53
Equação 3 – Desvio Padrão Relativo (DPR %).....	54
Equação 4 – Erro (%).....	55
Equação 5 – Recuperação (%).....	55
Equação 6 – Efeito Matriz (%)	57

I. Bivalves

Bivalvia ou bivalves, como são normalmente intituladas as espécies pertencentes a este grupo, são uma classe do filo Mollusca (segundo maior filo do reino animal) à qual pertencem exclusivamente organismos aquáticos (na maioria marinhos) e que têm como característica comum uma concha formada por duas valvas que se articulam dorsalmente e protegem os moluscos. Os principais grupos desta classe incluem mexilhões, amêijoas, berbigão, vieiras e ostras (Gosling, 2003).

A maioria das espécies de bivalves são consideradas ecologicamente importantes (Serra-Compte *et al.*, 2018). São abundantes (alta densidade populacional) e estão amplamente distribuídos por diferentes habitats, sendo espécies sésseis com um longo período de vida, o que permite que sejam facilmente capturadas (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015).

Os moluscos bivalves respiram e alimentam-se filtrando largas quantidades de água, sendo filtradores altamente eficientes. No entanto, os bivalves não têm capacidade de filtrar seletivamente partículas de alimento (principalmente fitoplâncton e zooplâncton) presentes na coluna de água, o que leva a que bioacumulem e bioconcentrem nos seus tecidos diversos tipos de substâncias também presentes na coluna de água, entre as quais se encontram vários tipos de contaminantes como os fármacos e os compostos farmacologicamente ativos (apenas referidos como fármacos daqui para a frente) (Iwamoto *et al.*, 2010).

I.1. Como Género Alimentício

Os bivalves são um produto alimentar bastante consumido em todo o mundo apresentando elevado valor comercial, mas também alto valor nutricional, fazendo parte da dieta do Homem há milhares de anos.

O consumo deste género alimentício está associado a múltiplos benefícios, como sejam um bom desenvolvimento neuronal e a diminuição da ocorrência de patologias cardiovasculares (Ruxton *et al.*, 2004). Estes benefícios devem-se à sua composição nutricional (Tabela 1). Nomeadamente um elevado teor proteico, nutrientes vitais como vitamina A e B₁₂ e minerais como o potássio (K), o sódio (Na) e o fósforo (P), mas também ácidos gordos polinsaturados essenciais entre os quais ómega-3 (Tan *et al.*, 2020; Yaghubi *et al.*, 2021).

Tabela I – Valores representativos da composição dietética de algumas espécies de bivalves por 100 g crus da parte edível. (Adaptados da Tabela da constituição dos alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)).

Bivalve	Mexilhão	Ostra	Amêijoia	Vieiras	Berbigão
Energia (kcal)	70	65	65	83	59
Hidratos de Carbono (g)	2	3,9	2,6	0	2,7
Ácidos gordos saturados (g)	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1
Ácidos gordos polinsaturados (g)	0,5	0,5	0,2	0,3	0,3
Proteínas (g)	12,1	8,6	11,7	18,5	10,5
Vitaminas					
A	360	85	97	4	0
B6 (mg)	0,08	0,13	0,04	0,09	0,04
B12 (µg)	19	14	37	2,9	41
Minerais					
Ca (mg)	56	66	51	-	56
Fe (mg)	3,5	8	8,5	1,5	5,9
Mg (mg)	36	36	100	29	58
P (mg)	240	140	180	230	160
K (mg)	280	260	78	320	62
Na (mg)	290	370	240	160	380
Zn (mg)	4,1	91	2,1	1,6	1,1
Colesterol (mg)	40	53	44	-	30

Legenda: Ca – cálcio; Fe – ferro; K – potássio; Mg – magnésio; Na – sódio; P – fósforo; Zn – zinco.

São várias as espécies de bivalves que fazem parte da nossa dieta como por exemplo mexilhões, tal como o Mexilhão-comum (*Mytilus edulis*) e o Mexilhão-do-Mediterrâneo (*Mytilus galloprovincialis*), ostras como a ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*), amêijoas como a amêijoia-branca (*Spisula solida*), o “pé-de-burrinho” (*Chamelea gallina*) ou a amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*), vieiras (*Pecten maximus*) e berbigão (*Cerastoderma edule*), sendo todas elas espécies altamente consumidas em Portugal, e portanto de alto valor comercial.

De acordo com a publicação do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2020) relativa às estatísticas da pesca de 2019, mais concretamente referente aos dados da moluscicultura (cultura de moluscos bivalves), foram produzidas cerca de 9381 toneladas de bivalves em Portugal traduzindo-se em vendas para os mercados nacionais e internacionais de aproximadamente 60758 mil euros.

1.2. Segurança Alimentar

Apesar dos benefícios como género alimentício, estes alimentos podem representar um elevado risco para a saúde pública em termos de segurança alimentar. De facto, vários tipos de bivalves como os mencionados em cima, são consideradas vetores de transmissão de doenças de origem alimentar (Iwamoto *et al.*, 2010).

O facto de os bivalves se alimentarem e respirarem por filtração implica que estes acumulem e concentrem nos seus tecidos várias substâncias presentes na coluna de água. Entre estas substâncias podemos encontrar contaminantes biológicos de origem natural como bactérias e vírus patogénicos (ex: *Escherichia coli* e norovírus) (Lowther *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2018) ou biotoxinas marinhas (compostos químicos produzidos por algas), mas também diversos tipos de contaminantes químicos sintéticos como, entre outros, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dioxinas, bifenilos policlorados e também fármacos (Anacleto *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Maskrey *et al.*, 2021).

Os impactos na saúde pública podem ser diretos, derivados do consumo de bivalves contaminados com fármacos a concentrações de risco podendo haver reações alérgicas; ou indiretos, podendo ocorrer desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Maskrey *et al.*, 2021).

Outra das problemáticas associadas ao consumo de bivalves é o facto de, após serem cozinhados, haver um aumento dos resíduos de fármacos nos seus tecidos e também na água em que foram cozinhados, tal como demonstrou McEneff *et al.*, (2013) em mexilhões.

1.3. Como Bioindicadores de Contaminação Ambiental

Um bioindicador define-se como um organismo ou microrganismo (animais, plantas ou plâncton) que é utilizado para monitorizar o estado dos ecossistemas naturais, bem como as possíveis alterações (positivas ou negativas) a que o ambiente está sujeito e que, consequentemente, podem afetar o Homem (Parmar *et al.*, 2016).

Como acima mencionado, os bivalves assimilam, principalmente na glândula digestiva e nas brânquias, diversos tipos de substâncias presentes na coluna de água (McEneff *et al.*, 2013), entre as quais se destacam contaminantes como os fármacos que vão ser bioacumulados e bioconcentrados por estes moluscos. Esta característica aliada à sua ampla distribuição e alta densidade populacional, bem como à sua elevada tolerância às diferentes condições ambientais que os bivalves apresentam, tornam-nos excelentes bioindicadores de vários tipos de

contaminantes (Almeida *et al.*, 2020), nomeadamente de fármacos (Álvarez-Muñoz *et al.*, 2015), sendo representativos das condições a que estão sujeitos no seu habitat.

Há então uma bioacumulação e bioconcentração de fármacos nos bivalves, mas também de compostos ativos associados a estes como os metabolitos e produtos de degradação (Loos *et al.*, 2010). Bioacumulação define-se como a absorção de substâncias presentes no ambiente por um organismo, havendo uma acumulação destas ao longo do tempo (Zenker *et al.*, 2014).

No caso dos organismos aquáticos como os bivalves, a acumulação de determinada substância é designada por bioconcentração e depende de um factor inerente à substância, o *bioconcentration factor* (BCF). O BCF é o rácio entre a concentração da substância no organismo e a concentração na água (Zenker *et al.*, 2014).

Existem vários estudos de bioconcentração de fármacos (Almeida *et al.*, 2020; Contardo-Jara *et al.*, 2011). Estes estudos avaliam a acumulação destes micropoluentes em condições laboratoriais bem-definidas e controladas, permitindo avaliar o seu comportamento, impacto ambiental e os potenciais riscos que estes apresentam tanto para os organismos aquáticos, nomeadamente para os bivalves, como para os seus consumidores.

Outro conceito associado à bioacumulação é a biomagnificação, que consiste na transferência de substâncias xenobióticas (que foram acumuladas) entre os organismos ao longo dos níveis tróficos sucessivos da cadeia alimentar. Na biomagnificação há um aumento significativo da concentração encontrada no organismo para que é transferida a substância (Zenker *et al.*, 2014).

O facto de os bivalves serem considerados bons bioindicadores faz com que sejam utilizados em vários estudos de biomonitorização de contaminantes nos meios aquáticos. De realçar o *Mussel Watch Program* que é um programa levado a cabo por várias agências para monitorizar a concentração de contaminantes (Maruya *et al.*, 2014) em espécies bivalves presentes nas zonas costeiras dos Estados Unidos da América (Li *et al.*, 2016).

2. Contaminantes de Preocupação Emergente

Nos últimos 20 anos têm sido várias as publicações referentes à ocorrência e aos efeitos ecológicos dos contaminantes de preocupação emergente (CECs) (Noguera-Oviedo e Aga, 2016). Fazem parte destas substâncias químicas poluentes diferentes tipos de compostos utilizados tanto em atividades humanas como em atividades industriais.

Os CECs são então compostos químicos que têm, na sua maioria, origem antropogénica. Entre alguns dos CECs mais conhecidos e detetados destacam-se os fármacos e os produtos de uso pessoal (PPCPs), bem como os seus metabolitos e produtos de degradação, algumas drogas ilegais e de abuso, genes de resistência a antibióticos (origem natural) e compostos capazes de interferir com o normal funcionamento do sistema endócrino como os desreguladores endócrinos (DEs) e os retardadores de chama (Noguera-Oviedo e Aga, 2016; Núñez *et al.*, 2017).

Estas substâncias poluentes têm sido detetadas e caracterizadas em vários ambientes aquáticos, entre os quais se destacam as águas residuais e as águas de superfície como revisto por Noguera-Oviedo e Aga (2016) e por Petrie, Barden e Kasprzyk-Hordern (2015). São também detetadas em diferentes tecidos de vários animais pertencentes à biota aquática como peixes (em vários tecidos), bivalves, crustáceos e outras espécies de invertebrados aquáticos (Álvarez-Ruiz e Picó, 2020).

A deteção de CECs que tem ocorrido nas últimas duas décadas em matrizes ambientais está diretamente associada à evolução de metodologias analíticas sensíveis que serão mais à frente mencionadas. Os CECs são detetados a concentrações relativamente baixas que podem variar entre as nanogramas por litros (ng/L) e as microgramas por litros (µg/L) (Noguera-Oviedo e Aga, 2016). No entanto, o facto de terem capacidade de se bioacumular, persistir e até biomagnificar na biota aquática, leva a que haja um acréscimo na preocupação e consciencialização à volta destes contaminantes. A esta problemática estão associados riscos e potenciais efeitos adversos para a saúde pública (quando os homens consomem biota contaminada), para a própria biota e para o meio ambiente (Álvarez-Ruiz e Picó, 2020; Maskrey *et al.*, 2021).

Apesar das problemáticas que representam, os regulamentos que restringem os CECs são ainda algo restritos e não estabelecem limites legais (Pereira *et al.*, 2020). Apenas em 2013 e com a Diretiva 2013/39/EU (que será abordada mais à frente) surgiu o primeiro ato legislativo relativo aos CECs, sendo que até então, não havia qualquer regulação relacionada a estes contaminantes, não fazendo parte de programas de monitorização do tratamento de águas (Zenker *et al.*, 2014).

Dentro dos CECs referidos anteriormente, o grupo dos fármacos é considerado por vários autores como o que apresenta maior e crescente preocupação (Pavlović *et al.*, 2007).

3. Fármacos

Os fármacos e os produtos farmacêuticos desempenham um papel fundamental na nossa sociedade proporcionando a prevenção, controlo e tratamento de diversas doenças, bem como o alívio sintomático destas, o que resulta numa melhor qualidade e esperança de vida. O principal objetivo destes é provocar, em baixas concentrações, um efeito biológico específico e benéfico nos cuidados de saúde em animais e humanos, bem como na atividade pecuária (Cueva-Mestanza *et al.*, 2008; Mezzelani *et al.*, 2018). No entanto, são considerados uma ameaça para os ecossistemas, para os organismos que neles habitam e, em última análise, à saúde pública (Santos *et al.*, 2010).

A preocupação com os riscos e impactos a que os fármacos podem conduzir deve-se a algumas características inerentes aos mesmos como (Rodrigues *et al.*, 2019; Zenker *et al.*, 2014):

- as suas propriedades físico-químicas;
- a sua atividade biológica;
- alta lipossolubilidade;
- o seu consumo;
- a sua ubiquidade;
- a sua remoção incompleta nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs).

Estes contaminantes químicos foram detetados pela primeira vez nos finais dos anos 70 em águas residuais tratadas contaminadas com ácido clofíbrico, ácido salicílico (AS) e metabolitos de clofibrato (Mezzelani *et al.*, 2018).

Os fármacos, para além de contaminantes químicos, são também considerados CECs “pseudo-persistentes” pois, para além do facto de as taxas de transformação e de remoção nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) serem bastante variáveis e muitas vezes baixas ou nulas, são constantemente introduzidos nos ambientes aquáticos (principalmente por atividades antropogénicas) onde podem permanecer durante longos períodos (Pereira *et al.*, 2016).

Existem diversos grupos farmacológicos (dependendo das finalidades terapêuticas) que diferem principalmente na sua estrutura química. Destacam-se alguns grupos como o dos antibióticos, antipsicóticos, anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), analgésicos, tranquilizantes, bloqueadores β , diuréticos e hormonas (que também são DEs), entre outros (Álvarez-Muñoz *et al.*, 2015 a,b).

3.1. Consumo

O consumo de fármacos, tanto para uso veterinário (MUV) como para uso humano (MUH), tem vindo a aumentar de ano para ano, sendo amplamente consumidos a nível mundial (Pereira *et al.*, 2020a). O facto do mercado farmacêutico estar em constante expansão, bem como o aumento da necessidade de fármacos destinados ao tratamento de doenças crónicas e doenças associadas ao envelhecimento está na base deste consumo crescente (González Peña *et al.*, 2021).

Apesar de vários países terem disponíveis dados relativos ao consumo de fármacos, estes são muitas vezes inadequados e insuficientes para estimar os verdadeiros padrões de consumo que ocorrem em cada país (Patel *et al.*, 2019). Uma agravante a esta situação é o facto de muitos dos produtos farmacêuticos não precisarem de qualquer tipo de receita médica, sendo de venda livre (*over the counter medicines*), o que se reflete numa maior incerteza no real consumo de fármacos. No entanto, de acordo com uma estimativa realizada em 2015 pelo IMS *Institute for Healthcare Informatics*, em 2020 seriam consumidos globalmente cerca de 4,5 triliões de doses de fármacos (mais 24% do que em 2015) refletindo-se em gastos de cerca de 1,4 triliões de dólares nos mesmos (mais 29-32% do que em 2015).

Espera-se então que haja cada vez mais uma maior utilização de fármacos e associado a este fenómeno, está o inevitável aumento da presença dos mesmos no ambiente, com especial destaque para o ambiente aquático. Isto levanta cada vez mais uma maior preocupação dentro da comunidade científica uma vez que o consumo de fármacos, a par das suas taxas de excreção, apresenta-se como uma das fontes primárias de exposição destes contaminantes aos ambientes aquáticos (Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

O consumo de cada um dos fármacos é, na maioria dos casos, representativo da sua presença no ambiente, havendo uma correlação entre a quantidade de fármacos consumidos por ano (em kg) com a extensão da contaminação ambiental. Esta correlação permite apontar quais os fármacos que representam mais riscos em termos ambientais bem como os grupos terapêuticos sobre os quais devem incidir mais estudos de ocorrência e de toxicidade (Pereira *et al.*, 2020a).

3.2. Características Físico-Químicas

As características físico-químicas dos diferentes fármacos, metabolitos e produtos de degradação, bem como as características do meio aquático em que são depositados (p.e. o pH e a temperatura), determinam o destino e a sua persistência no ambiente aquático (Pereira *et*

al., 2020). Por outro lado, são essas características que podem determinar como os fármacos se vão bioacumular nos diferentes organismos da biota aquática (Serra-Compte *et al.*, 2018).

Alguns exemplos dessas características intrínsecas aos fármacos são o coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{OW}$), a constante de dissociação ácida (pKa), a volatilidade, a polaridade e a solubilidade em água. O $\log K_{OW}$ é um indicador da capacidade de dissolução dos compostos em lípidos (lipossolubilidade), e um valor baixo deste coeficiente indica que um composto é solúvel em água (Pavlović *et al.*, 2007). Este é um dos parâmetros mais utilizados para estabelecer o potencial da bioconcentração de contaminantes como os fármacos nos organismos (Serra-Compte *et al.*, 2018). O pKa de um determinado fármaco indica o quão forte é este como ácido e corresponde ao pH em que 50% do fármaco é ionizado (Cairns, 2012). Os valores de pKa dos fármacos apresentam uma grande variabilidade (Mompelat *et al.*, 2009) e esta constante desempenha um papel importante na sorção (absorção e adsorção) destas substâncias (Patel *et al.*, 2019).

Relativamente à volatilidade, polaridade e solubilidade em água, os fármacos são, na sua globalidade, compostos com baixa volatilidade, polares ou hidrofílicos e solúveis em água (Mompelat *et al.*, 2009).

Apesar das propriedades dos diferentes fármacos variarem bastante, quase todos têm uma elevada solubilidade e, portanto, o potencial de contaminar os ambientes aquáticos (Pereira *et al.*, 2020).

3.3. Fontes Emissoras, Disseminação e Destino Ambiental

São várias as fontes emissoras de fármacos, sendo que a excreção humana da forma original e inalterada, bem como na forma metabolizada dos fármacos assume o papel mais relevante como principal fonte de contaminação ambiental (Santos *et al.*, 2010). Os fármacos, após serem consumidos, sofrem um processo de metabolização antes de serem excretados e estes compostos (metabolizados ou não) são depois libertados diretamente para o ambiente (Patel *et al.*, 2019).

Estudar os metabolitos dos vários fármacos é portanto extremamente relevante, assim como os produtos de degradação que resultam dos vários processos de degradação decorrentes dos tratamentos utilizados nas ETARs. Estes processos podem ser tanto abióticos (hidrólise ou fotólise) como bióticos (biotransformação por bactérias e fungos) e levam a que os compostos mencionados assumam diferentes formas químicas, propriedades farmacológicas e níveis desconhecidos de toxicidade (Nunes *et al.*, 2020).

A metabolização dos fármacos consiste na bioconversão destes em compostos mais polares e que sejam mais fáceis de excretar (metabolitos). Esta conversão em metabolitos acontece em duas fases distintas, sendo que na primeira ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise e na segunda obtém-se os metabolitos por conjugação (Santos *et al.*, 2010).

As taxas de excreção, tanto dos fármacos como dos seus metabolitos, influenciam o impacto ambiental que estes vão ter e quão frequentemente vão ser detetados no meio aquático (Pereira *et al.*, 2020a). As taxas variam bastante entre os grupos farmacológicos e há alguma discrepância, quantos aos seus valores dentro do mesmo fármaco. De acordo com a revisão de Pereira *et al.*, 2020a, as taxas de excreção de alguns anti-inflamatórios apresentam valores entre menos de 1% e 80%.

Contudo, para além da excreção através da urina e das fezes após a utilização de fármacos, existem outras fontes antropogénicas de fármacos. Destaca-se a eliminação incorreta dos fármacos não utilizados ou que se encontrem fora de validade, em contexto doméstico. Esta eliminação ocorre através da deposição direta para os sistemas de saneamento chegando às ETARs, ou através dos lixos urbanos que chegam eventualmente aos aterros sanitários onde pode ocorrer vazamento dos fármacos para os corpos aquáticos (Santos *et al.*, 2010). Por outro lado, as descargas não controladas, bem como os efluentes resultantes das atividades das indústrias farmacêuticas são também possíveis fontes emissoras de fármacos para o ambiente aquático.

Também as atividades agropecuárias e de aquacultura são responsáveis pela presença ubíqua dos fármacos no ambiente, seja pela sua libertação direta devido à aplicação destes na aquacultura (principalmente antibióticos); mas também indiretamente através da sua aplicação como MUV em animais de gado (excretados por estes) e ao escoamento e lixiviação que pode ocorrer nos campos fertilizados com lamas ativadas das ETARs (às quais podem estar adsorvidos fármacos) e com o estrume dos animais em questão (Mompelat *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). As lamas aplicadas como fertilizantes aos campos agrícolas podem então libertar fármacos tanto para as águas subterrâneas como para as águas de superfície (Patel *et al.*, 2019).

Após serem descarregadas como efluentes das ETARs, o destino mais provável dos fármacos são as águas de superfície entre as quais se incluem corpos aquáticos como rios, mares, lagos, estuários, entre outros. A partir das águas de superfície chegam às águas subterrâneas e eventualmente à água potável.

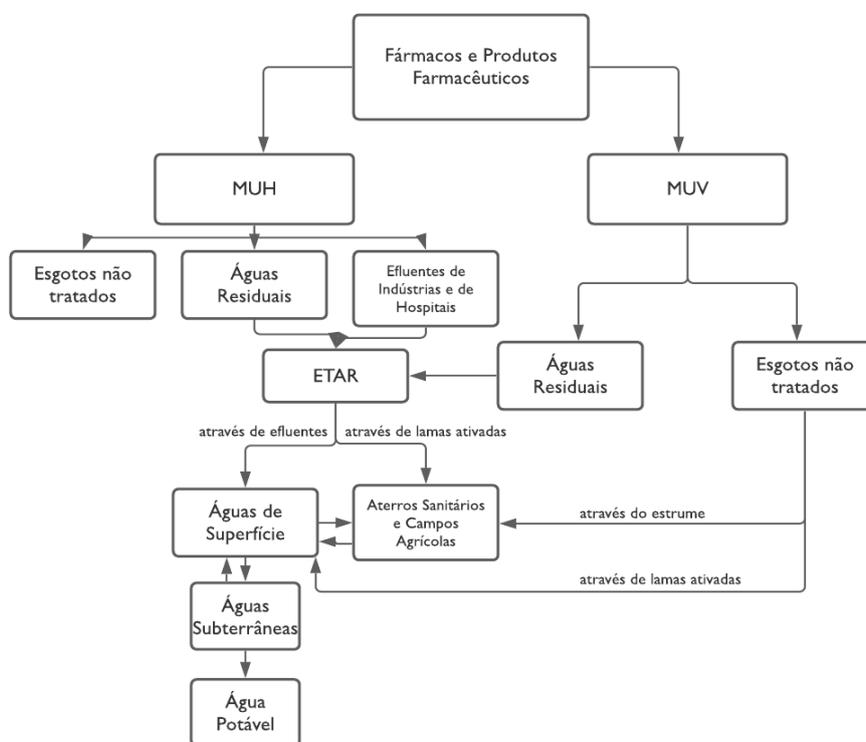


Figura 1 – Fluxograma representativo das fontes emissoras, das vias de disseminação e qual o destino dos fármacos no ambiente. (Adaptado de Santos *et al.*, 2010).

3.4. Estações de Tratamento de Águas Residuais

Tal como referido anteriormente, algumas das fontes emissoras de fármacos (com destaque para os efluentes domésticos) levam a que estes cheguem às ETARs através das redes de saneamento, sendo estas consideradas a principal via de contaminação farmacêutica do ambiente aquático. As descargas de efluentes das ETARs (águas residuais “tratadas”) representam a principal via de emissão dos fármacos, metabolitos e produtos de degradação para o ambiente aquático (aus der Beek *et al.*, 2016) uma vez que, os tratamentos aplicados nas ETARs não têm capacidade de remover completamente estes compostos, até porque estas não foram projetadas com esse intuito (Patel *et al.*, 2019).

De facto, as taxas de remoção de fármacos nas ETARs são muito variáveis, podendo mesmo ser baixas ou nulas e são, por norma, avaliadas comparando as concentrações registadas nos afluentes e nos efluentes das ETARs (Santos *et al.*, 2010). As concentrações presentes nestes e, conseqüentemente, as taxas de remoção, dependem de inúmeras

condições. Algumas destas condições são o tipo de tecnologia usada e o tipo de tratamento aplicado na ETAR, as condições operacionais como o tempo de retenção hidráulico e o tempo de retenção dos sólidos (quanto maior for o tempo de retenção maior será a decomposição dos fármacos e outros micropoluentes), as temperaturas ambientais e outras variações sazonais, o pH e também as características físico-químicas inerentes aos fármacos previamente referidas (Pereira *et al.*, 2020a).

Podem ser aplicados 4 tipos de tratamento numa ETAR (ADNORTE): tratamento preliminar em que ocorre a filtração e separação das águas residuais; tratamento primário onde as águas residuais são decantadas e as partículas sólidas são eliminadas por ação da gravidade; tratamento secundário que está associada a um tratamento biológico (biodegradação microbiológica aeróbia e anaeróbia de bactérias e outros microrganismos) seguido de uma segunda decantação, o que leva ao depósito das lamas ativadas; e o tratamento terciário onde ocorre a desinfecção e a remoção dos sólidos em suspensão entre os quais estão incluídos compostos tóxicos como os fármacos. Por norma, os dois primeiros tratamentos mencionados são ineficazes na remoção dos fármacos e apenas no tratamento secundário estes começam a ser removidos. Esta remoção deve-se a dois mecanismos: a sorção dos fármacos pelas lamas ativadas e a degradação microbiológica destes (Pereira *et al.*, 2020a).

Quanto ao tratamento terciário, têm sido aplicadas novas tecnologias em algumas ETARs (não convencionais) com eficiências de remoção dos fármacos elevadas e superiores aos tratamentos tradicionais. Destacam-se processos de oxidação avançada, radiação ultravioleta (UV), ozonização e adsorção utilizando carvão ativado. No entanto, a estas tecnologias mais modernas, estão associados altos custos energéticos e de manutenção, bem como construções de alta qualidade o que leva a que apenas sejam utilizados em algumas ETARs de alguns países (Patel *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2020a).

4. Anti-Inflamatórios não Esteroides

Os NSAIDs são um grupo farmacológico bastante diverso com características químicas bastante diferentes, mas com propriedades terapêuticas comuns. Apesar da sua eficácia comprovada, têm alguns efeitos adversos, nomeadamente a nível gastrointestinal, cardíaco e renal (Zenker *et al.*, 2014).

O primeiro NSAID foi desenvolvido por Felix Hoffman, em 1897 (na empresa alemã Bayer) que a partir do AS formulou o ácido acetilsalicílico (AAS), vulgarmente designado como aspirina (Vane e Botting, 2003). Desde então, vários NSAIDs têm sido produzidos, sendo este um dos grupos farmacológicos mais prescritos e consumidos na medicina moderna. Destacam-

-se o ibuprofeno (IBU), o diclofenac (DIC), o naproxeno (NAP), o cetoprofeno (KET) e a fenazona (PHE) como alguns dos mais prevalentes.

No geral, o uso de NSAIDs está associado ao tratamento de diversas condições inflamatórias incluindo doenças crónicas como reumatismo e osteoartrite (Praveen Rao e Knaus, 2008), mas também no tratamento da dor e outro tipo de condições como febre, dores de cabeça e outro tipo de doenças devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (Conaghan, 2012). O AAS, para além de ser utilizado como NSAID, é também consumido em baixas doses, como inibidor da agregação plaquetária, reduzindo os riscos associados a doenças cardiovasculares.

Devido às suas propriedades farmacológicas, os NSAIDs são um dos grupos farmacológicos mais consumidos a nível mundial (Conaghan, 2012) e associado a este consumo está também a sua presença no ambiente aquático. De facto, vários estudos reportam a presença ambiental dos diferentes fármacos deste grupo (Tabela 4 e Tabela 5), estando entre os fármacos mais detetados em ambientes aquáticos (Moreno-González *et al.*, 2015).

São então um dos grupos mais estudados em termos ecotoxicológicos e a necessidade de estudar este grupo prende-se com o facto de apresentarem uma elevada taxa de prescrição e consumo, elevada lipossolubilidade e devido à sua bioatividade e efeitos que podem causar no ambiente, mesmo em baixas concentrações.

4.1. Consumo

Como já foi referido, os NSAIDs representam alguns dos fármacos mais consumidos, e, portanto, dos mais detetados no ambiente aquático. De acordo com o relatório do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento) relativo à monitorização do mercado de 2014, foram vendidas cerca de 6,587,590 embalagens o que se traduziu em vendas no valor de cerca de 54,4 milhões (INFARMED, 2014). Outro aspeto importante reportado neste mesmo relatório é o facto de quatro NSAIDs (AAS, IBU, DIC e NAP) estarem entre as 100 substâncias ativas com maior número de embalagens vendidas pelo Sistema Nacional de Saúde (SNS).

Dados mais recentes, relativos ao ano de 2019 e fornecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (*Organisation for Economic Co-operation and Development* - OECD) apontam uma dose diária definida (medida estatística do consumo de fármacos) de 70,8 doses em Portugal para NSAIDs. Já as vendas relativas ao mesmo ano apontam para um total de 4137,4 milhões de dólares em NSAIDs (26 dos 38 países membros da OECD) com Portugal a contribuir com cerca de 163,2 milhões de dólares para este total (OECD, 2019).

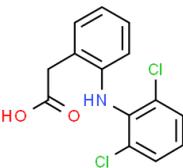
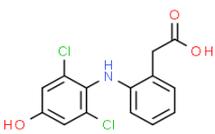
Uma das explicações para o elevado consumo deste grupo farmacoterapêutico, deve-se ao facto de, para além de serem altamente prescritos, muitos dos fármacos pertencentes a este grupo serem *over the counter medicines*, havendo uma maior facilidade de acesso uma vez que muitos são de venda livre, o que faz com que o seu consumo seja ainda superior ao estimado.

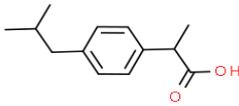
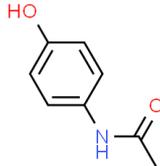
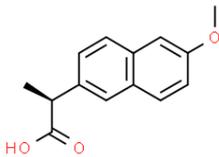
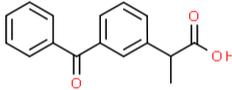
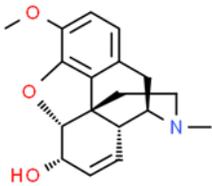
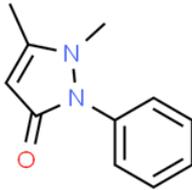
4.2. Características Físico-Químicas

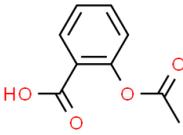
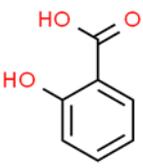
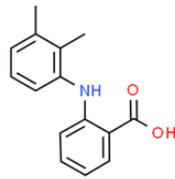
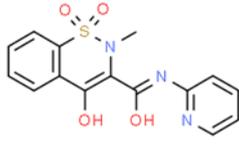
Na Tabela 2 estão representadas as fórmulas moleculares, bem como algumas das características físico-químicas mais relevantes de alguns dos principais fármacos pertencentes ao grupo farmacoterapêutico dos NSAIDs, os mais estudados e detetados em bivalves.

O log K_{ow} dos NSAIDs presentes na Tabela 2 varia entre 0,38 e 5,12. No que toca à pKa, os NSAIDs representados apresentam valores entre 2,97 e 8,2. Pelo contrário, o paracetamol (PAR), para além de não ter propriedades anti-inflamatórias (não sendo considerado um NSAID por muitos autores), é um composto que tem uma pKa de 9,38 (Mompelat *et al.*, 2009).

Tabela 2 – Designação, número CAS, fórmula química e molecular, peso molecular, log Kow, pKa e solubilidade dos principais NSAIDs. Valores adaptados do *DrugBank Online* e do *PubChem*. Estrutura retirada do *ChemSpider*.

Fármaco	Número CAS	Fórmula Molecular	Peso Molecular	log Kow	pKa	Solubilidade (mg/ mL)
Diclofenac	15307-86-5	 $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296,1	4,51	4,15	2,37 ^a
4'-Hydroxydiclofenac ^b	64118-84-9	 $C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$	312,1	3,18	–	17,9

Fármaco	Número CAS	Fórmula Molecular	Peso Molecular	log Kow	pKa	Solubilidad (mg/ mL)
Ibuprofeno	15687-27-1	 <chem>CC(C)Cc1ccc(cc1)C(=O)O</chem> $C_{13}H_{18}O_2$	206,28	3,97	4,91	21 ^a
Paracetamol ^c	103-90-2	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem> $C_8H_9NO_2$	151,16	0,91	9,38	14 ^a
Naproxeno	22204-53-1	 <chem>CC(O)C(=O)c1ccc2cc(OC)ccc2c1</chem> $C_{14}H_{14}O_3$	230,26	3,18	4,15	15,9 ^a
Cetoprofeno	22071-15-4	 <chem>CC(O)C(=O)c1ccc(cc1)C(=O)c2ccccc2</chem> $C_{16}H_{14}O_3$	254,28	3,12	4,45	51 ^a
Codeína	76-57-3	 <chem>CN1CC[C@]23[C@@H]4OC5=C(C)C=CC=C5[C@@H]2[C@H]1C3=O</chem> $C_{18}H_{21}NO_3$	299,4	1,39	8,2	—
Fenazona	60-80-0	 <chem>CC1=CN(C)C(=O)C1c2ccccc2</chem> $C_{11}H_{12}N_2O$	188,23	0,38	1,4	51900 ^a

Fármaco	Número CAS	Fórmula Molecular	Peso Molecular	log Kow	pKa	Solubilidade (mg/ mL)
Ácido Acetilsalicílico	50-78-2	 <chem>CC(=O)Oc1ccccc1C(=O)O</chem> $C_9H_8O_4$	180,6	1,18	3,5	4600 ^a
Ácido Salicílico ^d	69-72-7	 <chem>O=C(O)c1ccccc1O</chem> $C_7H_6O_3$	138,12	2,26	2,97	2240 ^a
Ácido Mefenâmico	61-68-7	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)NC(=O)C2=CC=CC=C2C(=O)O</chem> $C_{15}H_{15}NO_2$	241,28	5,12	4,2	20
Piroxicam	36322-90-4	 <chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)Nc2c(O)c(O)c3c2n(c3)C4=CC=CC=N4</chem> $C_{15}H_{13}N_3O_4S$	331,3	3,06	6,3	23

a – Solubilidade a 25°C

b – Metabolito do DIC

c – Apesar de estar incluído nesta tabela, o PAR não tem propriedades anti-inflamatórias, não sendo considerado NSAID por muitos autores.

d – Metabolito do AAS

4.3. Mecanismos de Ação

Em 1971, John Vane, um farmacêutico britânico, descobriu os mecanismos de ação, que eram até então uma incógnita, da aspirina e de outros NSAIDs (Vane, 1971).

Existem duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), a ciclo-oxigenase I (COX-1) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Estes complexos enzimáticos catalisam a produção das prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico que está presente nos fosfolípidos das membranas celulares. As PGs são prostanóides (sintetizados pela COX), e podem apresentar

várias formas (PG H, PG E, PG D e tromboxano A) que estão envolvidas e são mediadoras de diversos processos fisiológicos e patológicos, intervindo na febre, dor e inflamação, bem como na prevenção da formação de coágulos sanguíneos e de outros processos, como o desenvolvimento de patologias cardiovasculares e osteoporose (Narumiya *et al.*, 1999; Rainsford, 2007). Por outro lado, as PG G2 levam à formação de tromboxano A (TXA) que está envolvido na agregação plaquetária.

No geral, o modo de ação dos NSAIDs passa pela inibição da biossíntese das PGs, evitando a ligação do ácido araquidónico ao complexo enzimático COX (COX-1 e/ou COX-2), no sistema nervoso central e periférico (Conaghan, 2012). Ou seja, o principal mecanismo passa pela inibição da atividade destas enzimas, reduzindo a produção das várias PGs mediadoras da febre, dor, inflamação e de outros processos fisiológicos supramencionados, o que confere aos NSAIDs as suas propriedades antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias (Ishiguro e Kawahara, 2014).

Como já referido, o PAR ou acetaminofeno não apresenta atividade anti-inflamatória, sendo reconhecido apenas pelas suas propriedades analgésicas e antipiréticas. O seu modo de ação difere dos NSAIDs uma vez que atua preferencialmente na COX-2 e na COX-3 (Vane e Botting, 1998).

Existem NSAIDs relativamente mais recentes que têm como modo de ação a inibição seletiva da COX-2 (Praveen Rao e Knaus, 2008). Esta nova abordagem deve-se ao facto da inibição da COX-1 ser apontada como um dos principais responsáveis pelos efeitos secundários associados aos NSAIDs (Wongrakpanich *et al.*, 2018). Isto levou à criação de novos fármacos com diferentes modos de ação e com algumas vantagens como o melhoramento da sua tolerância gastrointestinal, tendo sido reportados um menor número de efeitos secundários a este nível desde que foi adotado este novo mecanismo de ação (Ishiguro e Kawahara, 2014).

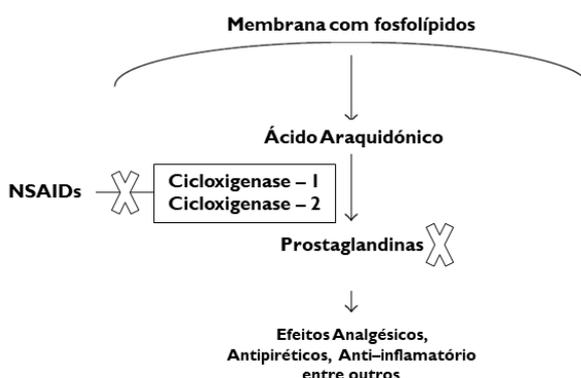


Figura 2 – Mecanismo de ação geral dos NSAIDs, onde ocorre a inibição das COX 1 e/ou COX 2 e consequente supressão da produção das PGs. (Adaptado de Ishiguro e Kawahara, 2014).

5. Ocorrência Ambiental de Anti-Inflamatórios Não Esteroides

Os fármacos deste grupo farmacológico são dos mais detetados, tanto no meio aquático como na biota aquática (Nunes *et al.*, 2020). É apenas possível investigar a ocorrência ambiental destas substâncias devido aos avanços tecnológicos nas metodologias e na instrumentação analítica aplicada às diferentes matrizes. Este avanço, que tem permitido a determinação de diferentes fármacos, metabolitos e produtos de degradação no ambiente, deve-se sobretudo à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), que é a técnica de determinação analítica de eleição (Pereira *et al.*, 2020a).

Segue-se uma revisão de literatura científica referente à ocorrência de alguns dos NSAIDs mais relevantes nos diversos corpos aquáticos (Tabela 4) e em alguns organismos aquáticos, mais concretamente em diferentes espécies de bivalves (Tabela 5).

5.1. Meio Aquático

Tendo em conta as diversas fontes de fármacos e a constante libertação para o meio aquífero, estes têm sido detetados e quantificados nos diversos corpos aquáticos como afluentes e efluentes de ETARs, afluentes e efluentes industriais e de hospitais, águas subterrâneas (aquíferos), águas superficiais (águas marinhas, rios, lagos, pântanos, estuários) e até em água potável.

Os valores em que são detetados nestes corpos aquáticos podem variar entre as ng/L e os µg/L (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015), e as frequências em que ocorrem variam consoante o tipo de amostra. Por norma seguem a ordem decrescente de concentração: Efluentes industriais > efluentes de hospitais > afluentes de ETARs > efluentes de ETARs > águas de superfície > águas subterrâneas > água potável (Patel *et al.*, 2019).

A ocorrência global de fármacos presentes no ambiente foi revista por aus der Beek *et al.* (2016). Esta revisão reporta a presença de 631 fármacos e metabolitos, acima dos limites analíticos de deteção, em diferentes matrizes ambientais e em 71 países diferentes (pelo menos um fármaco detetado), o que evidencia a ubiquidade destes contaminantes à escala mundial. Destaca-se deste estudo o DIC como o fármaco detetado mais frequentemente em todas as amostras ambientais, tendo sido identificado nos vários corpos aquáticos, incluindo água potável de 50 países. Também o IBU e o NAP tiveram frequências de deteção semelhantes ao DIC. No global, foram detetados dezasseis fármacos em todos os corpos aquáticos supramencionados (águas de superfície, subterrâneas e potável), em pelo menos um país das cinco regiões definidas pela Organização das Nações Unidas (ONU): África; Ásia-Pacífico;

Europa Oriental; Europa Ocidental e outros grupos como a América do Norte, Austrália e Nova Zelândia; América Latina e países das Caraíbas. Nestes dezasseis fármacos estão incluídos cinco NSAIDs, o IBU, o DIC, o NAP, o PAR (que como referido não tem propriedades anti-inflamatórias, não sendo considerado NSAID por vários autores) e o AS (metabolito do AAS) (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentrações médias e máximas (em µg/L) dos NSAIDs detetados ubiquamente nas cinco regiões definidas pela ONU. (Adaptada de aus der Beek *et al.*, 2016).

Fármaco	Global	
	Média	Máxima
DIC	0,032	18,74
IBU	0,108	303
NAP	0,05	32
PAR	0,161	230
AS	0,922	20,96

Legenda: AS – Ácido Salicílico; DIC - Diclofenac; IBU – Ibuprofeno; NAP – Naproxeno; PAR – Paracetamol

Um aspeto relevante dos dados presentes na Tabela 4 são as elevadas concentrações de fármacos detetadas nos efluentes de indústrias farmacêuticas, com valores de até 1673 µg/L para o IBU numa fábrica localizada no Paquistão (Ashfaq *et al.*, 2017). Isto demonstra que, nalguns casos, os locais de fabrico de fármacos são uma das maiores fontes emissoras destes e outros compostos (também produzidos pela indústria farmacêutica) para o ambiente, contendo concentrações 10 a 1000 vezes maiores do que as encontradas em águas residuais (Patel *et al.*, 2019). É portanto de extrema importância que haja restrições e regulamentos aplicados às indústrias farmacêuticas, de modo a que estas possam adotar medidas que permitam a correta remoção dos fármacos e garantir padrões aceitáveis de qualidade da água que é descarregada para os corpos aquáticos ou para reutilização na própria fábrica. (Gadipelly *et al.*, 2014). No entanto, estes regulamentos e restrições não se verificam em todos os países, o que torna estes dados particularmente relevantes em alguns países não desenvolvidos, onde não há qualquer tipo de tratamento de remoção de fármacos, ou estes são ineficazes em fazê-lo. É o caso de países como a Índia e o Paquistão onde os regulamentos são indulgentes e insuficientes o que, aliado a uma produção irresponsável, pode levar a descargas de concentrações elevadas de fármacos para o meio aquático (Patel *et al.*, 2020).

Relativamente às ETARs, verifica-se por norma uma redução na concentração de fármacos presentes nos efluentes, quando em comparação com os afluentes destas. Como se

pode verificar em Paíga *et al.* (2016), houve um decréscimo na concentração máxima do PAR de 615,135 µg/L para 2,463 µg/L e do IBU de 24,505 µg/L para 3,304 µg/L o que se traduz numa eficácia de remoção na ETAR de cerca de 99,60% e 86,52%, respetivamente.

Como se verifica na Tabela 4, e como observou aus der Beek *et al.* (2016), os NSAIDs são detetados em água potável a concentrações bastante abaixo das suas doses terapêuticas com valores entre 0,055 µg/L para o NAP (Al-Rifai, Khabbaz e Schäfer, 2011) e 1,35 µg/L para o IBU (Sadezky *et al.*, 2008). No entanto, apesar destas baixas concentrações, existe ainda alguma incerteza quanto a problemática da presença de fármacos em água potável devido aos potenciais efeitos que podem resultar da exposição crónica a estes contaminantes (Noguera-Oviedo e Aga, 2016).

Tabela 4 – Ocorrência de NSAIDs em diferentes locais nos vários corpos aquáticos.

Corpo Aquático/ Fonte de Fármacos	Fármacos	Concentração (µg/L)	Local	Referência
Efluente de uma Indústria Farmacêutica	PAR	12 a 64	Lahore, Paquistão	Ashfaq <i>et al.</i> , 2017
	NAP	215 a 464		
	DIC	252 e 836		
	IBU	703 a 1673		
	PAR	461	Ontário, Canadá	Kleywegt <i>et al.</i> , 2019
	COD	49,2		
	IBU	344		
	NAP	253		
Efluente de Hospital ^b	KET	<LOQ - 0,199	Coimbra, Portugal	Santos <i>et al.</i> , 2013
	NAP	0,0454 - 6,042		
	IBU	0,32 - 5,815		
	PAR	0,0130 - 0,0589		
	AS	0,383 - 2,817		
	DIC	<LOQ - 0,189		
	PHE	0,0605 - 0,271		
	PRO-PHE	<LOD - 0,0017		
	PIR	n.d. - 0,0512		
	COD	0,0081 - 2,837		
Afluente de ETAR	DIC	0,46 - 6,5	Lisboa, Portugal	Jesus Gaffney, de <i>et al.</i> , 2017
	KET	n.d. - 1,7		
	IBU	8 - 53		
	NAP	n.d. - 38		
	PAR	0,741 - 8,556	Toscana, Itália	Palli <i>et al.</i> , 2019
	KET	0,247- 3,511		
	DIC	1,038 - 3,429		
	PAR	615,135 ^a	Rio Lis, Portugal	Paíga <i>et al.</i> , 2016
	IBU	24,505 ^a		
	DIC	0,165 ^a		
	NAP	3,245 ^a		
	AS	61,259 ^a		
KET	0,147 ^a			

Corpo Aquático/ Fonte de Fármacos	Fármacos	Concentração (µg/L)	Local	Referência
Efluente de ETAR	DIC	0,05 - 4,2	Lisboa, Portugal	Jesus Gaffney, de et al., 2017
	KET	n.d. - 0,72		
	IBU	n.d.		
	NAP	n.d. - 3,3		
	PARA	<LOD - 0,444	Toscana, Itália	Palli et al., 2019
	KET	0,031 - 0,512		
	DIC	0,811 - 4,882		
	PAR	4,909 ^a	Rio Lis, Portugal	Paíga et al., 2016
	IBU	3,304 ^a		
	DIC	0,724 ^a		
	NAP	0,270 ^a		
	AS	0,296 ^a		
	KET	0,233 ^a		
Águas Subterrâneas	KET	2,886 ^a	Europa	Loos et al., 2010
	IBU	0,395 ^a		
	DIC	0,024 ^a		
	NAP	0,0276		
	IBU	0,092	Sérvia (Novi Sad, Zrenjanin, Bečej, Vrbas and Obrenovac)	Petrović et al., 2014
	AS	<LOQ - 0,0025		
	PHE	0,0234		
	PRO-PHE	<LOQ - 0,0248		
	PARA	0,0009 - 1,036	Taiwan	Lin et al., 2015
	IBU	0,0174 - 0,837		
	NAP	0,128		
	KET	n.d.		
	DIC	0,0021 - 0,032		
Águas de Superfície (Rio)	PAR	0,527 ^a	Rio Lis, Portugal	Paíga et al., 2016
	IBU	1,317 ^a		
	DIC	0,038 ^a		
	NAP	0,260 ^a		
	AS	0,294 ^a		
	KET	0,0753 ^a		
Águas de Superfície (Rio e Afluentes deste)	NAP	0,101 ^a	Nordeste de Espanha	López-Serna et al., 2012
	DIC	0,26 ^a		
	4-OH-DIC	0,0482 ^a		
	MA	n.d.		
	PARA	0,712		
	PHE	0,0375		
Águas de Superfície (Mar)	PAR	0,584 ^a	Oceano Atlântico, ao longo da costa do Norte de Portugal	Lolić et al., 2015
	AS	0,0053 ^a		
	DIC	0,241 ^a		
	IBU	0,222 ^a		
	NAP	0,178		
	KET	0,0897 ^a		
Águas de Superfície	KET	0,045	Sérvia (Novi Sad, Zrenjanin, Bečej, Vrbas and Obrenovac)	Petrović et al., 2014
	NAP	<LOQ - 0,0742		
	IBU	<LOQ - 0,346		

Corpo Aquático/ Fonte de Fármacos	Fármacos	Concentração (µg/L)	Local	Referência
	DIC	<LOQ - 0,324		
	PHE	0,0125		
	COD	0,0073		
Água potável	AS	0,2012	Nordeste de Espanha	López-Serna <i>et al.</i> , 2010
	DIC	0,140 ^c	Estocolmo, Suécia	TemaNord, 2012
	IBU	1,35 ^c	Alemanha	Sadezky <i>et al.</i> , 2008
	NAP	0,055	Queensland, Australia	Al-Rifai, Khabbaz e Schäfer, 2011
	PAR	0,211 ^c	Alemanha	Sadezky <i>et al.</i> , 2008
	PHE	0,4 ^c	Alemanha	Sadezky <i>et al.</i> , 2008

Legenda: 4-OH-DIC – 4'-Hydroxiciclofenac; AS – Ácido Salicílico ; COD – Codeína; DIC – Diclofenac ; IBU – Ibuprofeno; KET – Cetoprofeno; LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação; MA – Ácido mefenâmico; NAP – Naproxeno; PAR – Paracetamol; PHE – Fenazona; PRO-PHE – Propifenazona; ^a valor mais alto detetado; ^b valores referentes ao Hospital Universitário; ^c valor máximo revisto por aus der Beek *et al.*, 2016.

5.2. Biota Aquática

Há, portanto, uma presença ubíqua de NSAIDs nos diversos corpos aquáticos, presença esta que acaba por ser sentida a nível da biota aquática que acaba por acumular estes micropoluentes.

Ao contrário do que acontece no meio aquático, os estudos da ocorrência de fármacos, como os NSAIDs, na biota aquática ainda são limitados e com o principal foco na ocorrência nos diferentes tecidos de peixes (músculo, fígado, cérebro) (Álvarez-Ruiz e Picó, 2020; Miller *et al.*, 2018). De facto, Miller *et al.* (2018) reporta apenas 43 publicações (até 2018) relativas à ocorrência de fármacos na biota aquática, sendo 29 relativas a peixes e 18 a invertebrados. Nestas publicações foram quantificados 200 fármacos, dos quais 14% pertencem aos NSAIDs cujos resíduos nos invertebrados tiveram algum destaque como a classe com concentrações mais altas (mediana de 20,50 ng/g). De entre os NSAIDs, os fármacos mais detetados foram o DIC e o IBU com medianas de 15 ng/g e 83,65 ng/g, respetivamente.

Apesar da escassez de publicações encontradas na bibliografia, há um grande interesse em estudar a ocorrência de fármacos em bivalves devido ao seu alto consumo, bem como às suas características previamente mencionadas e que tornam estas espécies excelentes bioindicadores da poluição aquática, sendo representativas da área onde são recolhidas (Arpin-Pont *et al.*, 2016). Na Tabela 5 está resumida a ocorrência de NSAIDs em espécies de bivalves encontradas na bibliografia científica.

Tabela 5 – Ocorrência de NSAIDs, em diferentes locais, em várias espécies de bivalves.

Fármacos	Espécie	Concentração (ng/g)	Local	Referência
Ácido Mefenâmico	<i>Mytilus edulis</i>	n.d. < 23	Irlanda	McEneff et al., 2014
Ácido Salicílico	<i>Mytilus edulis</i>	≤ 490	Bélgica	Wille et al., 2011
Cetoprofeno	<i>Mytilus galloprovincialis</i> ;	<LOQ	Mar Adriático	Mezzelani et al., 2016a, b
Codeína	<i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Chamelea gallina</i> ; <i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOD	Ebro Delta, Espanha	Alvarez-Muñoz et al., 2015b
Diclofenac	<i>Mytilus edulis</i>	n.d.	Irlanda	Mc Eneff et al., 2014
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOD - 16,11	Mar Adriático	Mezzelani et al., 2016a, b
	<i>Ruditapes decussatus</i>	1,1 - 6,2	Portugal	Rodrigues et al., 2019
	<i>Mytilus spp</i>	0,5 - 4,5	Portugal	Cunha et al., 2017
	<i>Corbiculidae</i>	1,2 - 31	China	Xie et al., 2017
	<i>Mytilus edulis trossulus</i>	560±130b	Mar Báltico	Wolecki et al., 2019
Fenazona	<i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Chamelea gallina</i> ; <i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOQ < LOD < LOD	Ebro Delta, Espanha	Alvarez-Muñoz et al., 2015b
Ibuprofeno	<i>Geukensia demissa</i>	< LOQ	São Francisco	Klosterhaus et al., 2013
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<LOD-9.39	Mar Adriático	Mezzelani et al., 2016a, b
	<i>Ruditapes decussatus</i>	0,9 - 13	Portugal	Rodrigues et al., 2019
	<i>Corbiculidae</i>	5,0 - 44	China	Xie et al., 2017
	<i>Mytilus edulis trossulus</i>	730±290b	Mar Báltico	Wolecki et al., 2019
Naproxeno	<i>Geukensia demissa</i>	< LOQ	São Francisco	Klosterhaus et al., 2013
	<i>Ruditapes decussatus</i>	1,4 - 3,9	Portugal	Rodrigues et al., 2019
	<i>Mytilus edulis trossulus</i>	473±76b	Mar Báltico	Wolecki et al., 2019
Paracetamol	<i>Mytilus edulis</i>	≤ 115	Bélgica	Wille et al., 2011
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOD	Mar Adriático	Mezzelani et al., 2016a, b
Piroxicam	<i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Chamelea gallina</i> ; <i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOD	Ebro Delta, Espanha	Alvarez-Muñoz et al., 2015b
Propifenazona	<i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Chamelea gallina</i> ; <i>Mytilus galloprovincialis</i>	< LOD	Ebro Delta, Espanha	Alvarez-Muñoz et al., 2015b

Legenda: LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação

Nos artigos revistos presentes na Tabela 5, as concentrações variaram entre valores não detetados e não quantificados, a algumas centenas de ng/g, o que demonstra uma menor presença nos bivalves quando em comparação com os corpos aquáticos do meio aquífero. Destacam-se os valores obtidos por Wolecki *et al.*, (2019) para o DIC (560 ± 130 ng/g), IBU (730 ± 290 ng/g) e NAP (560 ± 130 ng/g) como as concentrações mais altas encontradas nesta bibliografia.

Apesar das aparentes baixas concentrações dos valores revistos, os dados relativos ao destino dos fármacos na biota aquática apontam para potenciais efeitos adversos a estes organismos (Huerta *et al.*, 2012).

6. Efeitos dos Anti-Inflamatórios não Esteroides no Ecossistema

Para avaliar os efeitos tóxicos dos fármacos, e mais concretamente dos NSAIDs, nos diversos organismos, surge a necessidade de realizar testes específicos, que avaliem tanto os efeitos agudos, como os efeitos crónicos. Nos testes de toxicidade aguda é registada a ocorrência da mortalidade, enquanto nos testes de toxicidade crónica são avaliados outros fatores, como o impacto na taxa de reprodução e crescimento (Núñez Marcé, 2017).

No ambiente aquático, os peixes são os organismos mais frequentemente contaminados, sendo que a informação acerca dos efeitos resultantes da contaminação de outros organismos, como invertebrados e plantas aquáticas, é ainda limitada devido às diferenças estruturais que impedem uma extrapolação dos resultados (Núñez Marcé, 2017).

A comunidade científica alcançou já um consenso quanto à ocorrência de efeitos adversos na biota aquática, resultantes da exposição a fármacos. A sua toxicidade crónica está ainda associada a uma potencial bioacumulação, representando um risco ambiental, neste caso em concreto para a biota aquática, que está sujeita aos efeitos negativos desta exposição (Moreno-González *et al.*, 2015, Daniele *et al.*, 2016). Para além disto, estes compostos apresentam a capacidade de atravessar membranas biológicas, atingindo células e tecidos específicos.

Foram já realizados alguns estudos que avaliaram o impacto da contaminação por NSAIDs (AS e DIC) em bivalves, mais especificamente em mexilhões. Nestes estudos foram observadas alterações no equilíbrio redox, nos mecanismos antioxidantes e no metabolismo, bem como um aumento no stress oxidativo dos mexilhões, resultantes da exposição a estes contaminantes. Estas alterações podem comprometer o crescimento e reprodução destas espécies (Freitas *et al.*, 2020). Segundo Wolecki *et al.* (2019), o PAR induz alguma genotoxicidade no mexilhão *Dreissena polymorpha*, sem no entanto causar dano no seu ADN.

No mesmo estudo, concluiu-se que tanto o DIC como o IBU tiveram efeitos citotóxicos nesta espécie de mexilhão. Outro estudo comprovou os efeitos do DIC no desenvolvimento embrionário de *Mytilus galloprovincialis*, induzindo malformações nas suas conchas (Balbi *et al.*, 2018).

Alguns dados ecotoxicológicos reportaram ainda o facto das misturas de compostos poluentes (outros compostos químicos contaminantes como os pesticidas) apresentarem efeitos diferentes daqueles observados nos compostos isolados devido à possível ocorrência de efeitos aditivos. Estes possíveis efeitos devem ser levados em conta quando se avalia a ecotoxicologia dos fármacos em bivalves (Núñez Marcé, 2017).

Para além dos efeitos ecotoxicológicos, que podem afetar o metabolismo, a fisiologia e até a reprodução dos vários organismos aquáticos, a ubiquidade dos fármacos levanta questões relativas à saúde humana. Estas questões prendem-se com o facto de haver o potencial de haver transferência de fármacos para os géneros alimentícios, o que pode causar efeitos tóxicos diretos ou indiretos, através de bactérias resistentes a antibióticos (Bayen *et al.*, 2015).

7. Enquadramento Legal

De modo a proteger a população e o ambiente da exposição a determinados contaminantes, o Parlamento Europeu e a Comissão Europeia (CE) têm vindo a estabelecer regulamentos, onde fixam teores máximos para alguns destes contaminantes. Relativamente aos géneros alimentícios, o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão Europeia de 19 de dezembro de 2006 (Comissão Europeia, 2006) estabelece os limites máximos de alguns contaminantes.

No entanto, ao longo das últimas 2 décadas tem-se vindo a verificar um aumento dos níveis de compostos químicos resultantes da atividade antropogénica, como é o caso dos fármacos e outros CECs (Miller *et al.*, 2018) para os quais não foram estabelecidos limites máximos (Vandermeersch *et al.*, 2015).

Uma vez que o uso destes compostos não pode ser evitado, é fundamental avaliar o risco ambiental associado à sua contaminação, de modo a ir ao encontro da *Water Framework Directive*. Esta foi introduzida com a Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, pretendendo que todos os estados membros garantam a qualidade ambiental dos seus corpos aquáticos. Desde então tem sido alterada por várias diretivas como a Diretiva 2008/105/CE que foi implementada para controlar a presença de contaminantes orgânicos e inorgânicos em

águas de superfície e que estabeleceu uma lista de 33 substâncias/ grupo de substâncias que deveriam ser monitorizadas. Esta diretiva seria mais tarde alterada pela Diretiva 2013/39/EU.

A Diretiva 2013/39/EU de 12 de agosto de 2013 veio atualizar as substâncias prioritárias no domínio da política da água (33 para 45) e estabeleceu uma nova *watch list*. Esta representa uma lista dinâmica, que é atualizada de acordo com a persistência e preocupação associada à presença de fármacos (e outros contaminantes) nos ciclos de água, pelo que a sua validade é limitada. Assim sendo, é de extrema importância identificar e priorizar os fármacos mais prevalentes, de modo que estes tenham uma monitorização mais frequente (Pereira et al., 2016). De acordo com esta diretiva, todos os estados-membro devem monitorizar as substâncias presentes na *watch list* nos cursos de água/ estações de monitorização indicadas, de modo a recolher dados que permitam à UE averiguar os impactos que os CECs (entre eles os fármacos) e outras substâncias têm no ambiente e quais devem ser priorizados legalmente (Sousa et al., 2019). No caso de Portugal, estão identificadas 6 estações de monitorização de onde devem ser recolhidas, pelo menos uma vez por ano, amostras para análise da presença destes contaminantes (Pereira et al., 2020). Esta diretiva preconiza também que o DIC, juntamente com as hormonas 17-beta-estradiol (E2) e o 17-alfa-etinilestradiol (EE2) seriam incluídos na primeira *watch list* a fim de recolher dados de monitorização.

A primeira *watch list* foi publicada com a Decisão de Execução (UE) 2015/495, e, para além dos três compostos mencionados anteriormente, incluiu também a hormona estrogénio (E1), três antibióticos (eritromicina, azitromicina e claritromicina), entre outros CECs que não fármacos (Sousa et al., 2019). Esta Decisão foi por sua vez revogada pela Decisão de Execução (UE) 2018/840 que alterou os compostos que constavam da *watch list*, com destaque para a remoção do DIC e adição dos antibióticos ciprofloxacina e amoxicilina. Contudo, esta Decisão foi também revogada pela Decisão de Execução (UE) 2020/1161, sendo este o ato jurídico que se encontra atualmente em vigor no que toca às substâncias que devem pertencer à *watch list*. Nesta última lista surgem novos fármacos como o antidepressivo venlafaxina e os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim.

8. Metodologias analíticas para a determinação de anti-inflamatórios em bivalves

O desenvolvimento de um método multiresíduo (que analisa em simultâneo vários analitos) para a determinação de fármacos em matrizes bióticas complexas como é o caso dos bivalves, deve seguir um fluxo de trabalho lógico que inclua as seguintes etapas (Figura 3) (Miller *et al.*, 2018):

- Preparação das amostras;
- Análise instrumental;
- Interpretação, processamento de dados e validação da metodologia;
- Aplicação a amostras reais.

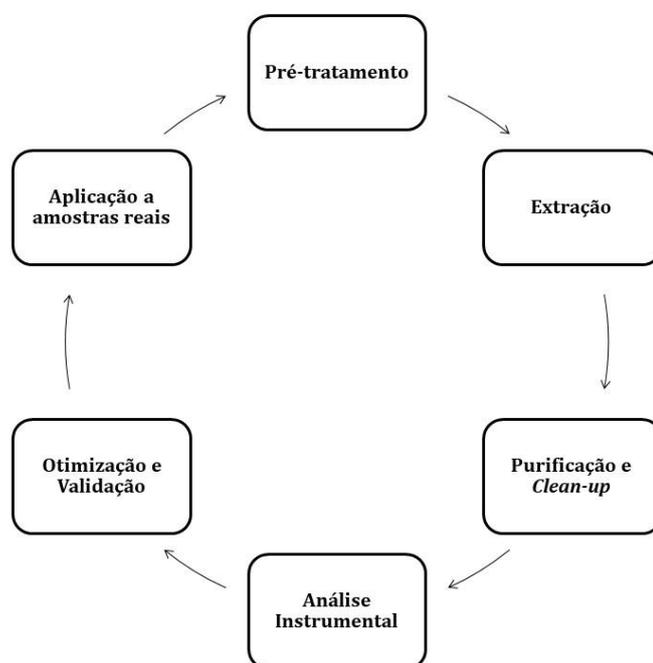


Figura 3 – Fluxograma das etapas que se devem seguir no desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de fármacos em matrizes da biota aquática. (Adaptado de Miller *et al.*, 2018).

De modo a detetar fármacos, mais concretamente NSAIDs, em matrizes complexas como os bivalves, a metodologia deve seguir um protocolo que se apresente bem adaptado às características físico-químicas específicas dos fármacos-alvo e da própria matriz (Mijangos *et al.*, 2019). A metodologia deve apresentar uma extração e purificação eficiente, bem como métodos analíticos sensíveis e específicos para a deteção e quantificação dos analitos em causa (Martínez Bueno *et al.*, 2013).

É, portanto, relevante escolher as técnicas que mais se adequem ao tipo de determinação analítica que se pretende fazer, e que melhores resultados analíticos apresentem.

Na Tabela 6 e 7 estão compilados vários estudos relativos aos métodos de preparação utilizados na determinação analítica de NSAIDs (Tabela 6) e os métodos analíticos mais frequentemente utilizados na determinação destes (Tabela 7), bem como alguns parâmetros associados à eficiência da metodologia utilizada como os limites analíticos e as percentagens de recuperação.

Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Preparação da Amostra			Método Analítico	Recuperação (%) ± DPR (%)	Ref.
			Método de Extração	Condições de Extração	Método de Purificação			
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	5 fármacos, incluindo 2 NSAIDs	DIC	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 200; Solvente de Extração: ACN/H ₂ O (3:1); 3 ciclos de 5 min a 60 °C; Extratos evaporados à secura por N ₂ , seguido de adição de H ₂ O Milli-Q até perfazer 200 mL.	SPE	LC-MS/MS	83±8	McEneff et al., 2013; 2014
		MA					104±12	
Ostra-do-pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)		COD	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 350; Solvente de Extração: MeOH/H ₂ O (1:2); 3 ciclos de 5 min a 50 °C; Extratos evaporados à secura por N ₂ , seguido de adição de H ₂ O HPLC até perfazer 200 mL e depois adiconados 6 mL de Na ₂ EDTA.	SPE	UHPLC-MS/MS	49,3±2 e 41,7±4,3	Alvarez-Muñoz et al., 2015a,b
		PHE					34,5±3,3 e 42,1±3,9	
		PRO-PHE					45,3±12 e 42,5±3,7	
		PIR					40,1±3,5 e 32,8±2,6	
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	23 fármacos (e metabolitos), incluindo 4 NSAIDs	COD	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 350; Solvente de Extração: MeOH/H ₂ O (1:2); 3 ciclos de 5 min a 50 °C; Extratos evaporados à secura por N ₂ , seguido de adição de H ₂ O HPLC até perfazer 200 mL e depois adiconados 6 mL de Na ₂ EDTA.	SPE	UHPLC-MS/MS	43,1±4,4 e 49,5±2,9	Alvarez-Muñoz et al., 2015a,b
		PHE					48,2±3,1 e 48,6±3,2	
		PRO-PHE					47,7±0,1 e 50,3±3,6	
		PIR					62,2±2,3 e 63,1±4,4	
Amêijoia-boa (<i>Chamelea gallina</i>)		COD	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 350; Solvente de Extração: MeOH/H ₂ O (1:2); 3 ciclos de 5 min a 50 °C; Extratos evaporados à secura por N ₂ , seguido de adição de H ₂ O HPLC até perfazer 200 mL e depois adiconados 6 mL de Na ₂ EDTA.	SPE	UHPLC-MS/MS	54±2,8 e 36,1±11,7	Alvarez-Muñoz et al., 2015a,b
		PHE					56,4±0,3 e 59,3±7,5	
		PRO-PHE					71,7±18 e 68,5±17,4	
		PIR					46,4±12,7 e 43,7±16,3	

Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Preparação da Amostra			Método Analítico	Recuperação (%) ± DPR (%)	Ref.
			Método de Extração	Condições de Extração	Método de Purificação			
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	34 fármacos e metabólitos, incluindo 4 NSAIDs	DIC	SLE e Centrifugação	Solvente de Extração: ACN com 1% de ácido fórmico; 6 mL adicionados a 1 g de amostra e solução agitada num vórtex (5 min, 2500 rpm); Centrifugação (10 min, 4500 rpm, 20°C); Sobrenadante decantado (num tubo de polipropileno de 15 mL) e evaporado à secura; Reconstituído em 1mL MeOH/ACN (75:25).	SPE	UHPLC-MS/MS	86±3,4	Maskrey et al., 2021
		4 OH DIC					61 ± 8,9	
		IBU					-	
		NAP					-	
		DIC					80±4,2	
		4 OH DIC					46±11,1	
		IBU					-	
Ostra-do-pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	7 fármacos, incluindo 5 NSAIDs	AS	QuEchers	Solvente de Extração: ACN 10 mL de H2O + 1g de amostra (tubo de 50 mL) e agitado 1 min; 10 mL ACN adicionados e tubo agitado 1 min; Adicionado o pacote de tampão citrato e tubo agitado (15 s manualmente e 45 s num vórtex); Tubo foi centrifugado (5 min a 7000 rpm); Sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL com 1g de gel de sílica (sorvente dispersivo); tubo agitado (15 s manualmente e 45 s num vórtex) e depois centrifugado (5 min a 7000 rpm); 1 mL de sobrenadante foi evaporado à secura (N2).	dSPE	LC-MS/MS	61	Nuñez et al., 2015
		KET					91	
		NAP					95	
		DIC					93	
		IBU					90	

Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Preparação da Amostra			Método Analítico	Recuperação (%) ± DPR (%)	Ref.
			Método de Extração	Condições de Extração	Método de Purificação			
Mexilhão-zebra (<i>Dreissena polymorpha</i>)	NSAIDs	DIC, metabólitos e	QuEChERS modificado	Solvente de Extração: ACN e heptano; 5 mL de H ₂ O adicionados a 0,1g de amostra (tubo de 50 mL); 10 mL de ACN e 200 µL adicionados ao tubo (agitado num vórtex 15 s); Adicionado o "sal de acetato" e o tubo foi agitado (10 s manualmente, 20 s num vórtex e 3 min numa centrifugadora a 10000 rpm); 6 mL de sobrenadante foram evaporados à secura (N ₂).	dSPE	LC-MS/MS	Entre os 93-105% ± 8-16	Daniele et al., 2016
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	7 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	KET	MAME	Adicionou-se o surfactante (3% v/v) à amostra (1g de homogenizado de Mexilhão) no recipiente, perfazendo 10 mL. Seguiu-se a extração MAME e depois o extrato foi filtrado com uma membrana de nylon de 0,45 µm antes da SPE.	SPE	LC-UV/DAD	100±4	Cueva-Mestanz a et al., 2008
		NAP					97±4	
		IBU						
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	14 pesticidas, 10 PFCs e 11 fármacos, incluindo 4 NSAIDs	PAR	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 350; Solvente de Extração: ACN/H ₂ O (3:1) com 1% de ácido fórmico.	SPE	UHPLC-MS/MS	97±6	Wille et al., 2011
		AS					—	
		KET					100±12	
		DIC					98±16	
Mexilhão-verde (<i>Perna viridis</i>)	7 EDCs, 37 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	DIC	SLE e Centrifugação	Solvente de Extração: ACN/MeOH (1:1); Foram adicionados 8 mL do solvente de extração à amostra (entre 1 e 1,5 g) a um tubo de 50 mL que foi depois agitado numa mesa vibratória (durante 16 horas a 200 rpm); Os tubos foram centrifugados (30 min a 12000 rpm) e o sobrenadante evaporado à secura (N ₂)	Sem Purificação	LC-MS/MS	55±5	Bayen et al., 2015
		IBU					91±8	
		NAP					41±3	

Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Preparação da Amostra			Método Analítico	Recuperação (%) ± DPR (%)	Ref.
			Método de Extração	Condições de Extração	Método de Purificação			
Amêijoia-boia (<i>Ruditapes decussatus</i>)	24 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	DIC	QuEChERS	Solvente de Extração: ACN 10 mL de ACN foram adicionados à amostra (1 g num tubo de 50 mL) e a solução foi agitada num vórtex (5 min) antes de ser transferido para os tubos QuEChERS (com uma determinada combinação de sais) que também foram agitados num vórtex (5 min); amostras foram depois centrifugadas (10 min a 4000 rpm);	dSPE	LC-MS/MS	Foram feitos vários estudos de recuperação	Rodríguez et al., 2019
		IBU						
		NAP						
Mexilhão-do-pacífico (<i>Mytilus edulis trossulus</i>)	3 estrogénios e 5 NSAIDs	DIC	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 350 Mistura de Solventes de Extração: MeOH:H ₂ O (1:1, v/v), EtOH:H ₂ O (1:1 v/v); ACN:H ₂ O (1:1 v/v). Condições otimizadas: pré-aquecimento durante 5 min a 80°C, 3 min de extração ao longo de três ciclos estáticos e uma pressão de 1500 psi	SPE	GC-MS	61±11	Wolecki et al., 2019
		NAP						
		KET						
		IBU						
		110±9						
		104±3						
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	7 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	PAR	PLE	PLE realizado num Dionex ASE 200 Solvente de Extração: H ₂ O ultrapura Condições otimizadas: pré-aquecimento durante 5 min a 100°C, 10 min de extração ao longo de um ciclo e uma pressão de 1500 psi	SPE	LC-MS/MS	74	Nuñez et al., 2016
		AS						
		KET						
		NAP						
		DIC						
		IBU						
							82	
							88	
							82	
							89	

Tabela 6 – Compilação de diferentes métodos de preparação de amostras (bivalves) para a determinação analítica de NSAIDs.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Preparação da Amostra			Método Analítico	Recuperação (%) ± DPR (%)	Ref.
			Método de Extração	Condições de Extração	Método de Purificação			
Mexilhão-do-mediterrâneo (Mytilus galloprovincialis)	41 compostos dos quais 3 NSAIDs	PAR	FUSLE seguida de filtração	Solvente de Extração: MeOH/Milliq H ₂ O (95:5); 0,5 g da amostra foram adicionadas com o solvente de extração a um recipiente de 40 mL e depois a etapa de FUSLE ocorreu durante 30 s; a extração ocorreu a 0°C; os extratos foram evaporados à secura (N ₂)	SPE	LC-MS/MS	112±8	Mijangos <i>et al.</i> , 2019
		DIC					101±8	
		KET					93±10	

Legenda: ACN – Acetonitrilo; AS – Ácido Salicílico; COD – Codeína; DAD – Detetor de Fotódodos; DE – Desregulador Endócrino; DIC – Diclofenac; dSPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva; EtOH – Etanol; FUSLE – Extração Sólida-Líquida Focalizada por Ultrassons; GC- Cromatografia Gasosa; H₂O – Água; IBU – Ibuprofeno; KET – Cetoprofeno; LC – Cromatografia Líquida; LOD – Limite de Detecção; LOQ – Limite de Quantificação; MA -Ácido Mefenâmico; MAME - Extração Micelar assistida por Micro-ondas; MeOH – Metanol; MS – Espectrometria de Massa; NAP – Naproxeno; NSAIDs – Anti-inflamatórios não Esteroides; PAR – Paracetamol; PHE – Fenazona; PIR – Piroxicam; PLE – Extração Líquida Pressurizada; PRO-PHE – Propifenazona; QuEChERS - Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe; DPR – Desvio Padrão Relativo; SLE – Extração Sólido-Líquido; SPE – Extração em Fase Sólida; UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massa em tandem; UV – Ultravioleta

Tabela 7 – Compilação de diferentes técnicas analíticas e respetivas condições na determinação analítica de NSAIDs em bivalves.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Método Analítico	Coluna Analítica	Gradiente de Eluição da Fase Móvel / Fluxo	Deteção	LOD e LOQ	Referência
Mexilhão-azul (<i>Mytillus edulis</i>)	5 fármacos, incluindo 2 NSAIDs	DIC	LC-MS/MS	Waters Sunfire C18, 150 x 2,1 mm, 3,5 µm	A) (80:20) 13mM Acetato de Amónia em H2O/ACN B) ACN 0,3 mL/min	ESI (+/-) Ion trap SRM	LOQ: 29 ng/g	McEneff et al., 2013; 2014
		MA					LOQ: 23 ng/g	
Ostra-do-pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)		COD					LOD: 0,02 ng/g; LOQ: 0,08 ng/g	
		PHE					LOD: 0,05 ng/g; LOQ: 0,18 ng/g	
		PRO-PHE					LOD: 0,01 ng/g; LOQ: 0,02 ng/g	
		PIR					LOD: 0,03 ng/g; LOQ: 0,11 ng/g	
		COD					LOD: 0,02 ng/g; LOQ: 0,06 ng/g	
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	23 fármacos (e metabolitos), incluindo 4 NSAIDs	PHE	UHPLC-MS/MS	Acquity HSS T3, 50 x 2,1 mm, 1,8 µm (ESI +) Acquity BEH C18 50 x 2,1 mm, 1,7 µm (ESI -)	ESI (+): A) MeOH B) 10 mM de Ácido Formico/Amónio a pH 3,2 0,5 mL/min. ESI (-): A) ACN B) 5 mM Acetato de Amónia/ Amónia a pH 8 0,6 mL/min	ESI (+/-) QqLIT SRM	LOD: 0,10 ng/g; LOQ: 0,32 ng/g	Alvarez-Muñoz et al., 2015 b
		PRO-PHE					LOD: 0,04 ng/g; LOQ: 0,15 ng/g	
		PIR					LOD: 0,06 ng/g; LOQ: 0,20 ng/g	
		COD					LOD: 0,02 ng/g; LOQ: 0,06 ng/g	
		PHE					LOD: 0,05 ng/g; LOQ: 0,17 ng/g	
Amêijoia-boa (<i>Chamelea gallina</i>)		PRO-PHE					LOD: 0,01 ng/g; LOQ: 0,02 ng/g	
		PIR					LOD: 0,04 ng/g; LOQ: 0,13 ng/g	

Tabela 7 – Compilação de diferentes técnicas analíticas e respetivas condições na determinação analítica de NSAIDs em bivalves.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Método Analítico	Coluna Analítica	Gradiente de Eluição da Fase Móvel / Fluxo	Deteção	LOD e LOQ	Referência
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	34 fármacos e metabólitos, incluindo 4 NSAIDs	DIC	UHPLC-MS/MS	Luna Omega Polar C18, 100 x 2,1 mm, 1,6 µm (condições ácidas) Waters Acquity BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7-µm (condições básicas)	Condições ácidas: A) H2O + 0,15% ácido fórmico B) (90:10) ACN em H2O com 0,15% ácido fórmico 0,5 mL/min Condições básicas: A) (95:5) H2O em ACN B) (90:10) ACN em H2O 0,5 mL/min	ESI (+/-) QqQ MRM	LOQ: 0,15 ng/g	Maskrey et al., 2021
		4 OH DIC					LOQ: 1,10 ng/g	
Ostra-do-pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)		IBU					-	
		NAP					LOQ: 8,50 ng/g	
		DIC					LOQ: 0,10 ng/g	
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	7 fármacos, incluindo 5 NSAIDs	4 OH DIC	LC-MS/MS	Ascentis Express Fused-Core C18, 50 x 4,6 mm, 2,7 µm	A) 0,5% ácido acético em H2O ultrapura B) ACN 0,6 mL/min	ESI (-) QqQ MRM	LOQ: 0,52 ng/g	Núñez et al., 2015
		IBU					-	
		NAP					LOQ: 5,62 ng/g	
		AS					LOD: 5 ng/g	
Mexilhão-zebra (<i>Dreissena polymorpha</i>)	NSAIDs	KET	LC-MS/MS	Poroshell 120 SB-C8, 50 x 2,1 mm, 2,7 µm	A) 0,01% ácido fórmico em H2O Milli-Q B) MeOH 0,6 mL/min	ESI (+) QqQ MRM	LOD: 50 ng/g	Daniele et al., 2016
		NAP					LOD: 2,5 ng/g	
		DIC					LOD: 5 ng/g	
		IBU					LOD: 50 ng/g	
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	7 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	DIC e produtos de transformação (Metabólitos)	HPLC-UV/DAD	Waters Nova-Pack C18, 150 x 3,9 mm, 4 µm	MeOH em H2O (pH 3,0 com ácido acético), 1,0 mL/min	Detetor UV	LOD: 0,17 ng/g; LOQ: 0,29 ng/g	Cueva-Mestanza et al., 2008
		KET					LOD: 0,12 ng/g; LOQ: 0,41 µg/g	
		NAP					LOD: 0,03 µg/g; LOQ: 0,10 µg/g	
		IBU					LOD: 0,06 µg/g; LOQ: 0,21 µg/g	

Tabela 7 – Compilação de diferentes técnicas analíticas e respetivas condições na determinação analítica de NSAIDs em bivalves.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Método Analítico	Coluna Analítica	Gradiente de Eluição da Fase Móvel / Fluxo	Deteção	LOD e LOQ	Referência
Mexilhão-azul (<i>Mytilus edulis</i>)	14 pesticidas, 10 PFCs e 11 fármacos, incluindo 4 NSAIDs	PAR	UHPLC-MS/MS	Nucleodur Pyramid C18, 100 x 2 mm, 1,8 µm	A) 0,08% ácido fórmico aquoso B) 0,08% ácido fórmico em ACN C) isopropanol	HESI (+) QqQ SRM	LOQ: 2,5 ng/g	Wille et al., 2011
		AS					LOQ: 10 ng/g	
		KET					LOQ: 5 ng/g	
		DIC					LOQ: 2,5 ng/g	
Mexilhão-verde (<i>Perna viridis</i>)	7 EDCs, 37 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	DIC	LC-MS/MS	Poroshell 120 SB-C18, 150 x 2,1 mm, 2,7 µm;	-	ESI (+/-) QqQ MRM	LOD: 0,24 ng/g	Bayen et al., 2015
		IBU					n/a	
		NAP					LOD: 1,4 ng/g	
Amêijoia-boia (<i>Ruditapes decussatus</i>)	24 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	DIC	LC-MS/MS	Kinetex EVO C18, 50 x 2,1 mm, 2,6 µm	Condições ácidas: A) H2O + 0,01 mM acetato de amónio + 0,5% ácido fórmico B) MeOH 0,3 mL/min Condições básicas: A) H2O + 0,05 amónia B) MeOH 0,5 mL/min	ESI (+/-) QqQ MRM	LOD: 0,84 ng/g	Rodrigues et al., 2019
		IBU					LOD: 0,6 ng/g	
		NAP					LOD: 0,75 ng/g	
Mexilhão-do-pacífico (<i>Mytilus edulis trossulus</i>)	NSAIDs*	DIC	GC-MS	Zebron ZB-5MSi (coluna capilar com sílica), 30 m x 0,25mm x 0,25 µm	-	-	LOD: 2 ng/g; LOQ: 5 ng/g	Wolecki et al., 2019
		NAP					LOD: 1 ng/g; LOQ: 4 ng/g	
		KET					LOD: 1 ng/g; LOQ: 4 ng/g	
		IBU					LOD: 1 ng/g; LOQ: 3 ng/g	
		PAR					LOD: 2 ng/g; LOQ: 5 ng/g	

Tabela 7 – Compilação de diferentes técnicas analíticas e respetivas condições na determinação analítica de NSAIDs em bivalves.

Espécie	Grupo Farmacológico	Fármaco	Método Analítico	Coluna Analítica	Gradiente de Eluição da Fase Móvel / Fluxo	Deteção	LOD e LOQ	Referência
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	7 fármacos, incluindo 3 NSAIDs	AS	LC-MS/MS	Ascentis Ex-press C18, 5 cm x 4,6 mm, 2,7 µm	A) 0,5% ácido etanoico em H ₂ O ultrapura B) ACN 0,6 mL/min	ESI (-) QqQ MRM	LOD: 2 ng/g	Núñez et al., 2016
		KET					LOD: 50 ng/g	
		NAP					LOD: 2,5 ng/g	
		DIC					LOD: 2,5 ng/g	
		IBU					LOD: 50 ng/g	
Mexilhão-do-mediterrâneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	41 compostos dos quais 3 NSAIDs	PAR	LC-MS/MS	Kinetex F5 100 A, 100 x 2,1 mm, 2,6 µm	A) H ₂ O/MeOH (95:5) B) MeOH/H ₂ O (95:5) Ambas as fases com 0,1% de ácido metanoico 0,3 mL/min	ESI (+/-) QqQ SRM	LOD: 20 ng/g	Mijangos et al., 2019
		DIC					LOD: 1 ng/g	
		KET					LOD: 2 ng/g	

Legenda: ACN – Acetonitrilo; AS – Ácido Salicílico; COD – Codeína; DAD – Detetor de Fotodíodos DIC – Diclofenac; ESI - Ionização por *Electrospray*; EtOH – Etanol; GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa; H₂O – Água; HESI – Ionização por *Electrospray* aquecida; IBU – Ibuprofeno; KET – Cetoprofeno; LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa em tandem; LOD – Limite de Deteção; LOQ – Limite de Quantificação; MA – Ácido Mefenâmico; MeOH – Metanol; MRM – Monitorização de Reações Múltiplas; MS – Espectrometria de Massa; NAP – Naproxeno; NSAIDs – Anti-inflamatórios não Esteroides; QqLIT – Quadrupolo Linear IT; QqQ – Triplo Quadrupolo; SRM – Monitorização de Reações Seleccionadas; UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massa em tandem.

8.1. Preparação das Amostras

A preparação das amostras consiste na transformação de uma matriz real numa amostra que possa ser analisada (Pavlović *et al.*, 2007). Uma correta preparação da amostra é fundamental para uma correta determinação dos fármacos, e pode englobar várias etapas como a colheita, amostragem e pré-tratamento das amostras, a extração dos analitos e a posterior purificação dos mesmos, para que possam ser analisados através das diversas técnicas instrumentais que serão mais à frente mencionadas (Miller *et al.*, 2018). Por vezes pode ser uma etapa duradoura e extensa devido à complexidade das matrizes bióticas com que se trabalha, mas também pelas características físico-químicas tanto das matrizes como dos próprios analitos (Núñez *et al.*, 2015; Pavlović *et al.*, 2007).

Idealmente, os processos de preparação das amostras devem ser rápidos, exatos e precisos, mantendo a integridade da amostra. No entanto, uma das problemáticas no desenvolvimento de métodos analíticos multiresíduo é a eficácia na extração dos analitos da amostra, devido às diferenças que existem nas propriedades físico-químicas dos diferentes grupos terapêuticos (Huerta *et al.*, 2012).

Os principais objetivos desta etapa de preparação são obter amostras bem identificadas e prontas a extrair os analitos de interesse e remover potenciais interferentes destas e aumentar a concentração dos analitos para facilitar a determinação. Caso seja necessário, outro processo que pode ocorrer é a conversão do analito para uma forma mais apropriada à sua análise (Pavlović *et al.*, 2007).

8.1.1. Pré-tratamento

Este é o primeiro passo na preparação das amostras e consiste na colheita, amostragem, limpeza e armazenamento (normalmente em congeladores próprios) das amostras a analisar. Um processo que ocorre bastante no pré-tratamento das amostras é a liofilização ou criodessecação utilizando um liofilizador (Miller *et al.*, 2018). A liofilização consiste na congelação da água presente na amostra seguida da remoção desta por sublimação, o que permite congelar e preservar as amostras em vácuo durante períodos de armazenamento prolongados (Nireesha *et al.*, 2013).

Tanto no pré-tratamento como na extração de amostras como os bivalves, as técnicas utilizadas são, por norma, aplicadas à parte do tecido edível destes moluscos, sendo este o principal alvo da metodologia analítica.

8.1.2. Extração

Os principais objetivos das etapas de extração e de purificação das amostras são a recuperação dos analitos de interesse da matriz, que se encontram por norma a concentrações muito baixas (entre os ng/L e os µg/L), e a remoção de eventuais interferentes não específicos como fosfolípidos, sais, metabolitos, proteínas, resinas, entre outros componentes biológicos e endógenos da matriz (Bayen *et al.*, 2015). Estes componentes podem ser co-extraídos com os analitos alvos, comprometendo a determinação das amostras, em particular amostras biológicas como bivalves, uma vez que os componentes podem ter efeitos supressores ou estimuladores do sinal, o que se reflete em cromatogramas complexos.

De modo a poder extrair os analitos de interesse das amostras, estas devem estar homogeneizadas. Um dos primeiros passos da extração é então a homogeneização, que consiste na formação de uma suspensão ou emulsão a partir dos tecidos sólidos (Takach, 2013). A homogeneização dos tecidos pode ser conseguida adotando técnicas mecânicas que utilizam instrumentos como liquidificadoras, moinhos, agitadores, misturadores vortex ou então técnicas de sonegação que utilizam instrumentos como homogeneizadores ultrassónicos que homogeneizam os tecidos através de ondas sonoras (Miller *et al.*, 2018). O sucesso deste passo é fulcral para que a extração seja de qualidade (Martínez Bueno *et al.*, 2013).

Após a homogeneização segue-se a extração propriamente dita a partir de técnicas de extração que utilizam solventes orgânicos. Acetato de etilo, acetonitrilo (ACN), acetona e metanol (MeOH) são alguns dos solventes orgânicos mais utilizados nas diversas técnicas de extração (Miller *et al.*, 2018). De facto, o ACN foi o solvente de extração mais utilizado ao longo da bibliografia revista, sendo misturado em diferentes proporções com outros solventes como água (em McEneff *et al.*; 2013; 2014; Núñez *et al.*, 2015; Daniele *et al.*, 2016), ácido fórmico (em Maskrey *et al.*, 2021 e Wille *et al.*, 2011) e MeOH (Bayen *et al.*, 2015) ou apenas o próprio ACN (Rodrigues *et al.*, 2019).

Para extrair com eficácia os analitos deve-se escolher a técnica de extração que mais se adapta às propriedades do analito e que remove mais eficazmente os interferentes. São várias as técnicas utilizadas na extração de fármacos em bivalves e outra biota aquática que podem ser encontradas descritas na bibliografia e que serão referidas de seguida.

8.1.2.1. Extração Líquida Pressurizada

Também designada por extração acelerada de solventes (ASE), a extração líquida pressurizada (PLE) é um dos métodos de extração mais utilizados na extração de fármacos de matrizes, apresentando algumas vantagens em relação a outras técnicas de extração, como maior reprodutibilidade (uma vez que é um sistema automatizado), o menor uso de solventes e também um menor tempo gasto na preparação das amostras (Pavlović *et al.*, 2007).

A extração acontece num sistema de fluxo fechado que tem uma célula de extração e um forno, onde acontece a extração propriamente dita. Para tal, são utilizados solventes orgânicos a temperaturas e pressões que podem variar entre os 100 e os 180°C, e os 1500 e 2000 psi. Ao aumentar estas duas condições, a solubilidade dos analitos aumenta e a viscosidade dos solventes diminui e por conseguinte, há uma maior difusão dos analitos para o solvente, o que leva a que aumente a eficácia da extração dos analitos da matriz (Somenath Mitra, 2003).

Apesar de apresentar algumas desvantagens como o alto custo do equipamento ou a seletividade da técnica, é bastante utilizada na extração de fármacos (entre os quais os NSAIDs) em bivalves como se pode verificar na Tabela 6 (McEneff *et al.*, 2013; 2014; Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a,b; Wille *et al.*, 2011; Wolecki *et al.*, 2019; Núñez *et al.*, 2016; Martínez Bueno *et al.*, 2013), devido ao facto de ser uma técnica rápida, semiautomática (podem ser processadas várias amostras de tamanhos diferentes) e que utiliza pouco volume de solvente (Núñez *et al.*, 2017).

8.1.2.2. QuEChERS

Outra das técnicas de extração é a QuEChERS que é um acrónimo para *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, e tal como este indica, oferece algumas vantagens como a facilidade na sua aplicação, a rapidez e os reduzidos custos no seu uso, sendo um procedimento bastante utilizado em matrizes alimentares na deteção de vários contaminantes, como pesticidas (Martínez Bueno *et al.*, 2013). Foi primeiro introduzida por Anastassiades *et al.*, (2003) para extrair pesticidas em matrizes alimentares e envolve uma extração a microescala utilizando ACN e outros solventes misturados com sais (para favorecer a separação entre a água e o solvente), ligandos e *buffers* (como o de citrato utilizado por Daniele *et al.*, 2016 e Martínez Bueno *et al.*, 2013), que extraem os resíduos orgânicos presentes nas amostras, incluindo os analitos de interesse (Miller *et al.*, 2018). De seguida, o extrato obtido é purificado usando a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE).

ACN é o solvente de eleição na extração QuEChERS uma vez que gera menos interferentes que outros solventes como acetona ou acetato de etilo e é um solvente que é mais facilmente separado da água permitindo uma extração mais eficiente (Anastassiades *et al.*, 2003; Núñez *et al.*, 2015).

São várias as metodologias analíticas otimizadas presentes na bibliografia revista relativa à determinação de fármacos que utilizam a QuEChERS e outras variações desta como se pode verificar na Tabela 6 (Núñez *et al.*, 2015; Daniele *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019; Martínez Bueno *et al.*, 2013). Apresenta boas percentagens de recuperação dos analitos quando em comparação com outras técnicas como descrito em Martínez Bueno *et al.*, (2013) que comparou a eficácia na extração de dois anticonvulsivos em Mexilhão-do-Pacífico (*Mytilus galloprovincialis*), utilizando as técnicas de QuEChERS e de PLE, com a primeira a apresentar melhores resultados.

8.1.2.3. Outras técnicas de extração

Na Tabela 6 são também apresentadas outras técnicas especializadas de extração como é o caso da extração micelar assistida por micro-ondas (MAME), aplicada por Cueva-Mestanza *et al.* (2008), onde foi usado um surfactante micelar para extrair os analitos, obtendo percentagens de recuperação muito elevadas entre os 97 ± 4 (NAP) e os 106 ± 7 (IBU).

Existem também técnicas de extração não especializadas que utilizam ultrassons (que promovem o contacto entre a matriz e o solvente), centrifugadoras e mecanismos de filtração, após uma extração simples sólida-líquida (SLE), que recorre a um determinado solvente orgânico, como foi descrito em Bayen *et al.*, (2015) e Maskrey *et al.*, (2021). A SLE é uma técnica validada por vários estudos e com boas percentagens de recuperação dos fármacos. Continua a ser uma técnica bastante utilizada na extração de fármacos e outros CECs, e a sua eficácia depende de qual o solvente orgânico ou mistura destes utilizada, com destaque para o ACN e o MeOH como os mais prevalentes (Núñez *et al.*, 2017).

Outra técnica é a extração sólida-líquida focalizada por ultrassons (FUSLE) que utiliza um extrator fechado, equipado com uma sonda sónica que aplica ondas ultrassónicas à amostra. Consiste numa modificação da técnica SLE e reduz a quantidade de solvente orgânico usado na fase de extração e também a quantidade de amostra necessária (Núñez *et al.*, 2017). Esta técnica foi aplicada por Mijangos *et al.*, (2019), conseguindo percentagens de recuperação entre os 93 e os 112% para os NSAIDs (PAR, KET e DIC).

8.1.3. Purificação

Uma das problemáticas associadas à determinação de analitos em matrizes complexas como os bivalves é a perturbação do sinal pelos interferentes inerentes da matriz que, como mencionado atrás, são co-extraídos com os analitos-alvos devido à sua alta polaridade e estrutura química semelhante a estes analitos. Assim sendo, muitos métodos descritos e validados na bibliografia não dispensem um passo de purificação após a extração de modo a combater a problemática dos interferentes (Cunha *et al.*, 2017).

Também designada por *clean-up*, é nesta fase que são removidos os interferentes não específicos previamente mencionado sem que os analitos de interesse sejam também removidos. Isto permite proteger o sistema analítico, mas também aumentar a precisão e exatidão do método. Outro dos objetivos desta fase da preparação das amostras é aumentar a baixa concentração dos analitos presentes na amostra de modo a aumentar a sensibilidade do método, o que permite uma determinação analítica mais eficaz.

8.1.3.1. Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais utilizada na preparação de amostras de matrizes de cariz alimentar, mas também de amostras ambientais devido à sua capacidade de purificar e pré-concentrar os extratos. Esta técnica é bastante usada na deteção de fármacos e tem sido utilizada em diversos estudos como método de purificação (Tabela 6). É uma técnica bastante versátil cujo principal objetivo é garantir que a amostra não tem interferentes da matriz (reduzindo o efeito desta), e que os analitos de interesse estão em concentração suficiente para serem detetados (Lucci *et al.*, 2012).

Quando comparado com outras técnicas como a extração líquido-líquido (LLE), a SPE oferece algumas vantagens como (Pavlović *et al.*, 2007):

- Maior eficácia na recuperação dos analitos (% Recuperação);
- Melhor seletividade, especificidade e reprodutibilidade;
- Utiliza menos solvente orgânico;
- Rapidez na preparação das amostras;
- Pode ser automatizada, havendo menor manuseamento.

O princípio da SPE é semelhante ao princípio da cromatografia descrito mais à frente, e passa pela partição ou adsorção dos analitos presentes numa amostra à coluna. Este processo ocorre entre duas fases: a fase móvel (fase líquida ou gasosa) que corresponde à amostra (com analitos) previamente acondicionada e um determinado solvente que atravessam a fase

estacionária (fase sólida), que consiste numa coluna com uma membrana de SPE contendo um determinado adsorvente onde os analitos de interesse ficam retidos. A escolha do adsorvente é um passo chave da SPE pois permite controlar parâmetros como a afinidade e seletividade. A seletividade do adsorvente depende do tipo de interação entre o analito e o adsorvente, podendo estas ser hidrofóbicas ou hidrofílicas. O desenrolar da SPE está então diretamente dependente da natureza e das propriedades físico-químicas do analito como a sua polaridade, o seu coeficiente de partição ($\log K_{ow}$) e a sua adsorção, mas também das propriedades da própria matriz (Lucci *et al.*, 2012).

A técnica tem 4 etapas (Figura 4): o acondicionamento da coluna, a extração, a lavagem e a eluição. Na primeira etapa de acondicionamento ou pré-lavagem, pretende-se preparar e ativar a coluna enchendo-a, por norma, com um solvente orgânico (ex: MeOH) seguido de água, garantindo que o agente adsorvente interage com a amostra e adsorve os analitos de interesse. Segue-se a extração propriamente dita que ocorre após a aplicação da amostra na coluna, e é nesta etapa que os analitos de interesse e alguns interferentes ficam retidos no adsorvente da coluna, enquanto que outros interferentes da matriz não adsorvem na mesma. Utilizando água, faz-se a lavagem da coluna, de modo a remover esses eventuais interferentes ainda presentes na matriz. Por fim procede-se à eluição, que consiste na recuperação dos analitos de interesse através de solventes orgânicos (Lucci *et al.*, 2012; Somenath Mitra, 2003).

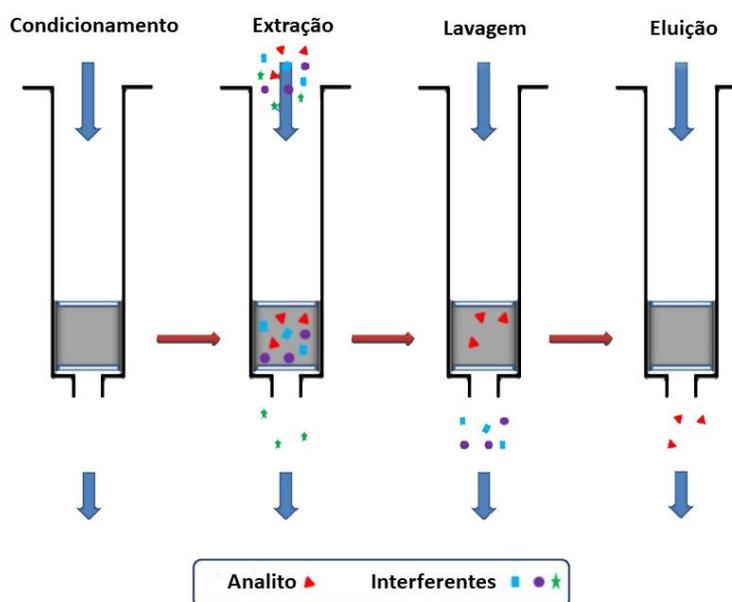


Figura 4 – Esquema das etapas na SPE. (Adaptado de Lucci *et al.*, 2012).

Na Tabela 8 estão descritas as condições em que se processou a SPE de alguns artigos da bibliografia revista, relativa à extração e purificação de fármacos em bivalves, onde se

destaca a prevalência da utilização dos solventes MeOH e água ultrapura (purificada por norma em sistemas Milli-Q) ao longo das 4 etapas da SPE.

Por norma, as colunas de adsorção utilizadas na SPE de NSAIDs e outros fármacos são colunas poliméricas de fase reversa constituídas por um agente adsorvente polar, de modo a remover lípidos e outras moléculas não-polares (Huerta *et al.*, 2012). As colunas Oasis HLB, que têm um equilíbrio hidrofílico-lipófilo, foram as colunas mais utilizadas na bibliografia revista (como pode ser observado na Tabela 8) devido à sua versatilidade e eficiência comprovada na extração de fármacos (Silva *et al.*, 2014). Também as colunas Strata-X foram bastante utilizadas (McEneff *et al.*, 2013;2014; Wille *et al.*, 2011; Wolecki *et al.*, 2019) pois apesar de normalmente ser necessário ajustar o pH destas, são consideradas bastante eficazes na extração de fármacos em diferentes tipos de amostras (Silva *et al.*, 2014).

Após a SPE, a solução obtida (que contém o extrato da amostra) é evaporada com o auxílio de azoto associado ao sistema SPE, evitando a decomposição dos analitos de interesse. A solução evaporada será depois reconstituída num solvente apropriado, antes de ser introduzida diretamente num determinado equipamento de análise instrumental, onde a solução é filtrada para remover partículas interferentes e que possam ainda estar presentes no extrato da amostra (Posyniak *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007).

Tabela 8 – Condições da SPE da bibliografia revista.

Coluna	Acondicionamento	Lavagem	Eluição	Ref.
Strata-X (6 mL, 200 mg)	6 mL MeOH e 6 mL de H ₂ O ultrapura	6 mL de H ₂ O ultrapura	três vezes 3 mL Etil de acetato/Acetona (1:1)	McEneff <i>et al.</i> , 2013; 2014
Oasis HLB (6 mL, 200mg)	6 mL MeOH e 6 mL de H ₂ O	6 mL H ₂ O	6 mL MeOH	Alvarez-Muñoz <i>et al.</i> , 2015a,b
Oasis HLB (6 mL, 150 mg)	duas vezes 5 mL MeOH e 5 mL de H ₂ O ultrapura	duas vezes 5 mL de H ₂ O ultrapura	duas vezes 0,75 mL MeOH	Cueva-Mestanza <i>et al.</i> , 2008
Strata-X (6 mL, 200 mg)	5 mL MeOH e 5 mL de H ₂ O ultrapura	5 mL de H ₂ O ultrapura	duas vezes 3 mL MeOH	Wille <i>et al.</i> , 2011
Strata-X (3 mL, 200 mg)	3 mL MeOH e 3 mL H ₂ O desionizada	3 mL MeOH 5% em H ₂ O seguido de 3 mL de hexano	duas vezes 3 mL MeOH	Wolecki <i>et al.</i> , 2019
Oasis MAX (6 mL, 150 mg)	5 mL MeOH e 5 mL de H ₂ O ultrapura	3 mL de H ₂ O ultrapura com 5% NH ₄ OH seguido de 10 mL MeOH	10 mL MeOH com 5% HCOOH	Núñez <i>et al.</i> , 2016

Oasis HLB	2 mL MeOH e 2 mL de água	-	6 mL MeOH	Martínez Bueno <i>et al.</i> , 2013
Oasis HLB (200 mg)	5 mL MeOH e duas vezes 5 mL H ₂ O ultrapura (uma das quais a pH = 2)	6 mL de H ₂ O ultrapura	6 mL MeOH	Mijangos <i>et al.</i> , 2019

8.1.3.2. Extração em Fase Sólida Dispersiva

Outra técnica de purificação de extratos é a extração em fase sólida dispersiva (dSPE), que se baseia na dispersão de um adsorvente sólido (maioritariamente de sílica), adicionado diretamente às amostras líquidas, aquando da extração destas. Esta técnica é bastante utilizada, uma vez que permite a extração, isolamento, *clean-up* e até a pré-concentração dos analitos em matrizes complexas. Apresenta vantagens devido à sua seletividade, robustez e versatilidade, mas também pelo facto de ao usar a dSPE não serem necessárias etapas como a centrifugação e a filtração (Islas *et al.*, 2017).

O uso desta técnica de purificação está frequentemente associada à técnica de extração QuEChERS tal como foi descrito em Daniele *et al.*, (2016), Martínez Bueno *et al.*, (2013) e Rodrigues *et al.*, (2019) mas pode também ser utilizada como estratégia de *clean-up* após técnicas como SLE (Núñez *et al.*, 2017).

8.2. Análise Instrumental

Após a preparação da amostra, segue-se a sua separação e determinação. Nesta etapa ocorre a separação, deteção, identificação e quantificação dos analitos em estudo e, para tal, pode recorrer-se a diferentes métodos instrumentais. Destacam-se, no entanto, as técnicas de cromatografia que são os métodos instrumentais mais utilizados na determinação de fármacos em matrizes biológicas como os bivalves.

Os avanços tecnológicos nas técnicas cromatográficas e de espectrometria permitiram desenvolver métodos instrumentais analíticos altamente sensíveis e potentes o que, por sua vez, proporcionou a investigação e determinação de CECs como os fármacos em matrizes ambientais complexas (Noguera-Oviedo e Aga, 2016), mas também uma nova visão sobre o estado de contaminação a nível ambiental, da biota e do ser humano.

De seguida, vou abordar algumas das técnicas cromatográficas e de espectrometria mais utilizadas no que toca à determinação de NSAIDs em bivalve como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida (LC), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a espectrometria de massa (MS).

8.2.1. Cromatografia

A cromatografia de coluna é um processo físico de separação dos componentes da amostra entre duas fases distintas tal como acontece no sistema SPE: a fase móvel correspondente à solução (líquida ou gasosa) que é eluída ao longo da coluna cromatográfica, e a fase estacionária que está associada a uma coluna ou a uma superfície plana (no caso da cromatografia planar) contendo um agente adsorvente como sílica ou alumínio. A amostra ao ser eluída, interage quimicamente com a fase estacionária, adsorvendo-a, e é nesta fase que ocorre a separação dos analitos presentes na amostra a velocidades diferentes, de acordo com as propriedades físico-químicas supramencionadas, e que definem qual a distribuição dos analitos da amostra ao longo da coluna (Harris, 2007; Ötles, 2012).

8.2.1.1. Cromatografia Gasosa

A GC é uma técnica que apareceu nos anos 50 e que pode ser aplicada na determinação de diversos tipos de analitos como fármacos, pesticidas ou lípidos em diversos tipos de amostras, com particular destaque para amostras de cariz alimentar (Ötles, 2012).

Após a injeção da amostra na coluna do cromatógrafo, esta é eluída juntamente com gases inertes designados gases de arrastamento (como p.e. hidrogénio ou hélio), pertencentes à fase móvel da cromatografia e que difundem os componentes da matriz (líquidos voláteis ou gasosos) ao longo da fase estacionária. Esta difusão permite separar os componentes da amostra, incluindo os analitos de interesse, e posteriormente determiná-los. Os componentes saem da coluna a diferentes velocidades dissolvidos na fase móvel, e à medida que saem, um detetor regista a quantidade de componente que foi eluído ao longo do tempo num cromatograma (registo gráfico dimensional) (Harris, 2007).

Uma vez que a GC é utilizada principalmente para a análise de compostos voláteis e não polares, quando a determinação de fármacos é feita por GC, é necessária uma fase extra na preparação da amostra (Ötles, 2012). Essa fase designa-se derivatização, e é o processo pelo qual os analitos são quimicamente alterados para terem outras propriedades e poderem ser mais facilmente separados e determinados. No caso dos fármacos, a necessidade de um passo extra nas análises por GC-MS devido à polaridade e à volatilidade limitada que alguns apresentam torna a cromatografia líquida (LC) o método de eleição para a determinação destes analitos (McEneff *et al.*, 2013).

No entanto, Wolecki *et al.*, (2019) utilizou a GC como método analítico na determinação de 5 NSAIDs e 3 estrogénios obtendo percentagens de recuperação que variavam entre os $61 \pm 11\%$ (DIC) e os $110 \pm 9\%$ (KET).

8.2.1.2 Cromatografia Líquida

A LC surge então como alternativa à GC e à problemática da volatilidade insuficiente que muitos dos componentes como os fármacos apresentam (Harris, 2007). É uma técnica de cromatografia em coluna (fase estacionária consiste numa coluna de vidro ou de metal), e é nesta que ocorre a separação da mistura dos analitos, tal como acontece na GC. É considerada uma técnica bastante diversificada, podendo apresentar variações como a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), a cromatografia líquida nano (nanoLC) e a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Kazakevich e LoBrutto, 2007).

8.2.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão

Também designada de cromatografia de alta performance, a HPLC (ou apenas LC) é a técnica de LC mais utilizada na determinação de fármacos e a construção do primeiro equipamento deste tipo ocorreu em 1965 quando Csaba Horváth da Universidade de Yale acoplou uma bomba de alta pressão ao sistema clássico de LC (Harris, 2007; Ötles, 2012).

Apresenta-se como uma evolução tecnológica relativamente à abordagem tradicional de LC de fluxo por gravidade, uma vez que no sistema HPLC existe, como mencionado em cima, uma bomba de alta pressão que bombeia a fase móvel para a coluna, permitindo uma separação mais rápida dos constituintes da amostra quando comparada com a separação tradicional, onde apenas atua a gravidade para o efeito (Kazakevich e LoBrutto, 2007). Estas características do sistema HPLC viabilizam separações com uma resolução superior, um limite de deteção mais baixo e no geral uma cromatografia mais eficiente e de alta performance (Harris, 2007).

O sistema HPLC (Figura 5) é constituído normalmente por: um reservatório de solventes que permite o contínuo funcionamento do sistema; uma bomba de alta pressão; um injetor que introduz a amostra juntamente com a fase móvel (solvente) na coluna; uma coluna cromatográfica, onde acontece a separação dos analitos da mistura; um detetor, que mediante um sinal elétrico regista a resposta dos analitos em função do seu tempo de retenção; e um sistema de dados e de controlo do sistema que é um sistema computadorizado que controla o

próprio sistema HPCL e onde é formado o cromatograma mediante os registos do detetor (Kazakevich e LoBrutto, 2007; Salvato *et al.*, 2012).

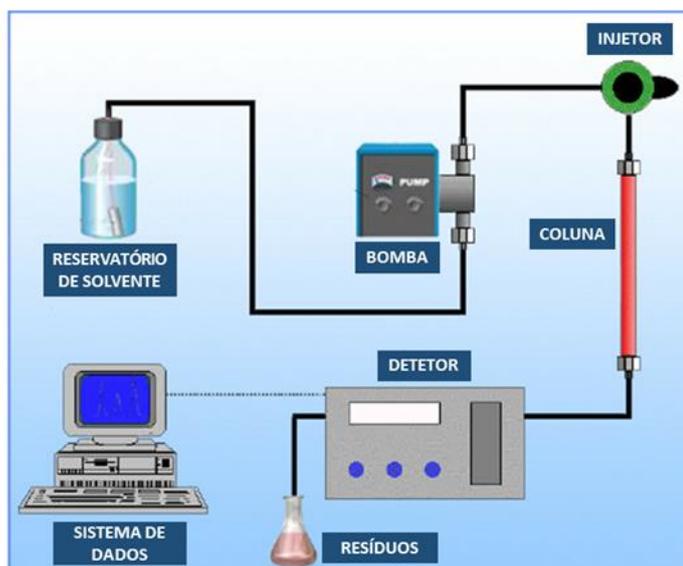


Figura 5 – Esquema representativo dos componentes típicos de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). (Adaptado de Salvato *et al.*, 2012).

De facto, a técnica de LC foi a técnica de separação analítica mais utilizada pelos autores na bibliografia revista e resumida nas Tabelas 6 e 7, com apenas uma das doze metodologias apresentadas preferir a utilização de GC em relação à LC (Wolecki *et al.*, 2019). De realçar também a utilização de UHPLC por 3 autores (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a,b; Maskrey *et al.*, 2021; Wille *et al.*, 2011), o que se justifica pelo facto de esta técnica estar associada a uma maior rapidez, sensibilidade e eficiência uma vez que utiliza colunas mais curtas e estreitas, bem como pressões mais elevadas e fases móveis com maior mobilidade (Silva *et al.*, 2014).

De acordo com a polaridade da fase estacionária adotada, a coluna cromatográfica aplicada na LC pode ser de dois modos: fase normal ou fase reversa. Quando a fase estacionária apresenta um adsorvente polar e a fase móvel corresponde a um solvente apolar (ou lipofílico), trata-se de fase normal. Por outro lado, caso a fase estacionária seja apolar e a fase móvel polar, trata-se de fase reversa que é um modo mais abrangente, podendo ser aplicado a compostos polares e apolares, o que justifica a maior utilização deste modo (Ötles, 2012).

As colunas cromatográficas são por norma colunas de metal fechadas e com partículas microporosas de um determinado substrato incorporadas. Na bibliografia revista foram utilizadas apenas colunas de fase reversa (lipofílicas) de diferentes dimensões (Tabela 7) e constituídas por partículas microporosas de sílica C18 (McEneff *et al.*, 2013; 2014; Alvarez-

Muñoz *et al.*, 2015 a, b; Maskrey *et al.*, 2021; Núñez *et al.*, 2015; Cueva-Mestanza *et al.*, 2008; Wille *et al.*, 2011; Bayen *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019; Núñez *et al.*, 2016; Martínez Bueno *et al.*, 2013; Mijangos *et al.*, 2019) ou C8 (Daniele *et al.*, 2016) como absorvente. Isto deve-se ao facto das colunas de sílica C18 terem uma capacidade comprovada de separar de forma eficaz a maioria dos compostos farmacêuticos ionizáveis (Yilmaz, Asci e Erdem, 2014) entre os quais se incluem os NSAIDs (Ali, 2012).

Os solventes utilizados na fase móvel vão influenciar o tempo de retenção dos analitos à coluna cromatográfica (fase estacionária) auxiliando a separação e eluição que ocorre nesta. Como se pode verificar na Tabela 7, os solventes mais utilizados no gradiente de eluição da fase móvel foram H₂O, MeOH e ACN, tanto misturados em determinadas proporções como isoladamente (solventes polares). ACN e MeOH são considerados modificadores orgânicos de eluição e uma vez que são menos polares são misturados com H₂O por vários autores na bibliografia revista (McEneff *et al.*, 2013; 2014; Maskrey *et al.*, 2021; Cueva-Mestanza *et al.*, 2008; Martínez Bueno *et al.*, 2013; Mijangos *et al.*, 2019) devido à sua maior polaridade (Trevor Hopkins, 2019).

Aos solventes mencionados são adicionados aditivos que podem ser ácido ou bases, e a escolha de um ou outro deve ser baseada nas características dos analitos de interesse uma vez que estes aditivos podem condicionar a separação e a sensibilidade da fonte de ESI (Silva *et al.*, 2014). Nos artigos revistos foram adicionados diferentes tipos de aditivos aos gradientes de eluição da fase móvel como observado na Tabela 7. Houve uma preferência dos autores na utilização de fases móveis ácidas adicionando ácido fórmico, ácido acético, ácido etanoico ou ácido metanoico em diferentes percentagens (Núñez *et al.*, 2015;2016; Daniele *et al.*, 2016; Cueva-Mestanza *et al.*, 2008; Wille *et al.*, 2011; Martínez Bueno *et al.*, 2013; Mijangos *et al.*, 2019) enquanto que outros optaram por fases móveis em condições ácidas e básicas adicionando aditivos ácidos e básicos como amónia ou acetato de amónia (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a,b; Maskrey *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2019). Já McEneff *et al.*, 2013; 2014 optou por uma fase móvel básica adicionando 13mM de acetato de amónia a uma solução de H₂O/ACN (80:20).

A utilização predominante de fases móveis ácidas deve-se ao facto da ionização de compostos com pKas baixos (como é o caso da maioria dos NSAIDs cujos pKas são mencionados na Tabela 2), ser inibida a pHs ácidos. Esta inibição leva a que os compostos se tornem menos polares, aumentando as suas interações com a fase estacionária, favorecendo a sua separação (Nemoto, 2019).

Relativamente aos fluxos de injeção no cromatógrafo (das fases móveis) da bibliografia revista, estes variaram entre 0,3 mL/min (McEneff *et al.*, 2013; 2014; Rodrigues *et al.*, 2019 e Mijangos *et al.*, 2019) e 1 mL/min (Cueva-Mestanza *et al.*, 2008).

8.2.2. Detetores

Os sistemas cromatográficos como o de HPLC têm, como demonstra a Figura 5, um detetor acoplado. Idealmente, um detetor deve ser linear, seletivo, apresentar boa estabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade. No entanto, não existe um detetor que satisfaça todos estes parâmetros de forma ideal e a escolha do detetor deve ser baseada no objetivo da análise instrumental e no tipo de amostra que vai ser analisada (Salvato *et al.*, 2012).

São vários os detetores que podem ser acoplados às técnicas de LC como o detetor de Díodos (DAD), entre outros. No entanto, no que toca à determinação de fármacos, e em particular de NSAIDs em bivalves, a técnica de MS é sem dúvida o detetor mais prevalente na bibliografia como pode ser observado na Tabela 6 e 7.

8.2.2.1. Espectrometria de Massa

Uma das problemáticas associadas às técnicas cromatográficas como a HPLC é a ambiguidade na identificação do analito, principalmente quando estes apresentam tempos de retenção iguais nos cromatogramas. Este problema pode ser contornado ao acoplar um determinado detetor de MS às técnicas cromatográficas, garantindo uma determinação inequívoca dos analitos presentes na amostra (Ötles, 2012). A MS é uma técnica bastante utilizada na determinação de analitos, estando associada a uma determinação fidedigna devido à sua alta sensibilidade, seletividade e especificidade (Kazakevich e LoBrutto, 2007).

Esta técnica caracteriza-se pela ionização dos analitos através de métodos como ionização por *electrospray* (ESI) ou ionização por *electrospray* aquecida (HESI) levando à formação de iões, sendo ESI a técnica mais utilizada nos artigos revistos. Apenas Wille *et al.*, (2011) utilizou HESI como técnica de ionização. O método ESI aplicado pode ser positivo (+ESI) formando catiões (Daniele *et al.*, 2016; Wille *et al.*, 2011) ou negativo formando aniões (Núñez *et al.*, 2015; 2016). Alguns autores da bibliografia revista como McEneff *et al.*, (2013; 2014); Alvarez-Muñoz *et al.*, (2015 a,b); Maskrey *et al.*, (2021); Bayen *et al.*, (2015); Rodrigues *et al.*, (2019) e Mijangos *et al.*, (2019) optaram por utilizar ambos os métodos de ionização.

Os iões formados são separados de acordo com o rácio entre a massa molecular e a sua carga (m/z). Este rácio é medido por um analisador de massa (componente do

espectrómetro de massa) gerando um sinal que é interpretado e registado por um sistema de dados originando um gráfico da resposta do detetor em função do valor de m/z (Harris, 2007). Existem diferentes analisadores de massa utilizados na MS, destacando-se o analisador de massa triplo quadrupolo (QqQ) como o mais utilizado na determinação de NSAIDs em bivalves (Tabela 7), sendo também utilizado o analisador de massa de armadilha de iões (*ion trap*) (McEneff *et al.*, 2013; 2014) ou de quadrupolo linear IT (QqLIT) (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015 a, b).

Na maioria dos espectrómetros de massa, há combinação de um ou vários analisadores de massa. Este sistema é normalmente designado por espectrometria de massa em tandem (MS/MS ou MS²) e permite, para além de separar os iões e medir o rácio m/z , estudar a estrutura individual do analito de interesse (Kazakevich e LoBrutto, 2007). Esta característica aliada à alta sensibilidade e capacidade de detetar concentrações vestigiais de vários analitos (simultaneamente) tornam a LC-MS/MS a técnica de eleição no que toca à determinação de fármacos em matrizes complexas como os bivalves (Silva *et al.*, 2014).

8.3. Eficiência Analítica

A eficiência ou validação analítica de qualquer metodologia é feita com o intuito de demonstrar a eficácia dessa mesma metodologia, e que esta é apropriada e aplicável para o propósito a que se propõe. Para determinar o desempenho das metodologias analíticas, recorre-se a parâmetros estabelecidos para a metodologia que se pretende validar e apenas um processo de validação bem definido e documentado, consegue garantir a objetividade que o método analítico visa ter. Os resultados dos parâmetros definidos para a validação, são um fator chave para que uma metodologia possa ser considerada de confiança (Ozkan, 2018).

Numa vertente de segurança alimentar e de saúde pública, métodos analíticos validados são fundamentais para garantir a qualidade e segurança de géneros alimentícios e também para monitorizar efeitos toxicológicos no sistema uma vez que, apenas a validação de uma metodologia analítica permite que esta seja aplicada em diferentes laboratórios e em diferentes matrizes.

No que toca à deteção e quantificação de analitos em matrizes biológicas, os principais parâmetros analíticos de validação da metodologia são por norma validados utilizando amostras fortificadas ou *spiked* (Daniele *et al.*, 2016), que são amostras a que foram adicionadas uma quantia definida e conhecida de um ou vários analitos, permitindo comparar a resposta com a curva de calibração (Harris, 2007).

Estes parâmetros foram discutidos e definidos por vários representantes da comunidade científica e de agências reguladoras internacionais incluindo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), tendo sido harmonizados na *International Conference on Harmonization* (ICH) de 1995. Alguns dos parâmetros característicos são preconizados na nota relativa à validação de uma metodologia analítica da EMA (EMA, 1995) e também na diretriz sobre a validação de métodos bioanalíticos da EMA (EMA, 2011):

- ❖ Linearidade
- ❖ Limites Analíticos
- ❖ Precisão: Repetibilidade; Precisão Intermédia; Reprodutibilidade
- ❖ Exatidão
- ❖ Seletividade
- ❖ Sensibilidade
- ❖ Eficácia de Extração
- ❖ Efeito de Matriz
- ❖ Robustez

8.3.1. Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade de uma metodologia é a capacidade desta fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração dos analitos em análise, dentro de um determinado alcance de aplicação, também designado faixa de trabalho (Swartz e Krull, 1997). A faixa de trabalho define-se como o intervalo de concentrações em que se consegue garantir que o método analítico é linear, exato e preciso (Harris, 2007). A linearidade é estudada em virtude da curva de calibração de cada analito, podendo esta ser baseada em soluções padrão preparadas com o solvente e soluções preparadas com a matriz (no nosso caso o tecido edível dos bivalves) que se pretende estudar.

Estas curvas de calibração *matrix-matched* são fortificadas e devem ser definidas por pelo menos 5 a 8 padrões (excluindo os brancos), que correspondem a diferentes níveis de concentrações conhecidas do analito adicionadas à mesma matriz. Estas devem ser ambientalmente relevantes, refletindo um intervalo de valores que são esperados obter quando aplicada a metodologia a amostras reais. No caso de NSAIDs em bivalves são utilizados padrões que variam entre as nanogramas por grama (ng/g) e os microgramas por grama. Um número suficiente de padrões garante que a curva de calibração estabelece uma relação corretamente definida entre o sinal (variável dependente – y) e a concentração dos analitos

existentes na amostra em estudo (variável independente – x) (Bressolle *et al.*, 1996; Cassiano *et al.*, 2009).

De modo a poder validar a curva de calibração, podem ser aplicados dois tipos de procedimentos estatísticos: o coeficiente de correlação (R^2) e a regressão linear (ou método dos quadrados mínimos). O primeiro permite averiguar sobre a linearidade do gráfico obtido enquanto que o segundo determina a capacidade da curva de calibração de seguir uma linha reta (Harris, 2007).

Relativamente à bibliografia revista, a linearidade da resposta analítica foi validada para os diversos compostos em estudo. Destaca-se Martínez Bueno *et al.*, (2013), com coeficientes de correlação (R^2) maiores que 0,997, McEneff *et al.*, (2013) que obteve R^2 superior a 0,976 para todos os fármacos selecionados no seu estudo (5 NSAIDs) ou Núñez *et al.*, (2016) com R^2 sempre superior a 0,9955.

8.3.2. Limites Analíticos

Quando se trabalha com concentrações baixas de analitos, como é o caso das concentrações de fármacos em bivalves, é importante definir quais os limiares da deteção e quantificação que a metodologia apresenta. Os limites analíticos são o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ), e estes são determinados de modo a demonstrar a capacidade do método em detetar e quantificar baixas concentrações de um determinado analito (Cassiano *et al.*, 2009).

8.3.2.1. Limite de Deteção

O LOD de uma metodologia pode ser definido como a concentração mais baixa de analito presente na amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada (Harris, 2007).

De acordo com a diretriz publicada pela EMA em 1995 relativa à validação de procedimentos analíticos (EMA, 1995), existem várias formas de determinar o LOD, podendo estas ser baseadas na avaliação visual, na relação sinal/ruído (para o LOD, o sinal deve ser 3 vezes superior ao ruído da linha de base – rácio 3:1) ou com base nas medidas de dispersão da curva de calibração (desvio padrão e declive). Quando baseado nas medidas de dispersão, o LOD é calculado através da equação (Equação 1):

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (1)$$

σ – desvio padrão; S – declive da curva de calibração.

Na Tabela 7 estão presentes os LODs obtidos (durante a validação da metodologia) pelos autores para cada um dos analitos. Os LODs variaram entre 0,01 ng/g (PRO-PHE em Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a; b) e 50 ng/g (IBU e KET em Núñez *et al.*, 2016).

8.3.2.2. Limite de Quantificação

Outro limiar analítico é o LOQ que pode ser definido como a concentração mais baixa de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão estatisticamente comprovada (Cassiano *et al.*, 2009).

Tal como acontece para o LOD, a diretriz da EMA (EMA, 1995) descreve diferentes maneiras de determinar o LOQ com base na avaliação visual, na relação sinal/ruído (para o LOQ, o sinal deve ser 10 vezes superior ao ruído da linha de base – rácio 10:1) ou no desvio padrão e no declive aplicando a seguinte equação (Equação 2):

$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

σ – desvio padrão; S – declive da curva de calibração.

O σ pode, à semelhança do que acontece no cálculo do LOD, ser estimado na curva ou então a partir da resposta medida de brancos.

Quanto aos LOQs obtidos pelos autores da Tabela 7, estes variaram entre 0,02 ng/g (PRO-PHE em Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a; b) e 29 ng/g (DIC em McEneff *et al.*, 2013; 2014).

8.3.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão são consideradas dois dos principais parâmetros de validação de uma metodologia analítica uma vez que determinam os erros de uma medida analítica e consequentemente avaliam a qualidade e aceitação do método (Cassiano *et al.*, 2009).

Estes dois parâmetros são normalmente avaliados e expressos a nível diário (intra-dia) ou entre um período de dias (inter-dia) (Bressolle *et al.*, 1996).

8.3.3.1. Precisão

A precisão define-se como o grau de concordância entre resultados obtidos numa série de análises da mesma amostra ou padrão quando aplicada a mesma metodologia e nas mesmas condições, sendo uma medida de dispersão desses mesmos resultados (EMA, 1995). Por norma, é expressa pela variância, pelo desvio padrão relativo (DPR) ou pelo coeficiente de variação (CV) dos resultados medidos, sendo comum usar a seguinte equação (Equação 3) para calcular a precisão (Cassiano *et al.*, 2009):

$$CF (\%) \text{ ou } DPR (\%) = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

CV – Coeficiente de variação; DPR – Desvio padrão relativo; σ – desvio padrão; \bar{X} – média aritmética dos resultados

Quando se avalia a precisão, deve ser tido em conta terminologias diferentes mediante o intervalo de tempo em que são obtidos os resultados das medições independentes das amostras ou padrões, sendo todas elas medidas da precisão:

- **Repetibilidade**

Também designada precisão intra-ensaio ou precisão intra-dia, a repetibilidade está associada à precisão de ensaios realizados num curto espaço de tempo (no mesmo dia) sob condições de análise o mais idênticas possível como o mesmo analista, no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo tipo de reagentes (Cassiano *et al.*, 2009).

- **Precisão intermédia**

Ou precisão inter-dia pode definir-se como a concordância entre resultados que foram conseguidos no mesmo laboratório utilizando a mesma metodologia e a partir da mesma amostra ou padrão mas em diferentes condições como um analista diferente, utilizando um equipamento diferente ou em dias distintos (Bressolle *et al.*, 1996).

- **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade de uma metodologia analítica consiste na capacidade desta conseguir ser aplicada em laboratórios diferentes com resultados semelhantes.

A precisão dos diferentes fármacos (NSAIDs) e metodologias analíticas presentes na bibliografia revista encontra-se na Tabela 6 (DPR %) e variou entre os 2,6% e os 18%. Estes valores de precisão são considerados aceitáveis uma vez que são inferiores a 20%.

8.3.3.2. Exatidão

No que toca à exatidão, define-se como o grau de concordância entre os valores obtidos pela metodologia e os valores de referência considerados verdadeiros (EMA, 1995).

Como foi mencionado atrás, as amostras passam por uma etapa de preparação antes da análise instrumental, sendo sujeitas a processos de extração e purificação dos analitos de interesse presentes na amostra. Durante esta etapa pode haver perdas de analitos por adsorção ou partição devido a erros, o que leva a um menor rendimento das diferentes técnicas utilizadas nestes processos.

A exatidão de um método é expressa pela medida dos erros experimentais que podem ser aleatórios ou sistemáticos, também conhecido como *bias* ou viés (Cassiano *et al.*, 2009), podendo ser calculada através da seguinte equação (Equação 4) (Relacre, 2000):

$$Er (\%) \text{ ou Bias } (\%) = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100 \quad (4)$$

x_i – valor obtido experimentalmente (ou média aritmética de valores obtidos);

x – valor aceite como verdadeiro

No entanto, na maioria da vezes, não existe um valor aceite como “verdadeiro” (implicava um ensaio perfeito) e a exatidão da metodologia é determinada utilizando outros métodos entre os quais se destacam os estudos de recuperação.

Os estudos de recuperação são de extrema importância para a validação de um método, uma vez que a percentagem de recuperação obtida em ensaios de fortificação avalia o quão eficiente são as técnicas de preparação da amostra e, conseqüentemente, o quão eficiente é o procedimento analítico (Cassiano *et al.*, 2009). A percentagem de recuperação é então uma medida da exatidão e da eficácia da extração do procedimento analítico e pode ser calculada recorrendo à seguinte equação (Equação 5):

$$\text{Recuperação } (\%) = \frac{\text{teor medido}}{\text{nível de fortificação}} \times 100 \quad (5)$$

Na Tabela 6 encontram-se as percentagens de recuperação obtidas para cada fármaco utilizando diferentes métodos de preparação, havendo uma grande discrepância entre os valores. Estes variaram entre 34,5% (para PHE em Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a, b) e 112%

(para PAR em Mijangos *et al.*, 2019). Por norma, são consideradas aceitáveis percentagens de recuperação entre os 70 e os 120%.

Como representado na Figura 6, os conceitos de exatidão e precisão nem sempre estão associados, o que pode levar a métodos exatos mas não precisos, e vice-versa. Idealmente, a metodologia que se pretende validar deve ser simultaneamente exata e precisa para que os resultados obtidos a partir desta possam ser confiáveis. Um exemplo de um método preciso mas não exato é a metodologia apresentada por Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015a,b que apresenta DPRs entre os 0,1 e os 18% e percentagens de recuperação entre os 34,5 e os 71,7%.

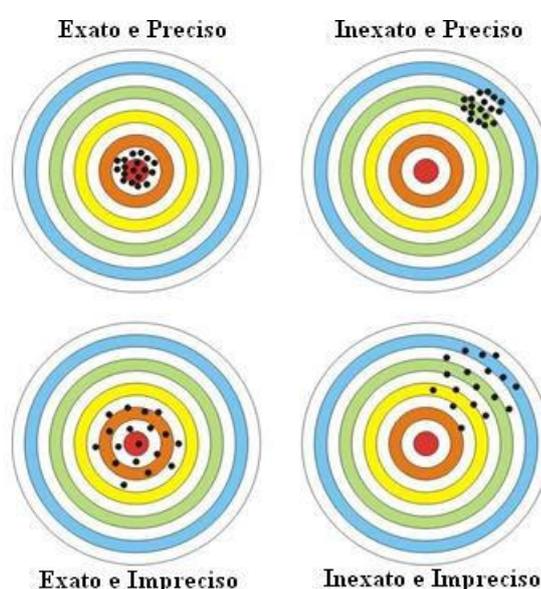


Figura 6 – Esquema que relaciona a exatidão e a precisão. (Adaptado de Bottega *et al.*, 2010).

8.3.4. Seletividade

Também designada de especificidade (quando o método produz uma resposta para uma única substância de interesse), a seletividade é um parâmetro imensurável da metodologia analítica. Consiste na capacidade que o método tem em distinguir, de forma inequívoca, o analito em estudo de qualquer outro tipo de substâncias que possam estar na amostra como metabolitos, produtos de degradação ou outro tipo de impurezas consideradas interferentes à análise (Harris, 2007).

Pode-se então dizer que um método é seletivo quando este consegue distinguir os diferentes analitos de interesse numa amostra complexa, sem a existência de interferências de outros compostos presentes na amostra.

8.3.5. Efeito de Matriz

O efeito de matriz (ME) pode definir-se como uma alteração na resposta analítica, devido à presença de analitos não-desejados ou outras substâncias interferentes presentes na amostra, afetando a eficácia da recuperação e por consequente a quantidade de analito extraído (EMA, 2011; Pavlović *et al.*, 2007). Representa então uma problemática na extração de analitos das amostras, e o estudo deste efeito pretende averiguar se existe supressão ou ampliação do sinal mediante os interferentes inerentes à matriz como lípidos e proteínas (Cassiano *et al.*, 2009). Quanto mais complexa for a matriz, maior será este efeito e maior a influência sobre alguns parâmetros da validação de metodologias de LC-MS/MS como a linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão (Alvarez-Muñoz *et al.*, 2015). O ME é particularmente significativo nas matrizes como os bivalves devido ao seu alto conteúdo lipídico (Mijangos *et al.*, 2019).

Uma forma de estudar o ME é através da comparação entre os declives das curvas de calibração do solvente de extração (sem extrato) e da curva de calibração da matriz (que são fortificadas com as mesmas concentrações). Caso a diferença entre estas seja um valor positivo, estamos perante uma ampliação do sinal, e se a diferença for negativa, perante uma supressão do sinal da matriz na extração dos analitos (Martínez Bueno *et al.*, 2013).

O cálculo do ME pode ser feito utilizando uma equação (Equação 6) semelhante à usada por Daniele *et al.*, (2016):

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{Sinal dos extratos}^*}{\text{Sinal do solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (6)$$

*Extratos fortificados após a extração

De modo a compensar o ME têm sido utilizadas várias abordagens, entre as quais se destaca o uso da calibração com padrões internos (compostos diferentes do analito em estudo) adicionados à amostra em quantidades conhecidas, corrigindo as variações que podem ocorrer durante a análise instrumental. No entanto, esta estratégia apresenta algumas desvantagens como o elevado custo e disponibilidade insuficiente destes compostos (Huerta *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

Os bivalves são muito relevantes em doenças de origem alimentar e a contaminações devido às suas características ecológicas de filtradores altamente eficientes e à sua capacidade de bioacumulação e concentração. Estas contaminações incluem a problemática dos fármacos e em particular dos NSAIDs devido ao seu alto consumo, ubiquidade ambiental e remoção incompleta destes CECs nas ETARs. De facto, as ETARs são consideradas uma das principais vias da contaminação farmacêutica que ocorre no ambiente aquático.

Como demonstrado, os NSAIDs (à semelhança de outros fármacos) são detetados em vários corpos aquáticos, bem como em várias espécies de bivalves podendo causar efeitos ecotoxicológicos agudos e crónicos que afetam o seu metabolismo e a sua fisiologia. É então de máxima importância desenvolver métodos analíticos robustos e de confiança, bem como harmonizar os mesmos em *guidelines* bem definidas para que se possa avaliar a ocorrência e a extensão desta problemática, tanto na vertente ecotoxicológica como na vertente de segurança alimentar.

No entanto, os estudos que reportam esta ocorrência são ainda escassos, principalmente devido à escassez de métodos analíticos validados que determinem a presença de NSAIDs, entre outros, em bivalves. Uma vez que os bivalves são uma matriz complexa, as metodologias analíticas para esta determinação devem apresentar extrações e purificações eficientes antes de serem analisadas pelas técnicas de análise instrumental.

De acordo com esta revisão do estado de arte, são várias as técnicas de extração e purificação que podem ser utilizadas na determinação de fármacos, apresentando percentagens de recuperação dos consideradas aceitáveis. Destaca-se a SPE como técnica de purificação predileta. Já relativamente à análise instrumental verifica-se uma prevalência clara na bibliografia revista do uso de LC-MS/MS, com diferentes colunas analíticas e gradientes de eluição, uma vez que é uma técnica que se caracteriza pela sua alta seletividade, especificidade e sensibilidade tornando-a a técnica de eleição na determinação de NSAIDs e outros fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-RIFAI, JAWAD H.; KHABBAZ, HADI; SCHÄFER, ANDREA I. - **Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems.** Separation and Purification Technology. 77:1 (2011) 60–67.

ALI, JAMIL - **Analysis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Using a Highly Pure, High Surface Area C18 HPLC Column.** 2012.

ALMEIDA, ÂNGELA; SOLÉ, MONTSERRAT; SOARES, AMADEU M.V.M.; FREITAS, ROSA - **Anti-inflammatory drugs in the marine environment: Bioconcentration, metabolism and sub-lethal effects in marine bivalves.** Environmental Pollution. 263 (2020).

ALVAREZ-MUÑOZ, D.; HUERTA, B.; FERNANDEZ-TEJEDOR, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. - **Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves.** Talanta. 136 (2015b) 174–182.

ÁLVAREZ-MUÑOZ, D.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; MAULVAULT, A.L.; TEDIOSI, A.; FERNÁNDEZ-TEJEDOR M.; VAN DEN HEUVEL, F.; KOTTERMAN, M.; MARQUES, A.; BARCELÓ, D. - **Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe.** Environmental Research. 143 (2015a) 56–64.

ÁLVAREZ-RUIZ, RODRIGO; PICÓ, YOLANDA - **Analysis of emerging and related pollutants in aquatic biota.** Trends in Environmental Analytical Chemistry. 25 (2020)

ANACLETO, PATRÍCIA; BARRENTO, SARA; NUNES, MARIA LEONOR; ROSA, RUI; MARQUES, ANTÓNIO - **Portuguese consumers' attitudes and perceptions of bivalve molluscs.** Food Control. 41:1 (2014) 168–177.

ANASTASSIADES, MICHELANGELO; LEHOTAY, STEVEN J; STAJNBAHER, DARINKA; SCHENCK, FRANK J - **Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce.** Journal of Chromatography A. 1015:1–2 (2003) 185–198.

ARPIN-PONT, LAUREN; BUENO, MARIA JESUS MARTINEZ; GOMEZ, ELENA; FENET, HÉLÈNE - **Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review.** Environmental Science and Pollution Research. 23:6 (2016) 4978–4991.

ASHFAQ, MUHAMMAD; NAWAZ KHAN, KHUJASTA; SAIF UR REHMAN, MUHAMMAD; MUSTAFA, GHULAM; FAIZAN NAZAR, MUHAMMAD; SUN, QIAN; IQBAL, JAVED; MULLA, SIKANDAR I; YU, CHANG PING - **Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 136 (2017) 31–39.

AUS DER BEEK, TIM; WEBER, FRANK-ANDREAS; BERGMANN, AXEL; HICKMANN, SILKE; EBERT, INA; HEIN, ARNE; KÜSTER, ANETTE - **Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives**. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35:4 (2016) 823–835.

BALBI, TERESA; MONTAGNA, MICHELE; FABBRI, RITA; CARBONE, CRISTINA; FRANZELLITTI, SILVIA; FABBRI, ELENA; CANESI, LAURA - **Diclofenac affects early embryo development in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis***. *Science of The Total Environment*. 642 (2018) 601–609.

BAYEN, STÉPHANE; ESTRADA, ELVAGRIS SEGOVIA; JUHEL, GUILLAUME; KELLY, BARRY C. - **Direct injection of tissue extracts in liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in mollusks**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407:19 (2015) 5553–5558.

BOTTEGA, EDUARDO LEONEL; ROBAINA, ANTONIO DIAS; ZULYS, LEIDY; RAFULL, LEYVA - **Avaliação da acurácia de um GPS de dupla frequência para implantação de um ponto de apoio imediato (P2) ao georreferenciamento**. 2538 (2010) 233–242.

BRESSOLLE, FRANÇOISE; BROMET-PETIT, MAGUY; AUDRAN, MICHEL - **Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics**. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 686:1 (1996) 3–10.

CAIRNS, DONALD - **Essentials of Pharmaceutical Chemistry**, 4ª Edição. Pharmaceutical Press, 2012. ISBN 0853699798.

CASSIANO, NEILA MARIA; BARREIRO, JULIANA CRISTINA; MARTINS, LÚCIA REGINA ROCHA; OLIVEIRA, REGINA VINCENZI; CASS, QUEZIA BEZERRA - **Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas**. *Química Nova*. 32:4 (2009) 1021–1030.

ChemSpider | Search and share chemistry - [Consultado a 7 de out. 2021]. Disponível

em: <http://www.chemspider.com/>>.

COMISSÃO EUROPEIA (CE) - **Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de Março** 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 da União Europeia*. 2015:78 (2015) 40–42.

COMISSÃO EUROPEIA (CE) - **Decisão de execução (UE) 2018/ 840 da Comissão de 5 de Junho de 2018** que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água, nos termos da **Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**, e que revoga a **Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão**. *Jornal Oficial da União Europeia*. 141:6 (2018) 9–12.

COMISSÃO EUROPEIA (CE) - **Decisão de execução (UE) 2020/1161 da Comissão de 4 de agosto de 2020** que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar 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 da União Europeia* L 257/32. 5 (2020) 32–35.

COMISSÃO EUROPEIA (CE) - **Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006** que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. 364 (2006) 5-24.

CONAGHAN, PHILIP G. - **A turbulent decade for NSAIDs: Update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity**. *Rheumatology International*. 32:6 (2012) 1491–1502.

CONTARDO-JARA, VALESKA; LORENZ, CLAUDIA; PFLUGMACHER, STEPHAN; NÜTZMANN, GUNNAR; KLOAS, WERNER; WIEGAND, CLAUDIA - **Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha***. *Aquatic Toxicology*. 105:3-4 (2011) 428–437.

CUEVA-MESTANZA, R.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRIGUEZ, J. J. - **Microwave-assisted micellar extraction coupled with solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals in molluscs prior to determination by HPLC**. *Biomedical Chromatography*. 22:10 (2008) 1115–1122.

CUNHA, S. C.; PENA, A.; FERNANDES, J. O. - **Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments**. Environmental Pollution. 225 (2017) 354–360.

DANIELE, GAELLE; FIEU, MAËVA; JOACHIM, SANDRINE; JAMES-CASAS, ALICE; ANDRES, SANDRINE; BAUDOIN, PATRICK; BONNARD, MARC; BONNARD, ISABELLE; GEFFARD, ALAIN; VULLIET, EMMANUELLE - **Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies**. Talanta. . 155 (2016) 1–7.

DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info - [Consult. 7 out. 2021].
Disponível em: <https://go.drugbank.com/>.

EMA - **ICH Topic Q 2 (RI) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. (1995).

EMA - **Guideline on bioanalytical method validation**. (2011).

FREITAS, ROSA; SILVESTRO, SERENA; COPPOLA, FRANCESCA; MEUCCI, VALENTINA; BATTAGLIA, FEDERICA; INTORRE, LUIGI; SOARES, AMADEU M.V.M.; PRETTI, CARLO; FAGGIO, CATERINA - **Combined effects of salinity changes and salicylic acid exposure in Mytilus galloprovincialis**. Science of the Total Environment. 715 (2020).

GADIPELLY, CHANDRAKANTH; PÉREZ-GONZÁLEZ, ANTÍA; YADAV, GANAPATI D.; ORTIZ, INMACULADA; IBÁÑEZ, RAQUEL; RATHOD, VIRENDRA K.; MARATHE, KUMUDINI V. - **Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse**. Industrial & Engineering Chemistry Research. 53:29 (2014) 11571–11592.

GONZÁLEZ PEÑA, OMAR ISRAEL; LÓPEZ ZAVALA, MIGUEL ÁNGEL; CABRAL RUELAS, HÉCTOR - **Pharmaceuticals Market, Consumption Trends and Disease Incidence Are Not Driving the Pharmaceutical Research on Water and Wastewater**. International Journal of Environmental Research and Public Health. 18:5 (2021) 25-32.

GOSLING, E. M. - **Bivalve molluscs : biology, ecology, and culture**. Fishing News Books, 2003. ISBN 978-0-852-38234-9.

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. 36:2 (1998) 357–393.

HARRIS, D. C. - **Quantitative Chemical Analysis**. 7ª Ed. New York: W.H. Freeman, 2007.

ISBN 9780716770411.

HOPKINS, TREVOR - **The Role of Methanol and Acetonitrile as Organic Modifiers in Reversed-phase Liquid Chromatography.** (2019).

HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. - **Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 404 (2012) 2611–2624.

IMS INSTITUTE FOR HEALTHCARE INFORMATICS - **IMS Global Medicine Use in 2020** [Consult. 11 out. 2021]. Disponível em: <https://www.iqvia.com/-/media/iqvia/pdfs/institute-reports/global-medicines-use-in-2020>.

PORTUGAL. Instituto Nacional de Estatística - **Estatísticas da Pesca - 2019.** Lisboa: INE, 2020.

INFARMED - **Estatística do Medicamento e Produtos de Saúde** [Consult. 14 out. 2021]. Disponível em: www.infarmed.pt.

INSA - **Tabela da Composição de Alimentos Portuguesa** [Consultado a 30 set. de 2021]. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/>.

ISHIGURO, HITOSHI; KAWAHARA, TAKASHI - **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostatic diseases.** BioMed Research International. (2014) 1-6.

ISLAS, GABRIELA; IBARRA, ISRAEL S; HERNANDEZ, PRISCILIANO; MIRANDA, JOSE M; CEPEDA, ALBERTO - **Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review.** International Journal of Analytical Chemistry. (2017) 1–16.

IWAMOTO, MARTHA; AYERS, TRACY; MAHON, BARBARA E.; SWERDLOW, DAVID L. - **Epidemiology of seafood-associated infections in the United States.** Clinical Microbiology Reviews. 23:2 (2010) 399–411.

JESUS GAFFNEY, Vanessa DE; CARDOSO, VITOR VALE; CARDOSO, EUGÉNIA; TEIXEIRA, ANA PAULA; MARTINS, JOSÉ; BENOLIEL, MARIA JOÃO; ALMEIDA, CRISTINA MARIA MARTINS - **Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes.** Environmental Science and Pollution Research. 24:17 (2017) 14717–14734.

KAZAKEVICH, YURI; LOBRUTTO, ROSARIO - **HPLC for Pharmaceutical Scientists** [Consult. 20 out. 2021]. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470087951>.

KLEYWEGT, SONYA; PAYNE, MARK; NG, FAI; FLETCHER, TIM - **Environmental loadings of Active Pharmaceutical Ingredients from manufacturing facilities in Canada.** *Science of the Total Environment*. 646 (2019) 257–264.

KLOSTERHAUS, SUSAN L.; GRACE, RICHARD; HAMILTON, M. COREEN; YEE, DONALD - **Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary.** *Environment International*. 54 (2013) 92–99.

LI, JIANA; QU, XIAOYUN; SU, LEI; ZHANG, WEIWEI; YANG, DONGQI; KOLANDHASAMY, PRABHU; LI, DAOJI; SHI, HUAHONG - **Microplastics in mussels along the coastal waters of China.** *Environmental Pollution*. 214 (2016) 177–184.

LIN, YEN CHING; LAI, WEBBER WEI PO; TUNG, HSIN HSIN; LIN, ANGELA YU CHEN - **Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan.** *Environmental Monitoring and Assessment*. 187:5 (2015).

LOLIĆ, ALEKSANDAR; PAÍGA, PAULA; SANTOS, LÚCIA H.M.L.M.; RAMOS, SANDRA; CORREIA, MANUELA; DELERUE-MATOS, CRISTINA - **Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk.** *Science of the Total Environment*. 508 (2015) 240–250.

LOOS, ROBERT; LOCORO, GIOVANNI; COMERO, SARA; CONTINI, SERAFINO; SCHWESIG, DAVID; WERRES, FRIEDRICH; BALSAA, PETER; GANS, OLIVER; WEISS, STEFAN; BLAHA, LUDEK; BOLCHI, MONICA; GAWLIK, BERND MANFRED - **Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water.** *Water Research*. 44:14 (2010) 4115–4126.

LÓPEZ-SERNA, REBECA; PÉREZ, SANDRA; GINEBREDÀ, ANTONI; PETROVIĆ, MIRA; BARCELÓ, DAMIÀ - **Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography- electrospray-tandem mass spectrometry.** *Talanta*. 83:2 (2010) 410–424.

LÓPEZ-SERNA, REBECA; PETROVIĆ, MIRA; BARCELÓ, DAMIÀ - **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*. 440 (2012) 280–289.

LOWTHER, JAMES A.; GUSTAR, NICOLE E.; POWELL, ANDREW L.; HARTNELL, RACHEL E.; LEES, DAVID N. - **Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom.** Applied and Environmental Microbiology. 78:16 (2012) 5812–5817.

LUCCI, PAOLO; PACETTI, DEBORAH; NUNEZ, OSCAR; G., NATALE - **Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis.** Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis. (2012).

MARTÍNEZ BUENO, M. J.; BOILLOT, C.; FENET, H.; CHIRON, S.; CASELLAS, C.; GÓMEZ, E. - **Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels.** Journal of Chromatography A. 1305 (2013) 27–34.

MARUYA, KEITH A.; DODDER, NATHAN G.; WEISBERG, STEPHEN B.; GREGORIO, DOMINIC; BISHOP, JONATHAN S.; KLOSTERHAUS, SUSAN; ALVAREZ, DAVID A.; FURLONG, EDWARD T.; BRICKER, SUZANNE; KIMBROUGH, KIMANI L.; LAUENSTEIN, GUNNAR G. - **The Mussel Watch California pilot study on contaminants of emerging concern (CECs): Synthesis and next steps.** Marine Pollution Bulletin. 81:2 (2014) 355–363.

MASKREY, BENJAMIN H.; DEAN, KARL; MORRELL, NADINE; TURNER, ANDREW D - **A simple and rapid UHPLC-MS/MS method for the quantitation of pharmaceuticals and related compounds in mussels and oysters.** Environmental Toxicology and Chemistry. 40:12 (2021) 3263-3274.

MCENEFF, GILLIAN; BARRON, LEON; KELLEHER, BRIAN; PAULL, BRETT; QUINN, BRIAN - **A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves.** Science of the Total Environment. 476-477 (2014) 317-326.

MCENEFF, GILLIAN; BARRON, LEON; KELLEHER, BRIAN; PAULL, BRETT; QUINN, BRIAN - **The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 405:29 (2013) 9509–9521.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z.; FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; MILAN, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. - **Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers**

and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research. 121 (2016a) 31–39.

MEZZELANI, MARICA; GORBI, STEFANIA; REGOLI, FRANCESCO - **Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms.** Marine Environmental Research. 140 (2018) 41–60.

MEZZELANI, M. GORBI, S.; FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; BENEDETTI, M.; MILAN, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. - **Transcriptional and cellular effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in experimentally exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*.** Aquatic Toxicology. 180 (2016b) 306–319.

MIJANGOS, LEIRE; ZIARRUSTA, HAIZEA; ZABALETA, ITSASO; USOBIAGA, ARESATZ; OLIVARES, MAITANE; ZULOAGA, OLATZ; ETXEBARRIA, NESTOR; PRIETO, AILETTE - **Multiresidue analytical method for the determination of 41 multiclass organic pollutants in mussel and fish tissues and biofluids by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 411:2 (2019) 493–506.

MILLER, THOMAS H.; BURY, NICOLAS R.; OWEN, STEWART F.; MACRAE, JAMES I.; BARRON, LEON P. - **A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna.** Environmental Pollution. 239 (2018) 129–146.

MOMPELAT, S.; BOT, B. LE; THOMAS, O. - **Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water.** Environment International. 35:5 (2009) 803–814.

MORENO-GONZÁLEZ, R.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; GROS, M.; BARCELÓ, D.; LEÓN, V. M. - **Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain).** Environmental Research. 138 (2015) 326–344.

NARUMIYA, SHUH; SUGIMOTO, YUKIHIKO; USHIKUBI, FUMITAKA - **Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions.** Physiological Reviews. 79:4 (1999) 1193–1226.

NEMOTO, ANA CAROLINA MALLASEN - **Monitoring of anti-inflammatory drugs in hydric media from Bragança district.** (2019).

NIREESHA, GR.; DIVYA, L.; SOWMYA, C.; VENKATESHAN, N.; NIRANJAN BABU, M.;

LAVAKUMAR, V - **Lyophilization/Freeze Drying -An Review**. *Ijntps*. 3:4 (2013) 87–98.

NOGUERA-OVIEDO, KATIA; AGA, DIANA S. - **Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment**. *Journal of Hazardous Materials*. 316 (2016) 242–251.

NUNES, BRUNO; DANIEL, DAVID; CANELAS, GISELA GONÇALVES; BARROS, JOSEANE; CORREIA, ALBERTO TEODORICO - **Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis***. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 231 (2020).

NÚÑEZ MARCÉ, MIREIA - **Emerging organic contaminants in aquatic organisms**. (2017).

NÚÑEZ MARCÉ, MIREIA; BORRULL, FRANCESC; FONTANALS, NÚRIA; POCURULL, EVA - **Determination of pharmaceuticals in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407:13 (2015) 3841–3849.

NÚÑEZ, MIREIA; BORRULL, FRANCESC; POCURULL, EVA; FONTANALS, NÚRIA - **Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry to determine pharmaceuticals in mussels**. *Journal of Separation Science*. 39:4 (2016) 741–747.

NÚÑEZ, MIREIA; BORRULL, FRANCESC; POCURULL, EVA; FONTANALS, NÚRIA - **Sample treatment for the determination of emerging organic contaminants in aquatic organisms**. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 97 (2017) 136–145.

OECD - **Pharmaceutical Market** [Consult. 5 jan. 2022]. Disponível em: https://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC#.

OTLES, SEMIH - **Methods of analysis of food components and additives**. 1ª Ed., 2012. ISBN 978-0849316470

OZKAN, SIBEL A. - **Analytical method validation: The importance for pharmaceutical analysis**. *Pharmaceutical Sciences*. 24:1 (2018) 1–2.

PAÍGA, Paula; Santos, Lúcia H.M.L.M.; Ramos, Sandra; Jorge, Sandra; Silva, Jaime Gabriel; Delerue-Matos, Cristina - **Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation**. *Science of The Total Environment*. 573 (2016) 164–177

PALLI, LAURA; SPINA, FEDERICA; VARESE, GIOVANNA CRISTINA; VINCENZI, MARCO; ARAGNO, MARIO; ARCANGELI, GIULIO; MUCCI, NICOLA; SANTIANNI, DANIELA; CAFFAZ, SIMONE; GORI, RICCARDO - **Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Tuscany: An effect-based approach to evaluate the potential environmental impact.** International Journal of Hygiene and Environmental Health. 222:4 (2019) 717–725.

PARLAMENTO EUROPEU; CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água.** Jornal Oficial da União Europeia. (2000) 1–72.

PARLAMENTO EUROPEU; CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Directiva 2008/105/CE 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/C e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE.** Jornal Oficial da União Europeia L 348 (2008) 32-35.

PARLAMENTO EUROPEU; CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Diretiva 2013/39/EU 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 da União Europeia L 226 (2013) 1-17.

PARMAR, TRISHALA K.; RAWTANI, DEEPAK; AGRAWAL, Y. K. - **Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution.** Frontiers in Life Science. 9:2 (2016) 110–118.

PATEL, MANVENDRA; KUMAR, RAHUL; KISHOR, KAMAL; MLSNA, TODD; PITTMAN, CHARLES U.; MOHAN, DINESH - **Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods.** Chemical Reviews. 119:6 (2019) 3510–3673.

PATEL, SURABHI; MONDAL, SOMEN; MAJUMDER, SUBRATA KUMAR; DAS, PAPITA; GHOSH, PALLAB - **Treatment of a Pharmaceutical Industrial Effluent by a Hybrid Process of Advanced Oxidation and Adsorption.** ACS Omega. 5:50 (2020) 32305–32317.

PAVLOVIĆ, DRAGANA MUTAVDZIC; BABIĆ, SANDRA; HORVAT, ALKA J.M.; KAŠTELAN-MACAN, MARIJA - **Sample preparation in analysis of pharmaceuticals.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 26:11 (2007) 1062–1075.

PEREIRA, ANDRÉ; SILVA, LILIANA; LARANJEIRO, CÉLIA; LINO, CELESTE; PENA, ANGELINA - **Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: Part I— Source, fate and occurrence.** *Molecules*. 25:5 (2020a) 1026.

PEREIRA, ANDRÉ; SILVA, LILIANA; LARANJEIRO, CÉLIA; LINO, CELESTE; PENA, ANGELINA - **Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: Part II - Toxicity and environmental risk assessment.** *Molecules*. 25:8 (2020b) 1796.

PEREIRA, ANDRÉ; SILVA, LILIANA; LINO, CELESTE M.; MEISEL, LEONOR M.; PENA, ANGELINA - **Assessing environmental risk of pharmaceuticals in Portugal: An approach for the selection of the Portuguese monitoring stations in line with Directive 2013/39/EU.** *Chemosphere*. 144 (2016) 2507–2515.

PETRIE, BRUCE; BARDEN, RUTH; KASPRZYK-HORDERN, BARBARA - **A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring.** *Water Research*. 72 (2015) 3–27.

PETROVIĆ, MIRA; ŠKRBIĆ, BILJANA; ŽIVANČEV, JELENA; FERRANDO-CLIMENT, LAURA; BARCELO, DAMIA - **Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia.** *Science of The Total Environment*. 468–469 (2014) 415–428.

PRAVEEN RAO, P. N.; KNAUS, EDWARD E. - **Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond.** *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11:2 (2008) 81–110.

PubChem - [Consult. 7 out. 2021]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

RAINSFORD, K. D. - **Anti-inflammatory drugs in the 21st century.** *Subcellular Biochemistry*. 42 (2007) 3–27.

RELACRE - **Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.** 2000. ISBN 972-8574-02-9

RODRIGUES, JOÃO; ALBINO, STEPHANIE; SILVA, SOFIA; CRAVO, ALEXANDRA; CARDOSO, VITOR VALE; BENOLIEL, MARIA JOÃO; ALMEIDA, CRISTINA M.M. - **Development of a multiresidue method for the determination of 24 pharmaceuticals in clams by QuEChERS and liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry.** *Food Analytical Methods*. 12:4 (2019) 838–851.

RUXTON, C. H. S.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A.; MILLINGTON, K. J. - **The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence.** Journal of Human Nutrition and Dietetics. 17:5 (2004) 449–459.

SADEZKY, A.; AND, D. LÖFFLER; TERNES, T. - **Proposal of an environmental indicator and classification system of pharmaceutical product residues for environmental management.** (2008).

SALVATO, FERNANDA; GALLO DE CARVALHO, MAYRA; LIMA LEITE, ALINE - **Strategies for Protein Separation.** In: Hon-Chiu Leung. Integrative Proteomics. InTech, 2012. ISBN: 978-953-51-0070-6.

SANTOS, LÚCIA; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, ADRIANO; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. - **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** Journal of Hazardous Materials. 175:1–3 (2010) 45–95.

SANTOS, LÚCIA H. M. L. M.; GROS, MERITXELL; RODRIGUEZ-MOZAZ, SARA; DELERUE-MATOS, CRISTINA; PENA, ANGELINA; BARCELÓ, DAMIÀ; MONTENEGRO, M. CONCEIÇÃO B.S.M. - **Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals.** Science of the Total Environment. 461–462 (2013) 302–316.

SERRA-COMPTE, ALBERT; MAULVAULT, ANA LUISA; CAMACHO, CAROLINA; ÁLVAREZ-MUÑOZ, DIANA; BARCELÓ, DAMIÀ; RODRÍGUEZ-MOZAZ, SARA; MARQUES, ANTÓNIO - **Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*).** Environmental Pollution. 236 (2018) 824–834.

SILVA, LILIANA J. G.; MEISEL, LEONOR M.; LINO, CELESTE M.; PENA, ANGELINA - **Profiling Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in the Environment: Trends in Analytical Methodologies.** Critical Reviews in Analytical Chemistry. 44:1 (2014) 41–67.

SOMENATH MITRA - **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry** Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2003. ISBN 9780471328452.

SOUSA, JOÃO; Ribeiro, Ana R.; Barbosa, Marta O.; Ribeiro, Cláudia; Tiritan, Maria E.; Pereira, M. Fernando R.; Silva, Adrián 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. 649 (2019) 1083–1095.

SWARTZ, MICHAEL; KRULL, IRA - **Analytical Method Development and Validation**. CRC Press, 1997. ISBN 9780824701154.

TAKACH, EDWARD - **Tissue homogenization**. In: Stacy Ho. Tissue Analysis for Drug Development. London: Future Science Ltd, 2013. ISBN 9781909453678, 22-35.

TAN, KARSOON; MA, HONGYU; LI, SHENGGANG; ZHENG, HUAIPING - **Bivalves as future source of sustainable natural omega-3 polyunsaturated fatty acids**. Food Chemistry. 311:September 2019 (2020).

TEMANORD - **PPCP monitoring in the Nordic Countries** – Status Report. Copenhagen, Denmark (2012).

VANDERMEERSCH, GRIET; LOURENÇO, HELENA MARIA; ALVAREZ-MUÑOZ, DIANA; CUNHA, SARA; DIOGÈNE, JORGE; CANO-SANCHO, GERMAN; SLOTH, JENS J.; KWADIJK, CHRISTIAAN; BARCELO, DAMIA; ALLEGAERT, WIM; BEKAERT, KAREN; FERNANDES, JOSÉ OLIVEIRA; MARQUES, ANTONIO; ROBBENS, JOHAN - **Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels**. Environmental Research. 143 (2015) 29–45.

VANE, J. R. - **Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs**. Nature New Biology. 231:25 (1971) 232–235.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. - **Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action**. Inflammation Research. 47 (1998) 78-87.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. - **The mechanism of action of aspirin**. Thrombosis Research. 110:5-6 (2003) 255-258

WALKER, DAVID I.; YOUNGER, ANDREW; STOCKLEY, LOUISE; BAKER-AUSTIN, CRAIG - **Escherichia coli testing and enumeration in live bivalve shellfish – Present methods and future directions**. Food Microbiology. 73 (2018) 29–38.

WILLE, KLAAS; KIEBOOMS, JULIE A.L.; CLAESSENS, MICHIEL; RAPPÉ, KAREN; VANDEN BUSSCHE, JULIE; NOPPE, HERLINDE; VAN PRAET, NANDER; DE WULF, ERIC; VAN CAETER, PETER; JANSSEN, COLIN R.; DE BRABANDER, HUBERT F.; VANHAECKE, LYNN - **Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms**. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 400:5 (2011) 1459–1472.

WOLECKI, DANIEL; CABAN, MAGDA; PAZDRO, KSENIA; MULKIEWICZ, EWA;

STEPNOWSKI, PIOTR; KUMIRSKA, JOLANTA - **Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and natural estrogens in the mussels *Mytilus edulis trossulus***. *Talanta*. 200 (2019) 316–323.

WONGRAKPANICH, SUPAKANYA; WONGRAKPANICH, AMARAPORN; MELHADO, KATIE; RANGASWAMI, JANANI - **A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly**. *Aging and disease*. 9:1 (2018) 143.

XIE, ZHENGXIN; LU, GUANGHUA; YAN, ZHENHUA; LIU, JIANCHAO; WANG, PEIFANG; WANG, YONGHUA - **Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake**. *Environmental Pollution*. 222 (2017) 356–366.

YAGHUBI, ELHAM; CARBONI, STEFANO; SNIPE, RHIANNON M.J.; SHAW, CHRISTOPHER S.; FYFE, JACKSON J.; SMITH, CRAIG M.; KAUR, GUNVEEN; TAN, SZE YEN; HAMILTON, DAVID LEE - **Farmed mussels: A nutritive protein source, rich in Omega-3 fatty acids, with a low environmental footprint**. *Nutrients*. 13:4 (2021) 1–12.

YILMAZ, B.; ASCI, A.; ERDEM, A. F. - **HPLC Method for Naproxen Determination in Human Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Turkey**. *Journal of Chromatographic Science*. 52:7 (2014) 584–589.

ZENKER, ARMIN; CICERO, MARIA RITA; PRESTINACI, FRANCESCA; BOTTONI, PAOLA; CARERE, MARIO - **Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment**. *Journal of Environmental Management*. 133 (2014) 378–387.