

Determinação de antidepressivos em águas residuais através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem

Versão final após defesa

Gonçalo Incenso Pereira Catarro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Mestre Sofia Pires Seixo Soares
Coorientadora: Prof.^a Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba
Coorientador: Prof. Doutor André Ricardo Tomás dos Santos Araújo Pereira

dezembro de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Gonçalo Incenso Pereira Catarro, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M12507 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã, 10/12/2024

Gonçalo Catarro

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Mestre Sofia Soares, por todo o apoio, orientação e dedicação que teve para comigo.

À minha co-orientadora, Prof.^a Eugenia Gallardo, também por todo o apoio, orientação, paciência e tempo que dispensou durante a realização deste trabalho. Agradeço também por todo o incentivo e otimismo que foi essencial para me acalmar nos momentos certos e motivar a ir sempre mais além. É sem dúvida uma profissional e pessoa fantástica, que leva os outros a querer seguir as suas pisadas.

Ao meu co-orientador, Prof. André Araújo, por ter aceitado ingressar neste projeto e pela sua disponibilidade e ajuda.

A todos os elementos da equipa de Toxi, Tiago, Aysa, Brinca, Luana, Bruno, Pelixo, João e Joana, por todos os momentos que vivemos dentro e fora do laboratório, conhecimentos partilhados, as idas ao café e a entreatajuda durante estes anos.

Um agradecimento especial ao Prof. Mário Barroso, por toda a disponibilidade, companheirismo e sentido de humor.

Em segundo lugar agradeço aos meus familiares. Aos meus pais, por estarem sempre a meu lado e acreditarem em mim, por nunca terem desistido de mim, por todos os seus esforços para me proporcionarem sempre o melhor em todos os níveis e por me ensinarem a encarar a vida como ela realmente é mesmo quando parece que tudo vai desmoronar. Obrigado por tudo o que fizeram por mim.

À minha irmã que sempre acreditou mais em mim do que eu próprio e sempre me puxou a seguir o melhor caminho que podia seguir, a todos os nossos momentos, vivências, conselhos e ensinamentos que me deu ao longo do tempo.

Aos meus cunhados, Sérgio e Ana, um especial obrigado por ao longo dos anos me terem apoiado.

Aos meus tios, Ana e Vitinho, e aos meus primos, Martim e Guilherme, por tudo o que fizeram por mim e serem o método mais eficaz para arrancar um sorriso em qualquer momento.

Aos meus avós que, mesmo não percebendo o que eu faço, me apoiam sempre incondicionalmente.

À Mariana Feijó, por estar sempre a meu lado, por todos os seus conselhos, pela paciência de anjo que tem e por me tornar uma pessoa melhor todos os dias. Sem ti, teria sido muito mais difícil, pois és tu que me acalmas e que fazes com que os dias difíceis se tornem agradáveis.

E por último, mas não menos importante a todos os meus amigos. Aos de sempre, Pina, Madalena, Eduardo, Emanuel, Mila, Barrau, Madeira, Rocha, Inês, Tojo, César, Carolina e Gabriela, por todo o apoio e ajuda que me têm dado ao longo dos anos mesmo estando mais ausente. E aos que a Universidade me deu, Daniel, Veiga, Xana, Casanova, Lara, Carvalho e Araújo, por tornarem o tempo de estudo mais animado e pelos momentos em que era necessário desanuviar. Agradeço a todos vocês, sabem que são a família que eu escolhi e o valor que têm para mim.

A todos, agradeço do fundo do coração por tudo.

Resumo

Nos últimos anos, com a influência da pandemia de COVID-19, o número de casos de transtornos do foro psiquiátrico tem aumentado. Dentro destes transtornos encontra-se a depressão, uma patologia caracterizada por um padrão de tristeza, perda de interesse, entre outros sintomas e que afeta atualmente cerca de 50 milhões de europeus. A utilização de antidepressivos é a medida mais eficaz para o tratamento desta patologia e que tem levantado várias preocupações às entidades competentes devido ao fácil acesso a este tipo de medicamentos. De facto, no caso dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) houve um aumento de 30 e 45 %, respetivamente, na sua prescrição desde 2017. Estes fármacos representam também uma potencial ameaça à saúde pública e aos ecossistemas, devido a um aumento na negligência entre a população quanto ao seu descarte, o que leva a uma exacerbação da presença desses fármacos em águas residuais. Tais compostos são detetados tanto na forma de metabolitos quanto na forma inalterada, sendo esta última de maior preocupação, pois indica um descarte inadequado e tratamento ineficaz nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs).

Este estudo teve como objetivo desenvolver um método analítico para determinar diferentes fármacos que pertencem à classe de antidepressivos ISRS e ISRSN (fluoxetina (FLX), citalopram (CIT), sertralina (SRT), paroxetina (PXT) e venlafaxina (VLX)) usando a extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). A metodologia desenvolvida foi validada de acordo com as diretrizes da *Food and Drug Administration*.

O procedimento de extração foi previamente otimizado, tendo-se testado quatro tipos de cartuchos de SPE diferentes, onde os cartuchos OASIS® PRIME MCX permitiram obter maiores rendimentos, pelo que foram estes os cartuchos selecionados para a realização do presente estudo.

O método apresentou linearidade entre 0,049 (0,195) – 25 ng/mL, com coeficientes de determinação superiores a 0,99, limites de deteção entre 0,012 – 0,195 ng/mL e limites de quantificação entre 0,049 – 0,195 ng/mL. Adicionalmente foram avaliadas as precisões interdia, intermédia e intradia, assim como a exatidão, demonstrando coeficientes de variação inferiores a 15% (20% para o limite de quantificação). A recuperação do método compreendeu-se entre 7,28 – 81,14%, com resultados reprodutíveis e consistentes, e com os resultados do estudo de estabilidade verificou-se que em geral todos os compostos são estáveis, com exceção da PXT que demonstrou ser instável a baixas concentrações.

Assim, este estudo, é o primeiro a utilizar cartuchos de SPE OASIS® PRIME MCX e a GC-MS/MS para a determinação de antidepressivos em águas residuais, demonstrando ser uma alternativa viável para a monitorização desta classe de fármacos em matrizes aquosas como rotina laboratorial, enfatizando sua importância ambiental.

Palavras-chave

Antidepressivos; SPE; GC-MS/MS; águas residuais.

Abstract

In recent years, influenced by the COVID-19 pandemic, the number of cases of psychiatric disorders has increased. Among these disorders is depression, a condition characterised by a pattern of sadness, loss of interest, and other symptoms, which affects approximately 50 million Europeans. The use of antidepressants is the most effective measure for treating this condition, and it has raised several concerns among regulatory bodies due to the easy access to these types of medications. Indeed, the prescription of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) has increased by 30% and 45% respectively since 2017. These drugs also represent a potential threat to public health and ecosystems due to increased negligence regarding their disposal, leading to an exacerbation of these drugs presence in wastewater. Such compounds are detected both in their metabolite forms and as unchanged drug form, with the latter being of greater concern as it indicates improper disposal and ineffective treatment in wastewater treatment plants.

This study aimed to develop an analytical method to determine different drugs belonging to the class of serotonin reuptake inhibitors and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (fluoxetine (FLX), citalopram (CIT), sertraline (SRT), paroxetine (PXT), and venlafaxine (VLX)) using solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The developed methodology was validated according to the Food and Drug Administration guidelines.

The extraction procedure was optimised beforehand, testing four different types of SPE cartridges, with OASIS® PRIME MCX cartridges yielding the highest recoveries. Consequently, these cartridges were selected for the present study.

The method demonstrated linearity between 0.049 (0.195) – 25 ng/mL, with determination coefficients exceeding 0.99, detection limits ranging from 0.012 – 0.195 ng/mL, and quantification limits between 0.049 – 0.195 ng/mL. Additionally, inter-day, inter-laboratory, and intra-day precisions, as well as accuracy, were evaluated, demonstrating coefficients of variation below 15% (20% for the quantification limit). The method's recovery ranged from 7.28 – 81.14%, with reproducible consistent results, and stability studies indicated that, in general, all compounds stable, except for PXT, which was found to be unstable at low concentrations.

Thus, this study is the first to use OASIS® PRIME MCX cartridges and GC-MS/MS for the determination of antidepressants in wastewater, demonstrating it as a viable alternative for routine laboratory monitoring of this class of drugs in aqueous matrices, highlighting its environmental significance.

Keywords

Antidepressants; SPE; GC-MS/MS; wastewaters.

Índice

Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1 Introdução	1
1. Saúde mental	1
1.1. Depressão.....	2
1.1.1. Diagnóstico	2
1.1.2. Etiologia.....	3
2. Antidepressivos.....	5
2.1. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina.....	5
2.1.1. Propriedades físico-químicas	6
2.1.2. Mecanismo de ação.....	7
2.1.3. Farmacocinética.....	7
2.2. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina	8
2.2.1. Propriedades físico-químicas	8
2.2.2. Mecanismo de ação.....	9
2.2.3. Farmacocinética.....	9
3. Águas Residuais	9
4. Técnicas de preparação de amostras	11
4.1. Extração em fase sólida	11
5. Cromatografia	13
5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem.....	14
6. Validação do método analítico.....	17
6.1. Seletividade.....	18
6.2. Linearidade e Curva de Calibração	18
6.3. Precisão e Exatidão	19
6.4. Limites Analíticos	20
6.5. Estabilidade	21

6.6.	Recuperação	21
7.	Deteção e quantificação de antidepressivos em águas residuais	22
Capítulo 2 Justificação do tema e objetivos.....		27
Capítulo 3 Materiais e Métodos		29
1.	Material e Instrumentação.....	29
2.	Reagentes e Padrões.....	30
3.	Preparação de soluções	30
3.1.	Soluções padrão	30
3.2.	Reagente de derivatização.....	30
3.3.	Solução de amónia a 5% em água	30
3.4.	Solução de ácido fórmico a 2% em metanol.....	31
3.5.	Solução de formiato de amónia (100 nM) com 2% de ácido fórmico em água.....	31
3.6.	Solução de ácido clorídrico (0,1 M) em água	31
3.7.	Solução de ácido clorídrico (0,1 M) em metanol.....	31
3.8.	Solução de amónia a 5% em metanol.....	31
4.	Amostras	31
5.	Sistema e condições cromatográficas.....	31
6.	Preparação da amostra.....	32
7.	Procedimento de extração.....	32
Capítulo 4 Resultados e discussão		35
1.	Identificação dos compostos em análise.....	35
2.	Otimização do método de extração	37
3.	Validação do método analítico	39
3.1.	Seletividade	39
3.2.	Linearidade e Curva de Calibração	39
3.3.	Precisão e Exatidão	41
3.4.	Estabilidade.....	43
3.5.	Recuperações.....	44
3.6.	Aplicação do método a amostras reais	44

Capítulo 5 Conclusão e Perspetivas Futuras	49
Capítulo 6 Lista de comunicações apresentadas	51
Capítulo 7 Referências.....	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação da estrutura química dos ISRS em estudo.	6
Figura 2 - Efeitos dos ISRS sobre a serotonina [26].	7
Figura 3 - Representação da estrutura química do ISRSN em estudo.	8
Figura 4 - Possíveis origens e rotas de entrada de antidepressivos em águas residuais (adaptado de Leal A. et al. 2020 [39])	10
Figura 5 - Representação das etapas do processo de SPE.	12
Figura 6 - Representação esquemática do GC-MS e os seus componentes. (adaptado de Wu et al. 2012 [57])	15
Figura 7 - Representação esquemática do detetor MS/MS. (adaptado de Yost et al. 1983 [61])	16
Figura 8 - Representação ilustrativa de um manifold para a SPE [105].	32
Figura 9 - Representação esquemática de todo o processo de análise.	33
Figura 10 - Cromatograma em modo MRM, onde estão representados todos os compostos em estudo à sua concentração mais baixa de quantificação (LOQ) e o padrão interno (PTP) a 50 µg/mL.	36
Figura 11 - Representação ilustrativa de todas as condições de extração testadas no presente trabalho.	37
Figura 12 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a eficiência de extração, em forma de áreas absolutas, nas diferentes condições testadas e os respetivos cartuchos de SPE usados.	39
Figura 13 - Cromatograma em modo MRM de uma amostra real, onde estão representados todos os compostos em estudo e o padrão interno a 50 µg/mL.	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos ISRS em estudo [22].	6
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do ISRSN em estudo [22].	8
Tabela 3 - Intervalos de tolerância máxima permitidos para as abundâncias relativas dos iões monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) [70].	18
Tabela 4 - Métodos cromatográficos para a deteção e quantificação dos compostos em estudo em amostras de ARs.	23
Tabela 5 - Transições monitorizadas em modo MRM para os compostos em estudo.	36
Tabela 6 - Resultados do estudo de linearidade e curva de calibração.	40
Tabela 7 - Precisão intradia e exatidão para a todos os compostos em estudo.	41
Tabela 8 - Precisão interdía e exatidão para a todos os compostos em estudo.	42
Tabela 9 - Precisão intermédia e exatidão para todos os compostos em estudo.	42
Tabela 10 - Resultados do estudo da estabilidade de amostras processadas (n=3).	43
Tabela 11 - Recuperação (%) para cada composto em estudo (n=3).	44
Tabela 12 - Resultados para as 50 amostras de ARs reais e as respetivas quantificações dos compostos em estudos.	46

Lista de Acrónimos

AAS	Espetrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i>)
ADTs	Antidepressivos tricíclicos
ARs	Águas residuais
CIT	Citalopram
COVID 19	Coronavirus <i>disease</i> 2019
DAD	Detetor de diode array (do inglês <i>Diode array detector</i>)
DSM	<i>Diagnosical and Statistical Manual of Mental Health</i>
ETARs	Estações de tratamento de águas residuais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detetor por ionização de chama (do inglês <i>Flame ionization detector</i>)
FLD	Detetor de fluorescência (do inglês <i>Fluorescence detector</i>)
FLX	Fluoxetina
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (do inglês <i>Gas chromatography and mass spectrometry</i>)
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em tandem (do inglês <i>Gas chromatography and tandem mass spectrometry</i>)
IMAO	Inibidores da monoamina oxidase
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i>)
ISRD	Inibidores seletivos da recaptção de dopamina
ISRN	Inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
ISRSN	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (do inglês <i>Liquid chromatography and mass spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em tandem (do inglês <i>Liquid chromatography and tandem mass spectrometry</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>)
LLOQ	Limite inferior de quantificação (do inglês <i>Lower limit of quantification</i>)
LOD	Limite de deteção (do inglês <i>Limit of detection</i>)

LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of quantification</i>)
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração em seringa empacotada (do inglês <i>Microextraction by packed sorbent</i>)
MRM	Monitorização de múltiplas reações (do inglês <i>Multiple reaction monitoring</i>)
MS	Espetrometria de massa (do inglês <i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espetrometria de massa em tandem (do inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>)
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
MSPE	Extração em fase sólida magnética (do inglês <i>Magnetic solid phase extraction</i>)
m/z	Razão massa-carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAs	Padrões analíticos
PTP	Protriptilina
PXT	Paroxetina
QCs	Controlos de qualidade (do inglês <i>Quality controls</i>)
R ²	Coefficiente de determinação
SDME	Microextração em gota Suspensa (do inglês <i>Single-drop microextraction</i>)
SIM	Monitorização de iões seleccionados (do inglês <i>Selected ion monitoring</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase microextraction</i>)
SPPSM	Sociedade Portuguesa de Psiquiatria e Saúde Mental
SRT	Sertralina
TMCS	Trimetilclorosilano
UHPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)
UV-vis	Espetrofotometria ultravioleta-visível
VLX	Venlafaxina
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

Capítulo 1 | Introdução

1. Saúde mental

A saúde mental é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “um estado de bem-estar mental que permite às pessoas lidar com o stress da vida, realizar as suas atividades, aprender e trabalhar bem e contribuir para a sua comunidade” [1]. Neste ponto com a evolução dos conhecimentos técnicos e científicos fica de certo modo impossível não relacionar o bem-estar físico ao estado emocional e social, sendo que a saúde mental é o direito básico do ser humano, é o que nos torna capazes de tomar decisões, lidar com o stress, estabelecer relações sociais e realizar as nossas próprias atividades [2].

Segundo a Sociedade Portuguesa de Psiquiatria e Saúde Mental (SPPSM), os transtornos do foro psiquiátrico ocupam 12% das doenças a nível mundial, sendo que por ano 165 milhões de indivíduos europeus são afetados por doenças deste foro. Portugal é o segundo país com maior prevalência, onde 22,9% da população sofre de uma doença psiquiátrica e com tendência a aumentar [3].

Tendo esta informação em conta, a intervenção na componente mental de um indivíduo torna-se crucial, podendo prevenir a doença através da promoção da saúde mental, com o auxílio do trabalho contínuo dos profissionais de saúde da área específica. Devido ao desconhecimento neurobiológico muitos doentes possuem baixa intervenção médica, o que pode levar a graves consequências uma vez que estes pacientes não ficam totalmente informados, podendo assim levar a um aumento de mortalidade, devido a doenças cardiovasculares, respiratórias e ao aumento do número de acidentes [2].

O aparecimento destas doenças pode ter implicações de variados fatores, entre eles as circunstâncias sociais, económicas e ambientais desfavoráveis, que levam ao aumento de diversos transtornos do foro psiquiátrico como o transtorno de ansiedade, a bipolaridade, o stress pós-traumático, a esquizofrenia e a depressão [1].

1.1. Depressão

A depressão é uma patologia mental caracterizada pela sensação de tristeza, falta de interesse ou prazer, mudanças no padrão de sono e apetite, e pela dificuldade de concentração e que pode afetar indivíduos de qualquer idade ou sexo. Esta pode apresentar uma gravidade variada, sendo esta a razão pela qual é subdividida em várias classes, além de que o seu diagnóstico prévio se torna difícil uma vez que pode ter um aparecimento silencioso [4].

Atualmente é alarmante o número de indivíduos diagnosticados pois, segundo a SPPSM, cerca de 50 milhões de europeus são afetados pela depressão e estimam ainda que 11% da comunidade europeia poderá vir a sofrer de um episódio depressivo. Portugal é de momento o quinto país com mais casos, com cerca de 8% da população diagnosticada [5]. Este aumento pode ser explicado pelo efeito da pandemia COVID-19, onde fatores socioeconómicos poderão ter levado ao desencadear tanto da depressão como de outras doenças [6]. O Serviço Nacional de Saúde realizou um estudo sob a forma de inquéritos *online* durante 4 meses, onde foi demonstrado que 26,4 % dos indivíduos da população geral adulta e metade dos profissionais de saúde acusavam sintomas compatíveis com depressão moderada a grave, e que as mulheres, os jovens adultos, os desempregados e os indivíduos com baixos rendimentos constituíam o grupo com maior incidência [5].

Apesar de não existir cura para a depressão, existem atualmente vários tratamentos eficazes para combater a doença, sendo imperativo um bom diagnóstico.

1.1.1. Diagnóstico

De forma a melhorar o diagnóstico desta patologia, estabeleceram-se alguns padrões de classificação onde os sintomas referidos anteriormente têm de permanecer por um período mínimo de duas semanas, demonstrando evidentes mudanças de afeto, cognição e funções neurovegetativas. Todas estas condições são de máxima importância, pois a depressão é maioritariamente confundida com estados de tristeza, que embora seja um dos sintomas da depressão é considerada como um estado emocional temporário. Caso se verifique um diagnóstico incorreto ou tardio e o indivíduo não seja tratado corretamente, vai dificultar o controlo da doença e como consequência conduzir a uma acumulação de efeitos tóxicos em todo o organismo, o que pode resultar em outras complicações como problemas cardiovasculares, infeções, reumatismo ou diabetes [5].

Tendo isto em conta, pode orientar-se pela publicação "*Diagnostical and Statistical Manual of Mental Health*" (DSM), que oferece a informação necessária para o diagnóstico de doenças mentais, como no caso da depressão [4]. Segundo esta, o diagnóstico é baseado na presença dos sintomas referidos anteriormente e depende da

sua duração, circunstância e etiologia. O diagnóstico deve ter em conta estes critérios, pois a depressão pode ser dividida em vários tipos, que são avaliadas de acordo com os mesmos [4].

O transtorno disruptivo da desregulação do humor é caracterizado por irritabilidade crónica, grave e persistente, podendo observar-se através de duas manifestações: a primeira são as explosões de temperamento, que ocorrem em resposta à frustração e devem ocorrer com frequência (3 ou mais vezes por semana) durante pelo menos 1 ano e a segunda manifestação, que consiste num humor crónico (irritável ou zangado). Os indivíduos mais afetados são as crianças, pelo que o seu diagnóstico é realizado em indivíduos entre os 6 e 18 anos de idade [4].

O transtorno depressivo define-se pela presença de pelo menos um episódio depressivo *major*, ocorrido na ausência de história de episódios maníacos ou hipomaníacos, e que se caracteriza pela presença de humor deprimido ou perda de interesse ou prazer em todas as atividades durante um período de pelo menos 2 semanas [4].

A perturbação depressiva persistente é essencialmente caracterizada por um humor deprimido durante a maior parte do dia, por pelo menos 1 ano caso se trate de crianças ou adolescentes, ou 2 anos caso os indivíduos sejam adultos [4].

A perturbação disfórica pré-menstrual é expressa por instabilidade de humor, irritabilidade, disforia e sintomas de ansiedade durante a fase pré-menstrual, sendo que os sintomas devem ter-se repetido ao longo dos ciclos menstruais anteriores [4].

1.1.2. Etiologia

A depressão provoca uma variedade de alterações complexas no Sistema Nervoso Central (SNC), tanto na estrutura quanto na função cerebral. Essas mudanças contribuem para os diversos sintomas mencionados, desde distúrbios emocionais e cognitivos a problemas físicos [7].

A nível estrutural a depressão afeta várias regiões do cérebro, como a redução do hipocampo, relacionado com a memória e a regulação emocional, a perda de volume e atividade do córtex pré-frontal, responsável pela tomada de decisões e a hiperatividade da amígdala, encarregue pelo processamento de emoções como medo e tristeza [7].

Uma dessas alterações é o desequilíbrio dos níveis de serotonina, noradrenalina e dopamina, que leva a uma neurotransmissão ineficaz, o que pode provocar os sintomas de anedonia, fadiga e dificuldades na concentração, enfatizando a eficácia dos antidepressivos que vão aumentar a disponibilidade desses neurotransmissores [8–10]. Adicionalmente, os fatores neurotróficos também são essenciais na neurobiologia da depressão. O fator neurotrófico derivado do cérebro, o fator de crescimento do endotélio vascular e o fator de crescimento nervoso são fundamentais para a neuroplasticidade,

incluindo a neurogênese e a modificação da morfologia neuronal, e a redução na sinalização desses fatores tem sido implicada no desenvolvimento da depressão [11].

Para além disso, está também associada a um estado inflamatório crónico, caracterizado por níveis elevados de interleucina-6 e proteína C-reativa, que são marcadores inflamatórios. A inflamação pode contribuir negativamente para a função neuronal e a neuroplasticidade, perdendo a capacidade do cérebro se adaptar e reorganizar [9,12].

Outra alteração é a disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal que regula a resposta ao stress. A exposição prolongada ao stress pode levar a um aumento excessivo de cortisol, resultando em alterações na estrutura e função cerebral, mais concretamente nas regiões relacionadas com a regulação das emoções e o comportamento [8,11,13,14].

Todas estas alterações mostram como os mecanismos bioquímicos têm uma interação complexa, o que contribui para a heterogeneidade dos sintomas e das respostas ao tratamento.

Embora metade dos indivíduos tenham apenas um episódio depressivo isolado, esta patologia não apresenta cura. No entanto, em caso de episódios mais frequentes recorre-se à toma de antidepressivos, consultas de psicoterapia ou mesmo à combinação de ambos como tratamentos preventivos [5]. A utilização de antidepressivos é a forma de tratamento mais comum e eficaz da depressão tanto moderada como severa, e por essa razão o seu consumo tem vindo a aumentar ao longo dos anos [15]. Segundo dados fornecidos pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED), verificou-se que entre 2017 e 2023 houve um aumento no consumo de antidepressivos de 43%, o equivalente a 10 milhões de embalagens por ano. Entre as classes existentes de antidepressivos é de realçar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (citalopram (CIT), fluoxetina (FLX), paroxetina (PXT) e sertralina (SRT)), tendo tido um aumento de consumo de 30%, e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) (venlafaxina (VLX)), onde se verificou um aumento de consumo de 45%, sendo que são estas classes de antidepressivos que se vão determinar no trabalho experimental da dissertação.

2. Antidepressivos

Numa tentativa de estabilizar ou reverter os efeitos provocados pela depressão houve a necessidade de desenvolver fármacos para o tratamento dos indivíduos afetados, denominados antidepressivos. Estes, como mencionado anteriormente, são utilizados para o tratamento de inúmeras doenças, principalmente a depressão. São fármacos de ação lenta e progressiva, o que significa que nos primeiros dias de administração não se observem os seus efeitos [16].

Os primeiros fármacos desenvolvidos foram os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoamina oxidase (IMAO) no final da década 50, levando a um avanço crucial no tratamento e no entendimento dos possíveis mecanismos bioquímicos. Até aos anos 80 existiam apenas estas duas classes de antidepressivos, que apesar de serem eficazes apresentavam muitos efeitos adversos, devido à sua inespecificidade e em caso de administração de uma elevada dosagem letal. No caso dos ADTs, como apresentam um perfil farmacológico muito abrangente, estes inibem múltiplos locais de captação de neurotransmissores, bloqueiam vários neuroreceptores e ainda influenciam o sistema de segundo mensageiro e o canal de iões de membrana. Por sua vez, os IMAO provocavam hipertensividade como principal efeito adverso, acabando por comprometer o bem-estar dos indivíduos [17].

De forma a atenuar ou mesmo eliminar estes efeitos adversos surgiram novas classes de antidepressivos, passando assim a existir mais cinco novas classes de antidepressivos: inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (ISRN), inibidores seletivos da recaptção de dopamina (ISRD), antidepressivos tetracíclicos, ISRS e os ISRSN [17].

Neste trabalho, foram estudados fármacos que pertencem ao grupo terapêutico dos ISRSN e ISRS, pelo que seguidamente será realizada uma descrição mais detalhada destes fármacos.

2.1. Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

O primeiro ISRS introduzido no mercado, em 1987, foi a FLX que modificou a forma de tratamento farmacológico da depressão, por ser mais tolerável e mais seguro que os anteriores ADTs e IMAO, tornando-se a partir desse momento a classe mais prescrita em vários países.

Embora esta classe de antidepressivos tenha representado um grande avanço no tratamento da depressão, também apresenta alguns efeitos adversos como dor de cabeça, tonturas, sonolência ou insónias, tremores, ansiedade e agitação. A esta classe de antidepressivos foram posteriormente adicionados o CIT, a SRT e a PXT [18–21].

2.1.1. Propriedades físico-químicas

Na Figura 1 e na Tabela 1 estão representadas as estruturas químicas e algumas das propriedades físico-químicas, respetivamente, dos quatro ISRS em estudo.

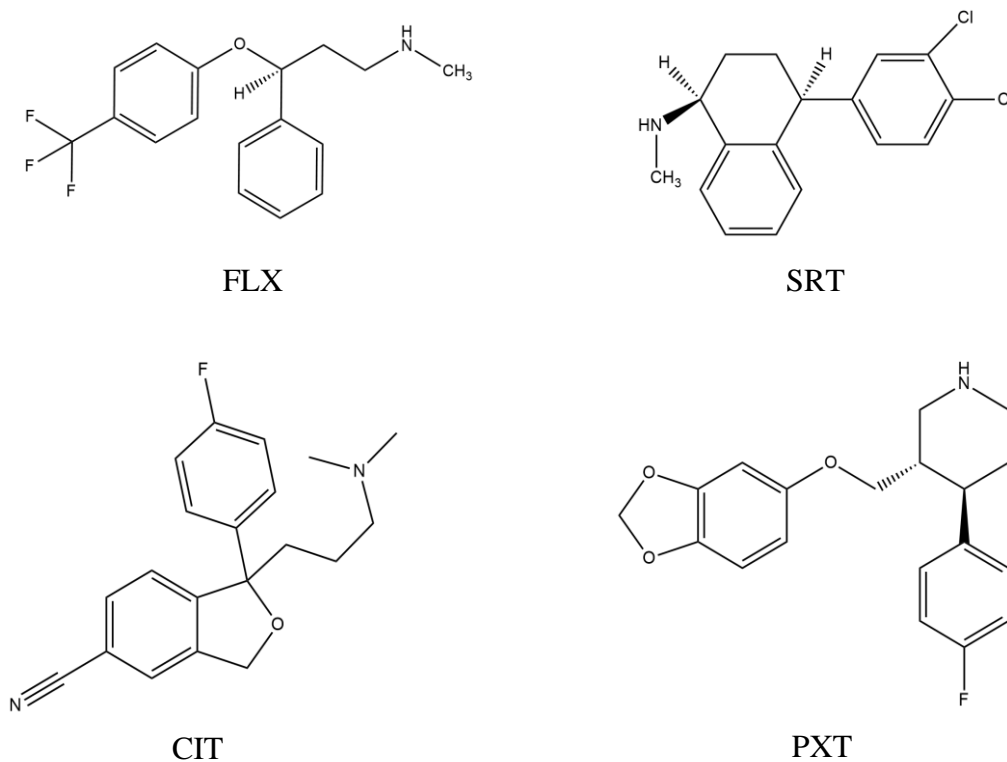


Figura 1 - Representação da estrutura química dos ISRS em estudo.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos ISRS em estudo [22].

Composto	Fórmula química	pK _a	Massa molecular (g/mol)	Designação IUPAC
FLX	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	9,80	309,33	metil[(3S)-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propil]amina
CIT	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	9,78	324,39	(RS)-1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofuran-5-carbonitrilo
SRT	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	9,85	306,23	(1S-4S)-4-(3,4diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftilenamina
PXT	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	9,90	329,37	(3S,4R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yloxymethyl)-4-(4-fluorophenyl)piperidina

2.1.2. Mecanismo de ação

A serotonina é uma monoamina resultante da transformação do aminoácido *L*-triptofano, está envolvida na comunicação entre neurónios e está também relacionada com o humor ou transtornos afetivos, pois indivíduos com elevado humor têm elevados níveis de serotonina e pelo oposto, indivíduos deprimidos, têm níveis de serotonina anómalos [23,24].

O mecanismo de ação dos ISRS é muito semelhante ao dos ADTs. No entanto, os ISRS são mais seletivos para os transportadores de serotonina nos neurónios pré-sinápticos, e deste modo, bloqueiam a sua ação, deixando assim de reabsorver a serotonina libertada, o que resulta no aumento da concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica, levando a uma maior ativação dos recetores de serotonina nos neurónios pós-sinápticos (Figura 2) [25,26].

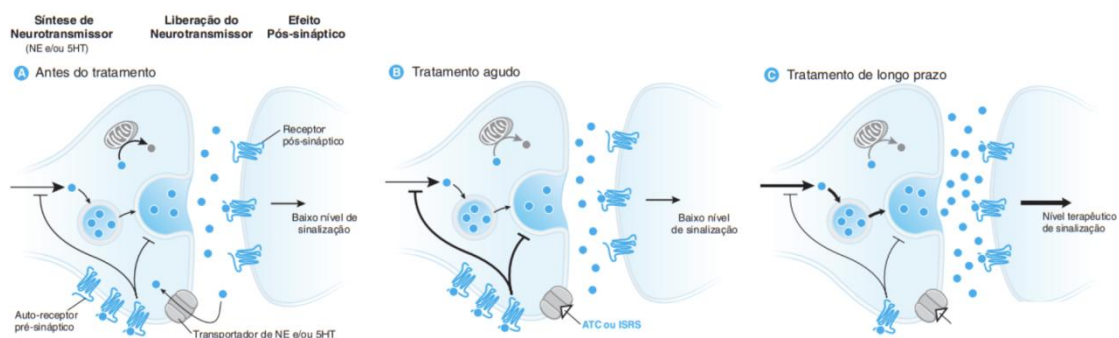


Figura 2 - Efeitos dos ISRS sobre a serotonina [26].

2.1.3. Farmacocinética

De uma forma geral, os ISRS apresentam boa absorção gastrointestinal, podendo ter ou não uma absorção aumentada quando ingeridos com alimentos [27]. A biodisponibilidade destes compostos varia entre si. A FLX apresenta uma biodisponibilidade de 72% a 90%, o CIT de 80%, a SRT de 44%, e a PXT de 50% a 60% [28]. Têm um grande volume de distribuição, uma vez que se ligam às proteínas plasmáticas, distribuindo-se amplamente pelos tecidos corporais [29]. Estes são metabolizados no fígado pela via citocromo P450, podendo alguns ter metabolitos ativos, como a norfluoxetina, um metabolito da FLX, que tem um tempo de semi-vida mais longo que o próprio fármaco [30].

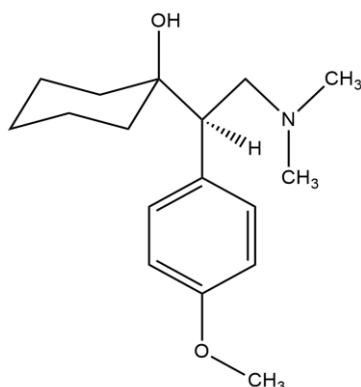
Por fim, são eliminados pela urina ou pelas fezes e podem apresentar tempos de semi-vida variados, por exemplo a FLX é de 4 a 6 dias, enquanto para a SRT é de 26 horas [27].

2.2. Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina

Os ISRSN são uma classe mais recente de antidepressivos e também utilizados principalmente em casos de depressão resistente ao tratamento ou quando estão presentes sintomas significativos de ansiedade e dor crônica, assim como para outros distúrbios psiquiátricos. Estes fármacos atuam inibindo seletivamente os transportadores de serotonina e noradrenalina nos neurónios pré-sinápticos, aumentando assim a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica. A VLX é o fármaco desta classe, que irá ser quantificado [31].

2.2.1. Propriedades físico-químicas

Na Figura 3 e Tabela 2 encontram-se descritas a estrutura química da VLX e as principais características físico-químicas.



VLX

Figura 3 - Representação da estrutura química do ISRSN em estudo.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do ISRSN em estudo [22].

Composto	Fórmula química	pK _a	Massa molecular (g/mol)	Designação IUPAC
VLX	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	9,24	277,20	(RS)-1-[2-dimetilamino-1-(4-metoxifenil)-etil]cicloexan-1-ol

2.2.2. Mecanismo de ação

Os ISRSN têm uma atuação dependente da concentração, isto é, quando a concentração deste fármaco é baixa comporta-se como um ISRS, atuando apenas nos transportadores de serotonina, enquanto se se encontrar a concentrações mais altas, atua tanto nos transportadores de serotonina quanto nos transportadores de noradrenalina, resultando num aumento da concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica, prolongando assim a sua ação nos recetores pós-sinápticos. Este duplo mecanismo de ação é considerado benéfico no tratamento da depressão, uma vez que promove uma maior modulação de circuitos neuronais envolvidos na regulação do humor, sono, apetite e resposta ao stress [26,32].

2.2.3. Farmacocinética

Em relação à farmacocinética, esta classe de antidepressivos é muito semelhante aos ISRS, pois geralmente são administrados por via oral pelo que apresentam uma boa absorção, que pode ser influenciada pela ingestão de alimentos. Embora tenham também alta afinidade com as proteínas plasmáticas a sua biodisponibilidade é inferior, apresentando uma biodisponibilidade de 45% [33]. No caso da VLX, fármaco em estudo, é metabolizado no fígado pela via citocromo P450, podendo formar o seu metabolito ativo desmetilvenlafaxina através da catálise pela enzima CYP2D6, que também pode ser metabolizado tanto pela enzima CYP2D6 como pela CYP1A2. Os fármacos desta classe de antidepressivos são principalmente excretados pelos rins, sendo que cerca de 29% da VLX é excretada predominantemente pela urina na sua forma inalterada, apresentando um tempo de semi-vida de 5 horas [34,35].

3. Águas Residuais

As águas residuais (ARs), mais conhecidas como esgotos, são compostas por diversos tipos de efluentes, que podem conter uma vasta diversidade de compostos como resíduos urbanos, substâncias químicas, agentes patogénicos, nutrientes, fármacos, entre outros [36].

Estas águas sofrem vários processos de tratamento nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs) e são posteriormente libertadas de novo para o meio ambiente [36].

A análise quer dos afluentes como dos efluentes das ETARs, é de extrema importância, pois existem várias formas, em certos casos inevitável, de exposição às mesmas através dos esgotos domésticos, efluentes industriais, águas pluviais, águas de drenagem agrícola ou até mesmo através de águas de processos comerciais e institucionais,

podendo causar sérios problemas não só a nível de saúde pública, mas também a todo o ecossistema envolvente (Figura 4) [37].

Um exemplo de fármacos que acabam por contaminar estas águas são os antidepressivos, que devido ao seu elevado consumo, descarte negligente e à sua capacidade de persistir no ambiente contribui para a sua presença nas águas [37].

As análises do consumo de medicamentos são frequentemente realizadas por métodos tradicionais baseados em dados médicos e na realização de inquéritos à população, como forma de estimar o consumo do composto que se pretende detetar. No entanto, estes métodos apresentam limitações, incluindo custos elevados e a probabilidade de as respostas não serem confiáveis, torna-se assim importante complementar estes estudos com outras metodologias que ofereçam maior precisão e que sejam mais económicas como é o caso da análise das ARs, denominada *wastewater-based epidemiology*. Esta é uma matriz economicamente vantajosa, sendo que a sua preparação para análise é mais simples e consequentemente menos dispendiosa [38].

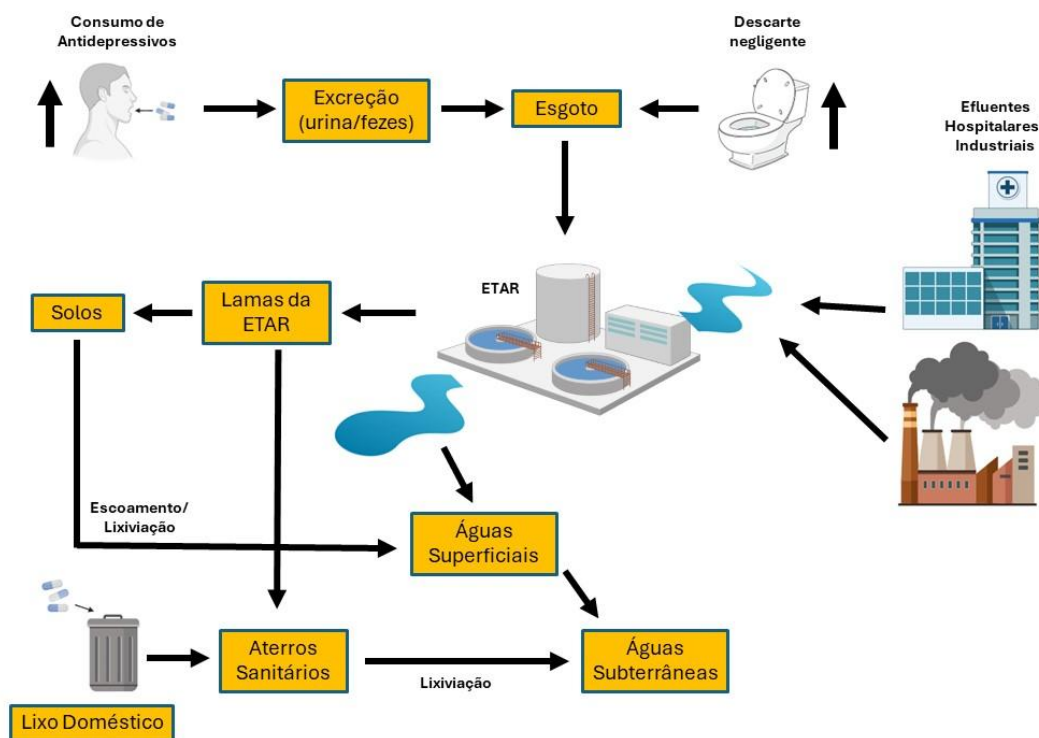


Figura 4 - Possíveis origens e rotas de entrada de antidepressivos em águas residuais (adaptado de Leal A. et al. 2020 [39])

4. Técnicas de preparação de amostras

A preparação de amostra, ou pré-tratamento, é um processo que tem como finalidade a extração e concentração dos compostos de interesse de matrizes complexas para posterior análise cromatográfica [40].

Esta preparação é essencial, é a etapa mais demorada de toda a análise e pode estar relacionada a erros sistemáticos e aleatórios podendo levar a perdas do analito. No entanto visa melhorar a sensibilidade do método analítico implementado, eliminando os interferentes presentes na matriz que possam alterar o desempenho do ensaio e concentrando os compostos que se encontram em concentrações vestigiais [40,41].

O método preferencial para a preparação da amostra deverá ser simples, económico, rápido, e facilmente automatizado, permitindo também uma extração adequada e eficiente [40].

Ao longo dos anos, verificou-se um avanço notável no desenvolvimento de técnicas de extração, existindo atualmente uma extensa diversidade de técnicas como a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em seringa empacotada (MEPS), a extração dinâmica de fase sólida, a microextração em gota suspensa (SDME), a microextração em polímero monolítico (PMME), entre outras [40].

A eficiência da técnica de extração está relacionada com a composição da amostra, solventes orgânicos utilizados e respetivas concentrações, tempo de extração, temperatura, pH, entre outros [42]. A escolha da técnica é de extrema importância, pois devido ao elevado número de técnicas diferentes existentes, esta escolha pode depender da complexidade da amostra, da velocidade de extração, da complexidade do instrumento de análise e da metodologia a ser desenvolvida [43].

No entanto, entre todas as técnicas mencionadas anteriormente as que permanecem como preferenciais são a LLE e SPE [40,41], sendo esta última a técnica utilizada na realização deste trabalho e que será abordada com mais detalhe em seguida.

4.1. Extração em fase sólida

A SPE, tal como referido anteriormente, é uma das várias técnicas de extração de amostras disponível. Trata-se de uma técnica rápida considerada clássica, seletiva, versátil e, apesar da existência de outras técnicas mais recentes e inovadoras, ainda apresenta uma vasta aplicabilidade, pois permite a separação dos analitos de interesse da amostra, eliminando os compostos interferentes da matriz, e melhorando a sensibilidade do método. Adicionalmente, possibilita a obtenção de recuperações elevadas tendo em conta o curto tempo de extração, é um procedimento facilmente

executável, permitindo efetuar várias extrações em simultâneo, e pode ser adaptado à análise cromatográfica [44,45].

Esta técnica tem como finalidade a retenção dos analitos de interesse que estão presentes na amostra no material sorbente, podendo este estar inserido em discos, pipetas, seringas ou cartuchos. Estes últimos são os mais comumente utilizados devido à sua ampla disponibilidade comercial e por poderem ainda diferir nas características do sorbente, podendo tratar-se de C_8 , C_{18} , não polares, polares, de troca iónica e covalentes. No entanto, os cartuchos também apresentam algumas desvantagens como a perda de analito, o eventual entupimento, a não reutilização dos mesmos, sendo que cada cartucho serve apenas para uma extração e, conseqüentemente, por este motivo tornam-se mais dispendiosos [46]. Neste trabalho foram utilizados cartuchos de extração OASIS® PRIME MCX, após avaliação face a outros cartuchos, que é um produto de extração de fase sólida ortogonal de fase reversa e troca catiónica, onde está introduzido um polímero com propriedades hidrofílicas, sendo por isso bastante implementado para compostos com características básicas, como é o caso dos antidepressivos, retendo-os numa sílica com grupos ácidos sulfónicos alifáticos [47].

Tal como referido anteriormente, a SPE é uma técnica com um procedimento fácil, dividido em 5 etapas: acondicionamento, passagem da amostra, lavagem, secagem e eluição (Figura 5).

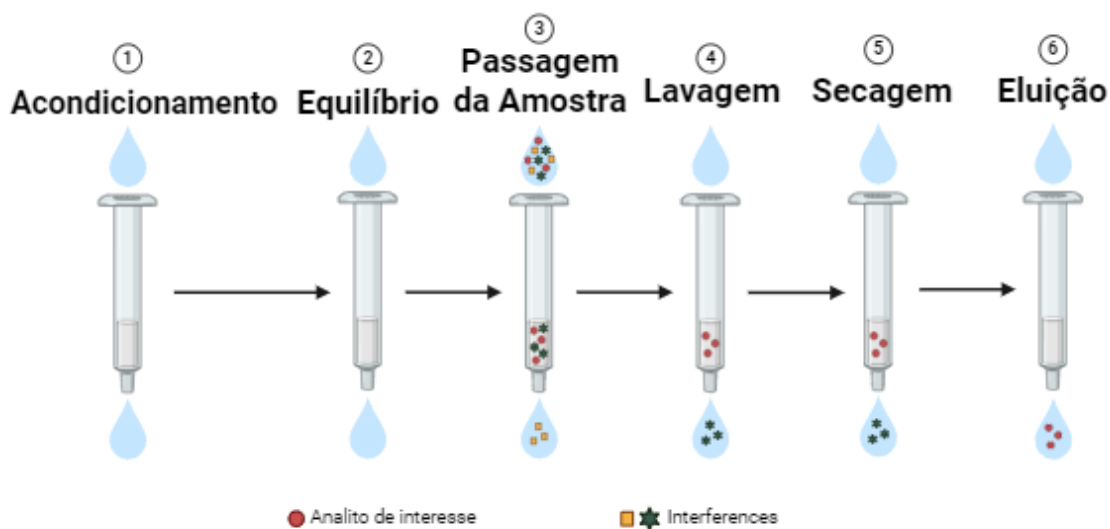


Figura 5 - Representação das etapas do processo de SPE.

Inicialmente, como o sorbente está inativado, o cartucho deve ser acondicionado (etapa 1) de forma a facilitar a ativação dos grupos funcionais do sorbente, pela passagem do solvente adequado, normalizando o ambiente da coluna para a passagem da amostra.

Caso o sorbente fique completamente exposto, poderá haver mais interações entre o soluto e a fase orgânica.

Uma vez concluído o acondicionamento, faz-se passar a amostra (etapa 2) pelo cartucho através da difusão da mesma, passando pelo sorbente por gravidade ou sob a ação de vácuo. Este processo permite não só a ligação dos analitos de interesse, como também de alguns interferentes aos grupos funcionais do sorbente.

De seguida, procede-se à lavagem (etapa 3) de forma a remover os possíveis interferentes que possam ter ficado retidos no sorbente. Nesta etapa é necessário selecionar os solventes orgânicos apropriados para que apenas os interferentes sejam eluídos.

Posteriormente, dá-se a secagem (etapa 4), que consiste na remoção de possíveis contaminantes e resíduos aquosos, que possam interferir com o extrato sob a ação de vácuo.

Por fim, procede-se à eluição (etapa 5), em que nesta etapa faz-se passar um solvente de eluição adequado que quebre as ligações entre os analitos de interesse e o sorbente, de forma a serem libertados e recuperados para posterior análise cromatográfica [48,49].

5. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica que tem vindo a demonstrar a sua utilidade na deteção, separação e purificação de analitos presentes em matrizes complexas para posterior análise qualitativa e quantitativa.

Ao longo dos anos, os sistemas cromatográficos têm sofrido um desenvolvimento substancial, justificado pela procura de limites de deteção e quantificação mais baixos e uma maior seletividade, garantindo uma análise mais eficaz, surgindo assim sistemas como a cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) [50].

Todos os sistemas cromatográficos são compostos por uma fase estacionária e uma fase móvel, sendo estas responsáveis pela separação dos analitos de interesse. Os analitos são transportados pela fase móvel, podendo esta diferir entre um gás ou um líquido dependendo do tipo de sistema cromatográfico, através da fase estacionária [51].

Tal como na SPE, também nos sistemas cromatográficos é crucial ter conhecimento das características moleculares de adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-líquido), afinidade e diferença entre pesos moleculares, para se definirem as condições cromatográficas de modo a obter-se a melhor separação possível [52].

Embora estes tipos de equipamentos sejam reconhecidos por apresentar uma boa eficiência de separação, para que os analitos de interesse sejam detetados os sistemas

cromatográficos têm de estar acoplados a detetores que podem variar consoante a necessidade do utilizador. Os sistemas de deteção mais comumente usados são detetores de fluorescência (FLD), detetores de *diode array* (DAD), detetores por ionização de chama (FID), espectroscopia de absorção atómica (AAS), espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis), espetrometria de massa (MS) e espetrometria de massa em tandem (MS/MS) [53]. Neste trabalho o sistema cromatográfico utilizado foi a GC-MS/MS, pelo que vai ser abordado na próxima secção.

5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa em tandem

A GC tem sido uma ferramenta de alta importância na análise cromatográfica, estando já implementada numa panóplia de áreas de investigação como ambiental, farmacognosia, biologia, microbiologia, forense, cosmética, farmacêutica, biotecnologia, bioquímica, entre outras, devido à sua capacidade de identificar múltiplos compostos nas mais variadas matrizes como sangue, urina, cabelo, plantas, alimentos, ar, solos, água, etc [54].

O sistema cromatográfico é constituído por quatro partes essenciais (Figura 6): uma unidade de injeção, um forno, uma fonte de ionização e um detetor.

A unidade de injeção é o local onde são injetados os analitos e volatilizados. O forno é o local onde está inserida uma coluna capilar (fase estacionária) para onde os analitos são transportados pela fase móvel após volatilização. Esta fase móvel trata-se de um gás inerte (hidrogénio, hélio, azoto). Quando os analitos entram na coluna são separados com base na volatilização de cada composto e com as interações com a fase estacionária. O processo de separação vai depender das diferentes afinidades dos analitos pela fase estacionária, assim como das suas propriedades físicas, ponto de ebulição e temperatura de volatilização. Dependendo da força da interação, cada analito origina tempos de retenção diferentes, que é o tempo que cada analito leva desde o momento em que foi injetado até ao momento em que o seu pico aparece no cromatograma.

Os analitos ao saírem da coluna procedem para a fonte de ionização, que é responsável pela conversão dos compostos em iões. Este processo pode ser realizado através de muitas técnicas como a ionização química, ionização por *electrospray* ou ionização por impacto eletrónico, sendo que foi esta última a técnica de ionização utilizada no presente trabalho.

Após ter sido efetuada a ionização, os analitos seguem para o detetor, onde são convertidos em sinais eletrónicos proporcionais à concentração dos compostos eluídos da coluna. Posteriormente, esses sinais são transmitidos para um *software* que os

converte em picos cromatográficos, onde a área de cada pico está relacionada com a quantidade de analito presente na amostra. A análise dos picos, incluindo a altura, área e tempo de retenção permite não só identificar como também quantificar os compostos presentes numa amostra.

Por fim, o *software* possibilita fazer uma parte crucial de uma análise, pois permite ajustar a linha de base, integrar áreas de picos e aplicar fatores de resposta para fornecer resultados quantitativos precisos [52,55,56].

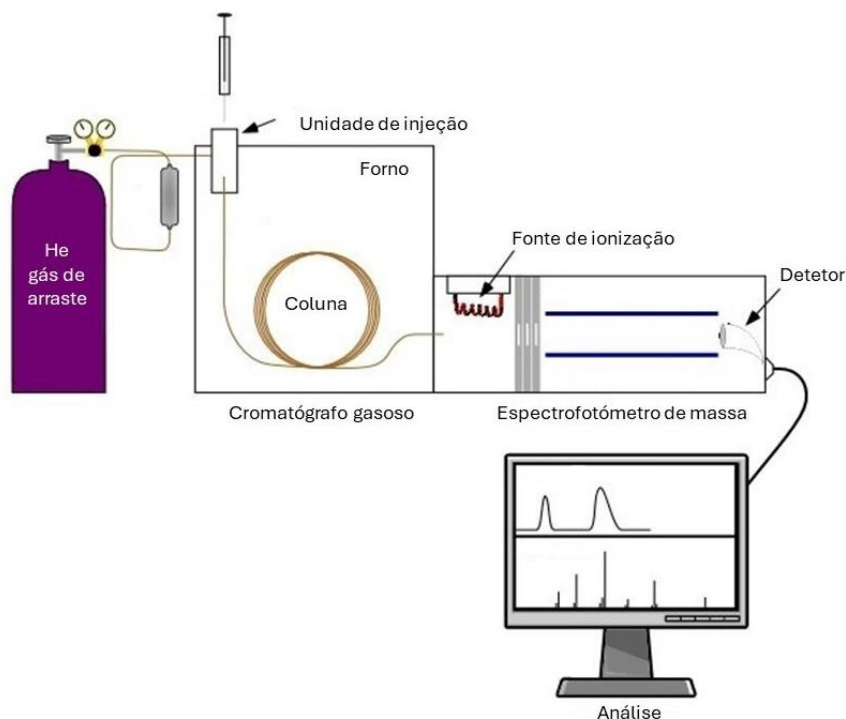


Figura 6 - Representação esquemática do GC-MS e os seus componentes. (adaptado de Wu et al. 2012 [57])

A MS e MS/MS são os tipos de detetores mais utilizados, pois podem ser acoplados tanto em cromatografia líquida (LC) como em cromatografia gasosa (GC), tendo como principal vantagem a obtenção de informações mais detalhadas sobre diferentes compostos e a confirmação da identidade e quantificação dos mesmos de acordo com a sua razão massa-carga (m/z) [44,53,58,59].

A MS (designação usada quando se trata de um quadrupolo simples) permite a identificação e quantificação de moléculas com base na medição das suas massas moleculares e é constituída por três componentes principais. A fonte de ionização, que permite ionizar as moléculas presentes numa amostra originando iões carregados. Posteriormente, estes prosseguem para o quadrupolo, que é constituído por quatro hastes metálicas paralelas que criam um campo elétrico oscilante que permite que apenas os iões com uma razão m/z específica passem pelo quadrupolo, eliminando os iões que não se pretendem identificar e possíveis interferentes. Após isto, seguem para o

detetor onde são convertidos num sinal elétrico, que será amplificado e processado dando origem ao espectro de massa [56].

A MS tem sido amplamente usada devido à alta sensibilidade e seletividade e por permitir a detecção de compostos em concentrações vestigiais e em amostras complexas. Por estas mesmas razões, tem havido um desenvolvimento contínuo em tecnologias deste campo, como a espectrometria de alta resolução e os sistemas tandem (MS/MS), que têm expandido ainda mais a sua aplicabilidade e precisão em análises complexas.

A MS/MS (designação usada quando se trata de um triplo quadrupolo), como referido anteriormente, é uma técnica avançada da MS, que envolve o uso de três quadrupolos em sequência, permitindo a análise de transições de iões selecionadas, visando a sua utilidade diferenciada para análises de compostos em misturas complexas.

A MS/MS é constituída por uma fonte de iões, três quadrupolos e um detetor (Figura 7). Inicialmente, os compostos entram na fonte de iões, onde as moléculas presentes na amostra são ionizadas. Os iões dos analitos de interesse gerados passam pelo primeiro quadrupolo isolando os iões percursores, ou iões pai. Posteriormente, estes iões são fragmentados através da colisão com o gás de colisão (azoto), originando os seus produtos iónicos também denominados como iões filhos, na célula de colisão (segundo quadrupolo). Por fim, os iões filhos atravessam o terceiro quadrupolo que os separa de possíveis interferentes que ainda possam estar presentes, com base na sua razão m/z , chegando ao detetor, o que possibilita determinar uma relação entre iões pai e iões filho [53,56,60].

Comparando os dois detetores comprova-se que a MS/MS apresenta maior robustez, especificidade, sensibilidade e redução de interferentes em relação à MS, pois a eficácia desta última, pode ser comprometida em situações em que na mesma amostra estejam presentes compostos com massas semelhantes ou quando há a necessidade de distinguir isómeros [56].

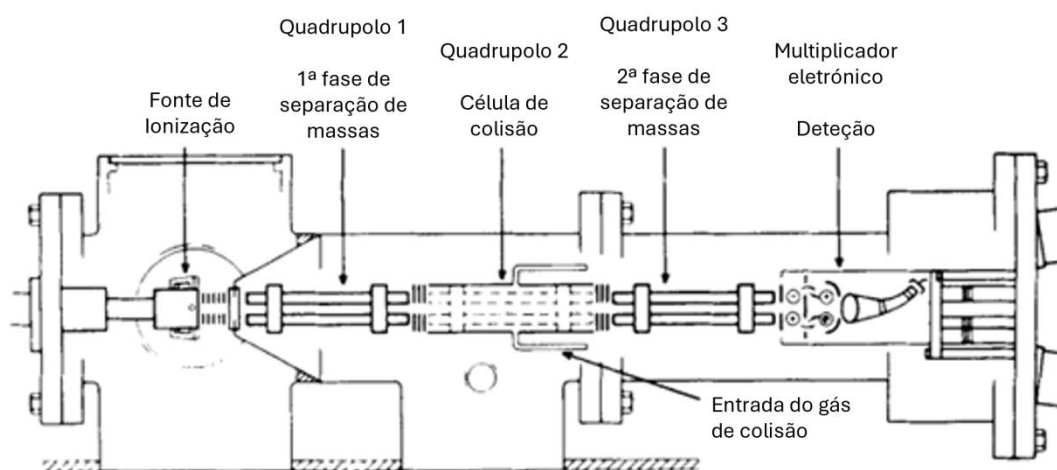


Figura 7 - Representação esquemática do detetor MS/MS. (adaptado de Yost et al. 1983 [61])

No caso particular da GC-MS/MS, todo o equipamento apresenta temperaturas elevadas (p.e. a temperatura da fonte de íões é de aproximadamente 350 °C e a temperatura dos quadrupolos é aproximadamente 250 °C) levando ao aparecimento de contaminantes/interferentes mais facilmente, que são muitas vezes eliminados pelo vácuo ou com o auxílio do hélio (gás de arraste), caso consigam seguir o mesmo percurso que os íões percursoros, estes interferentes, quando se encontram na célula de colisão, interagem com o azoto, reduzindo assim a sua transmissão e também o ruído cromatográfico [62].

Após deteção, o *software* transforma os sinais elétricos em espectros cromatográficos, que podem ser programados em 6 modos operacionais: íões produto, íões percursoros, perda neutra, varrimento (*SCAN*), monitorização de íões selecionados (*SIM*) e monitorização de múltiplas reações (*MRM*), sendo os 3 últimos os mais utilizados.

O modo *SCAN* programa o espectro de massa de forma a analisar todas as massas presentes em todo o espectro ou numa determinada região.

No modo *SIM* apenas se verifica a separação do íão selecionado dos compostos-alvo, podendo aumentar a sensibilidade.

No modo *MRM* ocorre a separação de dois ou mais íões que são fragmentados, característico da MS/MS, possibilitando analisar vários analitos em simultâneo, aumentando assim a seletividade e oferecendo maior sensibilidade que o modo *SIM* [63–65].

6. Validação do método analítico

A Organização Internacional para Padronização (ISO) define a validação de métodos analíticos como o processo de confirmação através de um exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um uso pretendido são consistentemente atendidos [66].

A validação é um requisito fundamental, que visa garantir que os resultados obtidos por um método analítico possam ser reproduzidos sob variadas condições e que os procedimentos utilizados para a identificação e quantificação de analitos sejam precisos e confiáveis [67], para além disso, as técnicas aplicadas aos métodos estão sujeitas a parâmetros de validação, e para isso existem várias *guidelines* que se podem seguir, entre elas a *Food and Drug Administration* (FDA) [68], que foram as *guidelines* adotadas neste trabalho.

6.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de os métodos analíticos distinguirem e quantificarem uma substância específica na presença de outras na mesma amostra, assegurando a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos. De modo a avaliar este parâmetro, pode ser realizado um branco de amostra com a finalidade de averiguar a existência ou não de interferentes no tempo de retenção do composto alvo que possam alterar os sinais dos mesmos. Adicionalmente, é também importante a monitorização das intensidades relativas dos compostos e, para tal, é necessário estabelecer critérios de aceitação qualitativos com a finalidade de confirmar se os sinais detetados no cromatograma dizem respeito ao composto de interesse [69]. Neste trabalho foram utilizados os critérios de aceitação da *World Anti-Doping Agency* (WADA), estando os seus critérios descritos na Tabela 3 [70].

Tabela 3 - Intervalos de tolerância máxima permitidos para as abundâncias relativas dos iões monitorizados em modo MRM e expressos em percentagem (%) [70].

Abundância relativa (% relativa ao pico base)	Intervalo máximo de tolerância permitido (%)
>50 - 100	± 10 (intervalo absoluto)
>25 - 50	± 20 (intervalo absoluto)
1 - 25	± 5 (intervalo absoluto)

6.2. Linearidade e Curva de Calibração

A linearidade de um método analítico é a capacidade de produzir resultados proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo específico, sendo crucial para determinar se um método pode ser usado para quantificar o analito com precisão em diferentes concentrações. Para isto, é necessário proceder à realização de uma curva de calibração que contenha diferentes concentrações do analito em estudo (calibradores), sendo que este número depende das *guidelines* seguidas, podendo ser necessário no mínimo seis ou sete calibradores nos quais devem estar incluídos o limite inferior de quantificação (LLOQ) e o limite de deteção (LOD) [69].

A avaliação das curvas pode ser realizada por meios gráficos ou matemáticos, sendo o modelo mais utilizado a regressão linear simples, assumindo que há uma relação linear entre duas variáveis, sendo descrita pela seguinte expressão matemática [71]:

$$y = mx + b$$

Sendo que,

- **y** é a resposta medida;
- **x** é a concentração do analito;
- **m** é o declive da curva de calibração;
- **b** é a ordenada na origem.

Este ainda permite calcular o coeficiente de determinação (R^2), que deve ser o mais próximo possível de 1,0, minimizando a dispersão dos pontos experimentais e a incerteza estimada. Adicionalmente, de forma a obter informações mais precisas e uma melhor distribuição do peso atribuído a cada ponto podem ser utilizadas ponderações de $1/x$, $1/x^2$ ou $1/y$, por exemplo [72].

Para os dados obtidos, é necessário que o coeficiente de correlação e o erro relativo médio ou BIAS estejam dentro de $\pm 15\%$ em comparação com as concentrações teóricas. Contudo, no limite de quantificação, o erro permitido passa para $\pm 20\%$ das concentrações teóricas [71].

6.3. Precisão e Exatidão

A precisão indica o grau de concordância entre os resultados independentes realizados sob condições específicas, podendo este parâmetro ser subdividido em precisão intradia, intermédia e interdia. A precisão intradia ou repetibilidade, visa minimizar a influência de variáveis como as condições laboratoriais, o operador e o equipamento sobre os resultados, em que esta é determinada pela análise de amostras dentro de um breve intervalo de tempo. Em contraste, a precisão interdia ou reprodutibilidade, refere-se à avaliação das mesmas medidas em diferentes dias, permitindo verificar a estabilidade dos resultados ao longo do tempo. A precisão intermédia refere-se à variabilidade dos resultados obtidos quando um método analítico é aplicado em diferentes condições dentro do mesmo laboratório. Isso pode incluir variações ao longo do tempo, diferentes dias, ou diferentes operadores. Em outras palavras, é uma medida da consistência e da reprodutibilidade dos resultados quando o método é usado sob condições variadas, mas dentro do mesmo ambiente de laboratório. A precisão intermédia ajuda a garantir que o método seja fiável e que os resultados sejam consistentes mesmo quando há pequenas mudanças nas condições de teste. [71]

A exatidão representa a concordância entre as médias dos resultados obtidos e o valor de referência aceite como verdadeiro. Para determinar este parâmetro, são usadas réplicas de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. A avaliação da exatidão pode ser feita de várias formas, sendo o método do BIAS o mais utilizado, com a fórmula [71]:

$$BIAS = \frac{\text{Concentração calculada} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

6.4. Limites Analíticos

É essencial determinar a menor concentração de analito que pode ser detetado e quantificado durante a validação do método. O LOD e o LOQ podem sofrer ajustes durante o processo de validação, principalmente se surgirem alterações que os possam influenciar como o analista, os reagentes, o equipamento e também quando se proceder a uma nova curva de calibração. A nova curva pode alterar os limites pois ela define a relação entre a concentração do analito e a resposta do detetor e caso se verifiquem mudanças nas condições experimentais ou nos padrões de calibração, a sensibilidade do método pode ser influenciada, resultando em novos valores para o LOD e LOQ.

O LOD representa a quantidade mínima de analito que pode ser detetada numa amostra, apesar de não necessariamente quantificada [71]. A avaliação deste parâmetro pode ser feita através de vários métodos, embora o mais usado seja a regressão linear, que é um método estatístico que relaciona a resposta do detetor com a concentração do analito, calculando o LOD a partir de uma curva de calibração linear. Esta abordagem envolve a extrapolação da linha de regressão até ao ponto em que o sinal se torna indistinguível do ruído de fundo, pois este pode influenciar diretamente a magnitude do LOD. Assim, de modo a assegurar não só a resposta média do sistema como também a variabilidade do ruído, o LOD pode ser calculado através da seguinte equação [73]:

$$LOD = \frac{3\sigma_{res}}{S}$$

Sendo que,

- **σ_{res}** é o desvio padrão dos resíduos da regressão (que reflete o ruído do sistema)
- **S** é a inclinação da curva de calibração

O LOQ é a concentração mais baixa de um analito que pode ser quantificada de forma precisa e exata dentro de limites de erro predefinidos, garantindo que o método analítico é capaz de fornecer resultados quantitativos confiáveis a partir desta concentração. Assim o LOQ é geralmente calculado através da seguinte equação [73]:

$$LOQ = \frac{10\sigma_{res}}{S}$$

Sendo que,

- **σ_{res}** é o desvio padrão dos resíduos da regressão (que reflete o ruído do sistema)
- **S** é a inclinação da curva de calibração

Neste estudo foi considerado o limite de quantificação mais baixo (LLOQ), que representa uma variante do LOQ. Enquanto o LOQ se refere de maneira geral, à menor concentração quantificável em qualquer tipo de análise, o LLOQ é mais especificamente usado para definir o ponto mais baixo da curva de calibração onde as medições ainda são

confiáveis, tendo assim aplicação prática em situações que exigem detecções extremamente sensíveis [73]. O LLOQ é definido como a menor concentração de um analito que pode ser medida e quantificada com uma precisão e exatidão adequadas, apresentando um coeficiente de variação inferior a 20% e um desvio (BIAS) dentro do intervalo de $\pm 20\%$ da concentração calculada [71]. Assim, o LLOQ é o menor valor de quantificação dentro de um intervalo de linearidade de um método analítico, sendo frequentemente usado em ensaios que exigem alta sensibilidade, como em bioanálise [73].

6.5. Estabilidade

A estabilidade de um composto numa matriz depende de vários fatores, incluindo as propriedades físico-químicas, as características da matriz utilizada e as condições de armazenamento. Para estudar a estabilidade existem diversas abordagens disponíveis, sendo recomendável escolher métodos que possam avaliar a estabilidade de maneira a abordar as situações tipicamente encontradas em laboratório, como períodos de congelamento, locais de armazenamento e do tempo em que as amostras ficam armazenadas na bancada, caso não seja possível efetuar a sua análise no momento. Não é necessário a realização do estudo da estabilidade dos analitos, caso já tenha sido adequadamente documentada por meio de referências publicadas [74].

Para que um analito seja considerado estável o sinal médio tem de apresentar um BIAS aceitável, este deve estar dentro de uma tolerância de 20% e caso seja necessário aplicar critérios mais rigorosos, essa tolerância pode ser reduzida para 10-15% [71].

6.6. Recuperação

De forma a garantir que a extração dos analitos é eficiente e reprodutível recorre-se à determinação das taxas de recuperação, sendo estas calculadas como a média da recuperação, em percentagem, dos analitos alvo. O analista deve realizar ensaios de recuperação comparando os resultados analíticos dos extratos obtidos com os extratos brancos fortificados com os analitos após a extração [71].

A equação utilizada para o cálculo das recuperações foi a seguinte [71]:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico do analito sujeito a extração} / \text{Área do pico do PI}}{\text{Área do pico do analito não sujeito a extração} / \text{Área do pico do PI}}$$

7. Detecção e quantificação de antidepressivos em águas residuais

A pesquisa literária relativa à detecção e quantificação dos antidepressivos, mais concretamente dos ISRS e dos ISRNS, em águas residuais foi baseada em artigos científicos originais obtidos através da base de dados *SciVerse Scopus* [75] (pesquisa realizada a 23/12/2023). As palavras-chave usadas foram “*Wastewater*”, “*Antidepressants*” e “*Determination*”, sobre a qual se obtiveram 59 resultados dos quais apenas 26 foram aceites (Tabela 4), tendo em conta os critérios de exclusão definidos previamente, nomeadamente: artigos onde a matriz não é água residual, os analitos de interesse não serem os mesmos que os do presente trabalho, a instrumentação utilizada ser biossensores, artigos de revisão ou artigos ao qual não se conseguiu ter acesso. Assim sendo os parâmetros tomados em conta para a análise dos artigos foram baseados nos antidepressivos em estudo, o tipo de extração e instrumentação usada, os limites de detecção e quantificação e recuperações, de forma a poder haver uma possível comparação com os dados obtidos neste trabalho.

Ao analisar os resultados da pesquisa efetuada pode concluir-se que não existe até ao momento nenhum trabalho em que se utilize ambas as metodologias: SPE e GC-MS/MS, fortalecendo o interesse e novidade do método analítico desenvolvido neste trabalho. Adicionalmente, podem verificar-se que a SPE é a técnica de extração mais empregue para a extração de antidepressivos em amostras de ARs, onde os cartuchos OASIS® HLB são preferencialmente usados, com volumes de amostra a variar entre 0,35 mL e 1 L. Por fim, podemos também verificar que a maioria dos trabalhos publicados apresentam valores de LOD e LOQ baixos, indicando alta sensibilidade e garantia de precisão, e valores de recuperação elevados, demonstrando alta eficiência dos métodos desenvolvidos.

Tabela 4 - Métodos cromatográficos para a detecção e quantificação dos compostos em estudo em amostras de ARs.

Analitos	Volume (mL)	Método de extração	Método de detecção	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Recuperações (%)	Referência
SRT	8	SS-LPME	GC-MS	8700	2000	n.s.	[76]
FLX	50	SPE (OASIS® HLB)	2D-UHPLC-DAD	19,6	65,3	94,17 - 97,69	[77]
a) CIT b) FLX c) SRT d) VLX	0,025	Injeção Direta	UHPLC-MS/MS	a) 1 - 5 b) 4 - 10 c) 4 - 7 d) 1 - 2	a) 3 - 15 b) 14 - 33 c) 13 - 25 d) 5	a) 95 - 98 b) 85 - 95 c) 77 - 96 d) 97 - 98	[78]
a) CIT b) VLX	50 ^a (100 ^b)	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	a) 3 ¹ b) 30 ¹	a) 0,70 ^a (0,06 ^b) b) 4,0 ^a (0,70 ^b)	a) 79 - 92 b) 79 - >120	[79]
a) FLX b) SRT c) PXT	8	SS-LPME	GC-MS	a) 1500 b) 260 c) 3400	a) 4900 b) 860 c) 11000	a) 94,7 - 110,7 b) 88,3 - 106,4 c) 88,2 - 113,3	[80]
a) CIT b) SRT c) VLX	50 e 100	Injeção Direta e SPE (OASIS® HLB)	UHPLC-MS/MS	n.s.	a) 73 - 105 b) n.s. c) 25 - 28	20 - 180	[81]
a) CIT b) FLX	20	MSPE	HPLC-DAD	a) 1580 b) 1430	a) 4710 b) 4820	a) 98,8 - 104,5 b) 97,0 - 103,8	[82]
a) FLX b) SRT	400	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	a) 0,8 - 1,2 b) 2,2 - 3,1	a) 2,4 - 3,6 b) 6,3 - 9,3	a) 79,8 - 89,4 b) 85,6 - 95,6	[83]
CIT	n.s.	GEL-EME/SHS-HLLME	GC-FID	300	2500	91,6 - 93,7	[84]
a) SRT b) PXT	500	SPE (OASIS® MCX)	GC-MS	a) 3,1 b) 26	a) 12,5 b) 104,2	n.s.	[85]
a) CIT b) FLX c) SRT d) VLX	5	on-line SPE	LC-MS/MS	a) 1,9 b) 2,0 c) 3,3 d) 0,8	a) 6,4 b) 6,7 c) 11 d) 2,5	a) 104 - 118 b) 90 - 110 c) 91 - 121 d) 97 - 107	[86]

a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	100	SPE (OASIS® MCX)	UHPLC-MS/MS	n.s.	a) 0,9 b) 1,0 c) 0,8 d) 1,1 e) 0,7	a) 96 - 114 b) 80 - 114 c) 91 - 112 d) 97 - 119 e) 95 - 111	[87]
VLX	8	DLLME	HPLC-FLD	24,0 - 24,4	n.s.	69 - 91	[88]
a) CIT b) FLX c) PXT d) SRT e) VLX	a) 25 ^c (15 ^d) b) 15 ^c c) 15 ^c d) 25 ^c (15 ^d) e) 25 ^c (15 ^d)	LLE e SPE (OASIS® HLB, OASIS® MCX e Supelclean™ ENVICarb™)	LC-MS/MS	a) 1,33 ^c (1,11 ^d) b) 13,3 ^c c) 13,3 ^c d) 0,13 ^c (0,11 ^d) e) 0,13 ^c (0,11 ^d)	a) 4,0 ^c (3,3 ^d) b) 40,0 ^c c) 40,0 ^c d) 0,4 ^c (0,33 ^d) e) 0,4 ^c (0,33 ^d)	a) 66,5 - 106,9 ^c (52,9 - 90,0 ^d) b) 80,4 - 123,4 ^c c) 60,9 - 95,1 ^c d) 69,4 - 112,3 ^c (29,4 - 71,2 ^d) e) 74,3 - 106 ^c (64,9 - 106,1 ^d)	[89]
FLX	250	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	0,259	0,864	9,91 - 23,79	[90]
FLX	100	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	6,0	21,0	82 - 109	[91]
a) CIT b) FLX c) PXT d) SRT e) VLX	1	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	n.s.	a) 50,0 - 10000 b) 50,0 - 20000 c) 50,0 - 20000 d) 50,0 - 20000 e) 50,0 - 20000	a) 81,9 - 88,6 b) 49,2 - 66,8 c) 59,2 - 82,5 d) 49,2 - 75,8 e) 81,8 - 91,4	[92]
a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	50	SPE (STRATA™-X-C)	LC-MS/MS	a) 3,6 b) 0,6 c) 0,08 d) 0,2 e) 4,2	a) 10,8 b) 1,8 c) 0,24 d) 0,6 e) 12,6	a) 82 - 124 b) 77 - 97 c) 69 - 93 d) 76 - 97 e) 82 - 111	[93]
a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	300	SPE (3M cation disk)	UHPLC-MS/MS	a) 40,0 b) 120,0 c) 20,0 d) 50,0 e) 30,0	a) 110,0 b) 500,0 c) 60,0 d) 160,0 e) 90,0	81,2 - 118	[94]
a) CIT b) VLX	0,35	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	a) 4,1 b) 8	a) 102 b) 18	n.s.	[95]
a) PXT b) VLX	100	SPE (OASIS® HLB)	UHPLC-MS/MS	n.s.	a) 170 b) 7	a) 68 - 96 b) 227 - 233	[96]
a) FLX b) VLX	50	SPE (OASIS® MCX)	LC-MS/MS	n.s.	a) 1 b) 5	a) 85 - 93 b) 99 - 109	[97]

a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	250	SPE (STRATA™-SCX)	LC-MS/MS	a) 0,077 b) 0,050 c) 0,048 d) 0,096 e) 0,10	n.s.	a) 74,7 - 104,93 b) 81,3 - 99,4 c) 80,7 - 98,6 d) 76,6 - 90,6 e) 73,2 - 107,2	[98]
a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	1000	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	a) 0,45 b) 0,25 c) 0,21 d) 0,32 e) 0,29	n.s.	a) 81 - 113 b) 98 - 122 c) 85 - 115 d) 91 - 107 e) 98 - 128	[99]
a) FLX b) PXT	500	SPE (OASIS® HLB)	LC-MS/MS	a) 13 b) 11	a) 36 b) 31	a) 91,7 - 101,5 b) 82,6 - 95,4	[100]
a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	500	SPE (H ₂ O philic DVB)	CE-ESI-TOF-MS	a) 9000 b) 16000 c) 39000 d) 31000 e) 7000	n.s.	a) 9 b) 16 c) 39 d) 31 e) 7	[101]
a) CIT b) FLX c) SRT d) PXT e) VLX	100	SPE OASIS® PRIME MCX	GC-MS/MS	a) 12,25 b) 24,50 c) 24,50 d) 98,00 e) 195,00	a) 49 b) 49 c) 49 d) 195 e) 195	a) 67,91 - 81,13 b) 13,10 - 17,91 c) 51,34 - 78,24 d) 47,59 - 59,95 e) 6,91 - 11,78	Este trabalho

Legenda: n.s. - não especificado; ¹: Limite de detecção instrumental; ^a: Amostras de água altamente poluídas; ^b: Amostras de água pouco poluídas; ^c: Método A; ^d: Método B; 2D-UHPLC-DAD: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência bidimensional acoplada a um detetor *diode array*; CE-ESI-TOF-MS: Eletroforese capilar através de ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massa com tempo de voo; DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva; GC-FID: Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama; GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; GEL-EME: Extração de eletromembrana em gel; HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor *diode array*; HPLC-FLD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência; LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem; LLE: Extração líquido-líquido; MSPE: Extração em fase sólida magnética; SHS-HLLME: Microextração líquido-líquido homogênea com base em solvente e hidrofilicidade comutável; SPE: Extração em fase sólida; SS-LPME: Microextração em fase líquida baseada em solvente comutável; UHPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem.

Capítulo 2 | Justificação do tema e objetivos

Nos últimos anos, o consumo de antidepressivos em Portugal tem vindo a aumentar significativamente. Segundo dados publicados pelo Infarmed no “Relatório de Estatísticas de Consumo de Medicamentos (2022)”, houve um crescimento constante na prescrição e utilização desses medicamentos, tendo-se atingido um pico durante a pandemia COVID-19. Adicionalmente, entre 2017 e 2023 houve um aumento de 43% na prescrição deste tipo de medicamentos [102].

Este aumento pode ser atribuído a vários fatores, incluindo o impacto da crise económica, as mudanças sociais e, mais recentemente, os efeitos psicológicos da pandemia. Para além disso, o tabu em torno da saúde mental tem diminuído, levando mais pessoas a procurarem tratamento [102].

Um outro fator que pode ter levado a este aumento é a facilidade de entrada destes medicamentos no mercado português. Esta é uma questão, que tem levantado grande discussão, pois nos últimos anos o processo de aprovação e comercialização de novos antidepressivos tem sido agilizado [103].

Embora haja esta preocupação para com a saúde mental, não tem havido investigação em torno da determinação deste tipo de medicamentos em ARs, que não só pode ser útil como uma matriz ótima para mapear o seu consumo com vista ao controlo ou permitir identificar um descarte negligente numa determinada região, como também para o conhecimento da presença destes compostos nos efluentes das ETARs, e como estes efluentes podem entrar em contacto com a população, no caso de exposição a tais compostos e possível intoxicação podem afetar tanto o ser humano como a fauna [104].

Tendo o referido anteriormente em conta, o objetivo deste trabalho prende-se o desenvolvimento e otimização de um método analítico para a deteção e quantificação de cinco antidepressivos (CIT, FLX, PXT, SRT e VLX) em águas residuais, mais especificamente afluentes e efluentes de ETARs, recorrendo à SPE e à GC-MS/MS.

Capítulo 3 | Materiais e Métodos

1. Material e Instrumentação

- Cartuchos de SPE Oasis® Prime MCX 30 mg da Waters (EUA), adquiridos à Waters (Portugal);
- Cartuchos de SPE Oasis® HLB adquiridos à Waters (Portugal);
- Cartuchos de SPE STRATA™-X de 60 mg/ 3 mL, adquiridos à Phenomenex (Espanha);
- Cartuchos de SPE STRATA™-X-C de 60 mg/ 3 mL, adquiridos à Phenomenex (Espanha);
- Material comum de laboratório: balões volumétricos, copos de precipitação de diversos volumes, tubos de ensaio com tampa e pipetas volumétricas de vários volumes;
- Vortex mixer 230V, Labnet International (VWR International, Portugal);
- Micropipetas automáticas Gilson, volumes máximos 20, 200 e 1000 µL (Gilson, Espanha);
- Manifold da Waters – modelo WAT200683 (Waters, Portugal);
- Câmara de refrigeração (4 °C), Dagard Ibérica (Portugal);
- Bomba de vácuo da GAST – modelo DOA-P505-BN (Waters, Portugal);
- Turbovap LV da Biotage (Dias de Sousa, Portugal);
- Sistema de GC modelo HP 7890A, acoplado à espetrometria de massa triplo quadrupolo modelo 7000B, ambos da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha). O sistema encontra-se também equipado com um injetor PTV da Gerstel (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). A separação dos compostos foi realizada com recurso a uma coluna capilar (30m x 0,25mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) com 5% fenilmetilsiloxano (HP-5 MS), fornecida por J&W Scientific (Folsom, CA, EUA).

2. Reagentes e Padrões

- Os padrões analíticos (PAs) de cloridrato de fluoxetina, venlafaxina, citalopram e paroxetina foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O padrão analítico de cloridrato de sertralina foi cedido gentilmente pela Pfizer (Groton, MA, EUA). Relativamente ao padrão interno de protriptilina foi adquirido à Sigma-Aldrich (Lisboa, Portugal);
- Água ultrapura Milli-Q, obtida através do sistema Milli-Q RG Ultra-Pure Water System, Milipore Corporation (Milipore, Bedford, MA, EUA);
- *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Macherey-Nagel (Düren, Alemanha);
- Trimetilclorosilano (TMCS), Macherey-Nagel (Düren, Alemanha);
- Metanol 99,8% HPLC grade, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Ácido clorídrico 37%, Carlo Erba (Milão, Itália);
- Hidróxido de amónia 25% (NH₄OH) (pro-analysis), J.T. Baker (Holanda);
- Ácido fórmico LC grade, Laborspirit (Santo Antão do Tojal, Portugal);
- Formiato de amónia LC grade, Laborspirit (Santo Antão do Tojal, Portugal).

3. Preparação de soluções

3.1. Soluções padrão

Todos os padrões foram adquiridos à concentração de 1 mg/mL. A solução de trabalho contendo os padrões analíticos FLX, VLX, CIT, SRT e PXT foi preparada diluindo as respetivas soluções comerciais em metanol, obtendo-se uma concentração final de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Relativamente ao padrão interno, PTP, o processo de preparação foi o mesmo utilizado para os restantes PAs, alcançando uma concentração final de 100 µg/mL, tendo-se diluindo com a finalidade de obter uma solução à concentração de 50 µg/mL. Após a preparação de todas as soluções padrão, estas foram armazenadas em frascos de vidro de âmbar e armazenadas a 4 °C, protegidas da luz.

3.2. Reagente de derivatização

O reagente de derivatização foi preparado de forma a obter uma solução à concentração de 5% de TMCS em MSTFA. Esta solução foi posteriormente armazenada a 4 °C e protegida da luz.

3.3. Solução de amónia a 5% em água

Num balão volumétrico de 100 mL foram pipetados 5 mL de hidróxido de amónia e aferiu-se o volume com água ultrapura.

3.4. Solução de ácido fórmico a 2% em metanol

Num balão volumétrico de 50 mL foi pipetado 1 mL de ácido fórmico e fez-se com metanol.

3.5. Solução de formiato de amónia (100 nM) com 2% de ácido fórmico em água

Inicialmente foram pesados 315 mg de formiato de amónia para um copo de precipitação. De seguida dissolveu-se em água ultrapura e foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, foi adicionado 1 mL de ácido fórmico 98% e fez-se com água ultrapura.

3.6. Solução de ácido clorídrico (0,1 M) em água

Num balão volumétrico de 100 mL pipetaram-se 0,840 mL de ácido clorídrico a 37% e fez-se o volume final com água ultrapura.

3.7. Solução de ácido clorídrico (0,1 M) em metanol

Num balão volumétrico de 100 mL foram pipetados 0,840 mL de ácido clorídrico a 37% e fez-se o volume final com metanol.

3.8. Solução de amónia a 5% em metanol

Para um balão volumétrico de 100 mL foram pipetados 5 mL de hidróxido de amónia e aferiu-se o volume com metanol.

4. Amostras

As amostras de ARs foram fornecidas por diversas ETARs de Portugal. Por uma questão de sigilo, não serão apresentadas as localizações destas ETARs, mas pode referir-se que se encontram distribuídas por Portugal continental e Ilhas.

A colheita das mesmas foi efetuada em duplicado, em diferentes dias e em dois pontos de amostragem, afluentes e efluentes das ETARs. Após a sua recolha foram transportadas até ao laboratório sob refrigeração e protegidas da luz. Todas as amostras permaneceram armazenadas em frascos de vidro de 500 mL protegidos da luz e a 4 °C até à sua análise.

5. Sistema e condições cromatográficas

Com o intuito de obter uma eficiência adequada de separação foram definidas algumas condições cromatográficas. A temperatura inicial do forno foi mantida a 150 °C durante 1 minuto, seguindo-se um gradiente de 5 °C/minuto até uma temperatura final de 280 °C e mantida por 4 minutos, resultando num tempo total de corrida de 31 minutos. A temperatura do injetor e do detetor foram de 250 °C e 280 °C, respetivamente. O volume

de injeção foi de 2 μL em modo *splitless*. Não havendo divisão da amostra neste modo a mesma é injetada na sua totalidade o que concede uma melhor análise para concentrações muito baixas.

O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo constante de 0,8 mL/minuto. Na célula de colisão o fluxo de hélio foi de 1,5 mL/minuto e o fluxo de azoto foi de 2,5 mL/minuto, em modo de impacto eletrônico com uma corrente de 35 μA e uma energia de 70 eV. Com o auxílio do programa de *software MassHunter WorkStation Acquisition rev. B.02.01* (Agilent Technologies), foram obtidos os dados no modo MRM, que permite escolher as transições que melhor identificam e caracterizam cada um dos analitos.

6. Preparação da amostra

Para uma análise eficiente das amostras, inicialmente foi efetuada uma homogeneização das mesmas através de movimentos rotativos. De seguida retirou-se o respetivo volume de cada amostra (100 mL). Uma vez que se trata de ARs, as amostras apresentam muita sujidade, pelo que se procede a uma filtração, onde se recorreu a papel de filtro com poros de 13 μm , com o intuito de remover o lixo de maiores dimensões. Por fim, adicionaram-se 50 μL de padrão interno antes do processo de extração.

7. Procedimento de extração

Neste estudo, a extração foi realizada utilizando a técnica de SPE com cartuchos OASIS® PRIME MCX, após o estudo de diferentes cartuchos. O método de extração foi anteriormente otimizado, ficando com 5 etapas: acondicionamento, passagem da amostra, lavagem, secagem e eluição. Para garantir a máxima eficiência da técnica utilizou-se um suporte para o uso de vários cartuchos em simultâneo (manifold) (Figura 8).

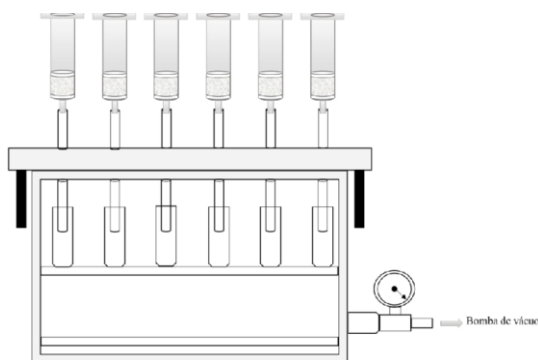


Figura 8 - Representação ilustrativa de um manifold para a SPE [105].

Na primeira etapa, os cartuchos foram acondicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura. De seguida, realizou-se a passagem da amostra pelo cartucho. Depois

adicionaram-se as soluções de lavagem, 2 mL de ácido clorídrico (0,1M) em água e 2 mL de ácido clorídrico (0,1M) em metanol. Posteriormente procedeu-se à secagem sob vácuo durante 15 minutos. E por fim, eluíram-se os analitos de interesse com 2 mL de 5% de amónia em metanol.

Depois de realizado o procedimento de extração, os extratos obtidos foram evaporados até secura total sob uma corrente de azoto, derivatizados com 50 µL de TMCS 5% em MSTFA durante 2 minutos, recorrendo-se a um microondas (1000W), e por último uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema cromatográfico, dando assim início à análise cromatográfica (Figura 9).

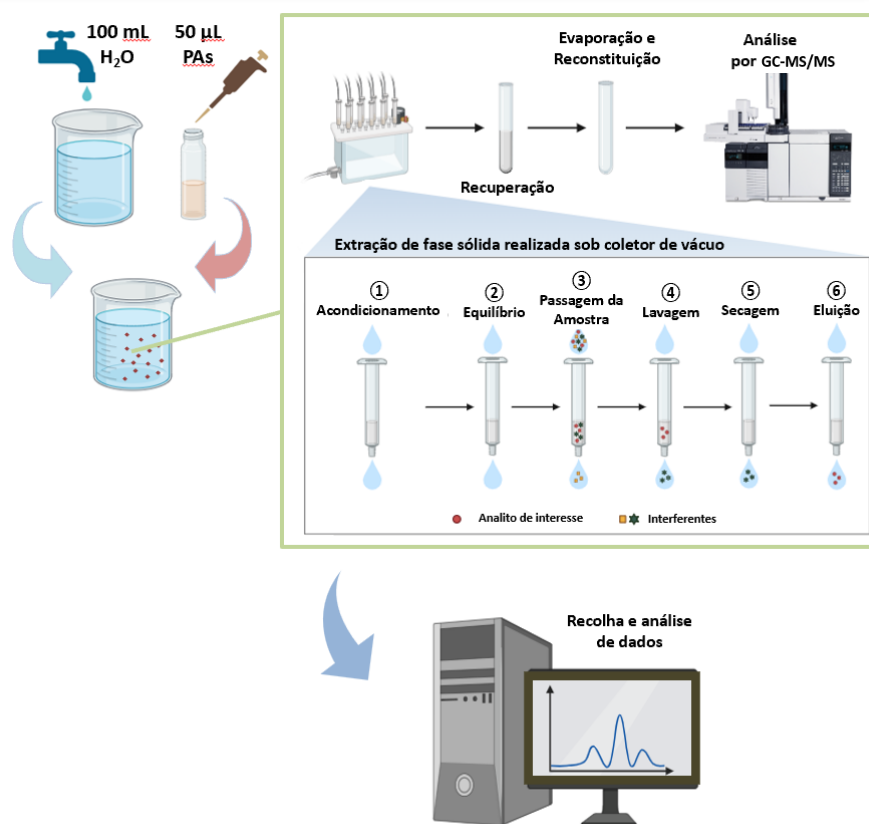


Figura 9- Representação esquemática de todo o processo de análise.

Capítulo 4| Resultados e discussão

1. Identificação dos compostos em análise

A primeira etapa para o desenvolvimento do método analítico foi definir as condições cromatográficas para a identificação dos cinco antidepressivos em estudo e, para tal, o fluxo de gás, o programa de temperatura do forno, as energias de colisão e as janelas de análise foram ajustadas.

De seguida, foi realizada uma análise qualitativa pela injeção dos padrões analíticos no sistema cromatográfico com o detetor de massa em modo de varrimento contínuo (modo SCAN) num intervalo de 50 a 500 m/z , de forma a detetar e identificar os iões característicos de cada composto em estudo. Posteriormente, e tendo em conta os espectros de massa resultantes, estes foram comparados com os existentes na biblioteca de espectros, foram identificados os iões percursos, com base na abundância relativa de cada ião, assim como as respetivas transições possíveis e também os tempos de retenção. As transições foram estabelecidas com base nos iões com mais intensidade de sinal e na sua razão m/z , assim como a ausência de interferentes. Os iões percursos anteriormente selecionados seguem o caminho de todo o sistema cromatográfico desde o módulo de injeção até ao detetor, isto é, estes iões são selecionados no primeiro quadrupolo seguindo para o segundo quadrupolo, onde são fragmentados e no terceiro quadrupolo é onde é feita a sua deteção.

Após identificação dos compostos, foi realizada uma análise em modo MRM. Nesta etapa há um aumento de seletividade e sensibilidade do método permitindo uma identificação mais correta.

Neste tipo de análise devemos ter atenção à definição das janelas de análise, estas podem ser utilizadas para cada composto, afetando a precisão do equipamento durante a retenção da transição de cada composto. Outro parâmetro que foi estudado foi o *dwell time*, que corresponde ao tempo em que o equipamento está a adquirir e procurar cada massa selecionada. Com base no estudo de todos estes parâmetros foi possível identificar todos os antidepressivos em estudo (Figura 10).

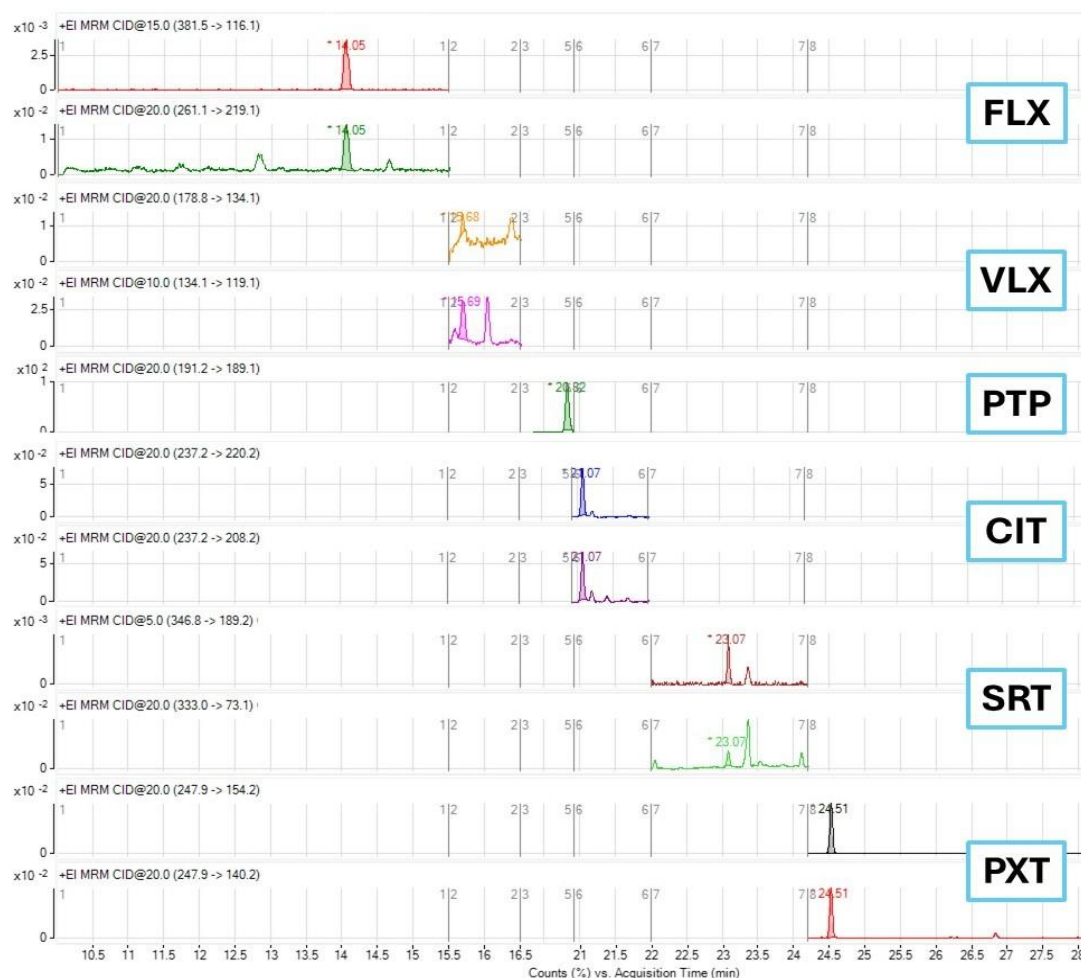


Figura 10 - Cromatograma em modo MRM, onde estão representados todos os compostos em estudo à sua concentração mais baixa de quantificação (LOQ) e o padrão interno (PTP) a 50 µg/mL.

Na Tabela 5 está representado o método em MRM utilizado no decorrer deste trabalho, onde são apresentados os tempos de retenção, transições, energias de colisão e *dwell time* de cada um dos compostos.

Tabela 5 - Transições monitorizadas em modo MRM para os compostos em estudo.

Analito	Tempo de retenção (min)	Transições (m/z)	Energia de colisão (eV)	Dwell time (ms)
FLX	14,04	261,1 -> 219,1 ^a	20	50
		381,5 -> 116,1 ^b	15	
VLX	15,70	134,1 -> 119,1 ^a	10	50
		178,8 -> 134,1 ^b	20	
PTP	20,52	191,2 -> 189,1 ^a	20	100
		-	-	
CIT	21,11	237,2 -> 220,2 ^a	20	50
		237,2 -> 208,2 ^b	20	
SRT	23,09	346,8 -> 189,2 ^a	5	50
		333,0 -> 73,1 ^b	20	
PXT	24,56	247,9 -> 154,2 ^a	20	100
		247,9 -> 140,2 ^b	20	

Legenda: ^a – Transição quantificadora; ^b – Transição qualificadora

2. Otimização do método de extração

A técnica utilizada para a realização da extração dos analitos de interesse foi como anteriormente referido a SPE. Esta técnica comparativamente a outras, tem a vantagem de concentrar e purificar analitos mesmo quando aplicados grandes volumes de amostra, mantendo o rendimento de operação e reduzir os interferentes que possam estar presentes na amostra.

Tendo em atenção os volumes de amostra aplicados nos artigos da literatura que constam na Tabela 4, estes oscilam entre 0,35 mL e 1 L, tendo sido estabelecido para este trabalho um volume de amostra de 100 mL. Este volume foi estimado tendo em conta as concentrações esperadas dos compostos de interesse nas amostras reais, já que são baixas, bem como a razoabilidade de passar esse volume de amostras através dos cartuchos de SPE e não comprometer em demasia o tempo de extração.

Tendo em conta as características dos antidepressivos em estudo e de forma a obter uma maior eficiência de extração e limpeza (diminuir a quantidade de interferentes presentes no extrato), foram testados quatro tipos de cartuchos de SPE, dois de interações de troca catiónica (OASIS® PRIME MCX e STRATA™-X-C), um de fase reversa (STRATA™-X) e um de balanço hidrofílico-lipofílico (OASIS® HLB), e vários métodos de extração diferentes. Para a análise do melhor cartucho e procedimento de extração, foram realizados diferentes ensaios onde se variaram principalmente os solventes orgânicos e respetivos volumes das etapas de lavagem e eluição, numeradas de 1 a 5 (Figura 11). Cada um dos ensaios foi realizado em triplicado.

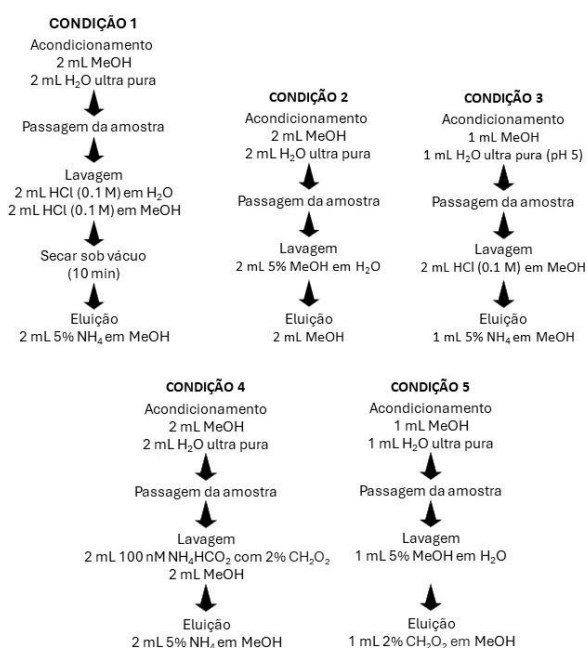


Figura 11 - Representação ilustrativa de todas as condições de extração testadas no presente trabalho.

A condição 1 foi utilizada para um estudo em determinação de antipsicóticos em ARs, e uma vez que os antipsicóticos e os antidepressivos são compostos de carácter básico, e como tal foi decidido testar esta condição no presente trabalho para os vários cartuchos de SPE referidos anteriormente [106].

Foram também testados os procedimentos de extração descritos pelos fabricantes de cada cartucho de SPE, sendo que as condições de 2 a 5 foram testadas nos cartuchos OASIS® HLB, STRATA™-X-C, OASIS® PRIME MCX e STRATA™-X, respetivamente.

Pelos resultados obtidos (Figura 12) foram analisados relacionando-os com as respetivas condições de extração.

Na condição 1 foi aplicado um acondicionamento padrão com metanol (MeOH) e água (H₂O) ultrapura, seguido por uma lavagem com ácido clorídrico (HCl) (0,1 M) tanto em H₂O quanto em MeOH, secagem a vácuo e eluição com 5% de amónia (NH₄) em MeOH. O HCl tem um papel crucial permitindo que os compostos em estudo (básicos) fiquem na sua forma ionizada e conseqüentemente retidos no sorbente, eliminando os interferentes. O desempenho desta condição foi consistentemente o melhor, especialmente recorrendo a cartuchos OASIS® PRIME MCX, que apresentou uma taxa de recuperação superior a 80%, em forma de áreas absolutas, em todos os analitos (FLX, VLX, CIT, SRT, PXT).

Na condição 2 foi utilizada uma lavagem com 5% de MeOH em H₂O, seguida de eluição com metanol puro. Os resultados obtidos são significativamente mais baixos em comparação com a condição 1, sugerindo que o processo de lavagem e eluição usados não foram tão eficazes em remover interferentes e eluir os analitos de interesse, resultando em uma menor taxa de recuperação.

Na condição 3 foi aplicada uma lavagem com HCl (0,1M) em MeOH, seguida por eluição com 5% de NH₄ em MeOH, mas com volumes reduzidos e um acondicionamento menos rigoroso, resultando num melhor desempenho do que a condição 2, mas ainda assim inferiores aos resultados observados com a condição 1. A modificação na etapa de lavagem e a redução de volumes parecem ter comprometido a eficiência da extração.

Na condição 4 utilizou-se uma lavagem com 100 nM de formiato de amónio com 2% de ácido fórmico e MeOH, seguida de eluição com 5% de NH₄ em MeOH. Embora este cartucho tenha apresentado valores de recuperação elevados, estes ainda não superam os obtidos com a condição 1, mesmo tendo-se usado o mesmo tipo de cartuchos (OASIS® PRIME MCX). Isso indica que, embora o protocolo da condição 4 seja eficiente, não atinge o mesmo nível de eficiência que a condição 1.

Na condição 5 foi empregue uma lavagem com 5% de MeOH em H₂O, seguida de eluição com 2% de ácido fórmico em MeOH. Os resultados para esta condição mostram uma recuperação relativamente elevada, mas ainda assim inferior à condição 1.

Por fim, podemos concluir que a condição 1 em cartuchos OASIS® PRIME MCX foi a que se destacou na sua eficiência de extração, apresentando uma taxa de recuperação de 80%, sugerindo que os solventes e respetivos volumes das etapas de lavagem e eluição é uma abordagem mais robusta e eficiente para a extração deste tipo de compostos.

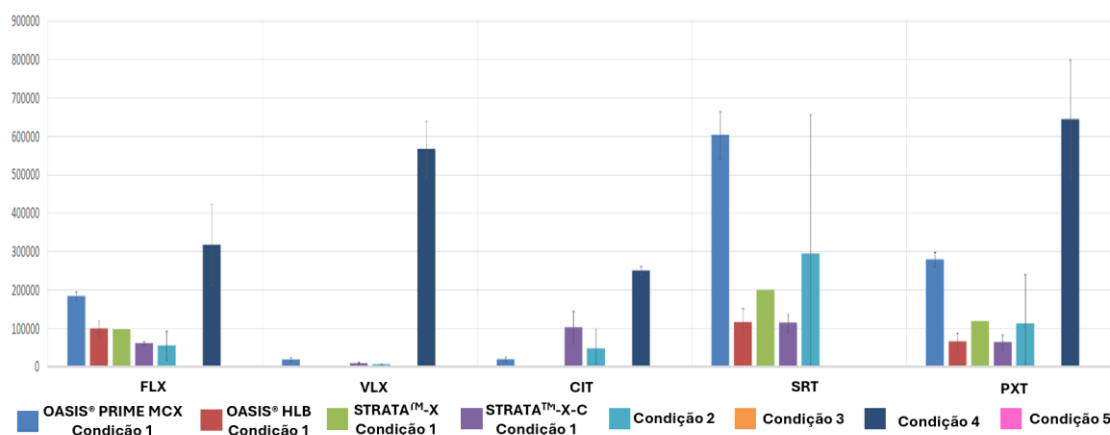


Figura 12 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a eficiência de extração, em forma de áreas absolutas, nas diferentes condições testadas e os respetivos cartuchos de SPE usados.

3. Validação do método analítico

A validação tem como objetivo demonstrar que o método está apto para determinar qualitativamente e quantitativamente os compostos em estudo em ARs, quer de afluentes como de efluentes e garantir a fiabilidade dos resultados. Deste modo, seguiram-se as *guidelines* da FDA e a metodologia foi validada através de um protocolo de cinco dias, onde se estudaram os parâmetros de seletividade, linearidade, modelo de calibração, precisão, exatidão, limites de deteção e quantificação, estabilidade e recuperação [68].

3.1. Seletividade

O método descrito apresenta ser seletivo, e pela análise de brancos (n=10) não se observaram qualquer tipo de interferentes que coeluissem com os antidepressivos em estudo nem com o padrão interno. Adicionalmente, tendo em conta os critérios da WADA [70], verificou-se que os critérios de positividade para a identificação dos compostos foram cumpridos.

3.2. Linearidade e Curva de Calibração

Para proceder a este estudo foi previamente estabelecida uma curva de calibração com calibradores compreendidos entre 0,049 e 25 ng/mL, exceto para VLX e PXT, para quais o intervalo foi de 0,195 a 25 ng/mL. Foram estabelecidos 7 calibradores equitativamente distribuídos dentro de cada um destes intervalos e o estudo da linearidade compreendeu

uma avaliação ao longo de 5 dias (Tabela 6). Para cada um dos calibradores foi calculado o *BIAS*, tendo este sido concordante com os limites estabelecidos para todas as concentrações estudadas.

Tabela 6 - Resultados do estudo de linearidade e curva de calibração.

Analito	Regressão	Linearidade (ng/mL)	Declive (m)	Ordenada na origem (b)	R ²
FLX	1/x	0,049 – 25	0,00217±0,0012	0,00053±0,0010	0,995±0,0026
VLX	1/x	0,195 – 25	0,00197±0,003	6,37E-06±0,0002	0,997±0,0015
CIT	1/x	0,049 – 25	0,00656±0,0007	0,00020±0,0003	0,997±0,0012
SRT	1/x	0,049 – 25	0,00621±0,0016	4,55E-06±0,0003	0,996±0,0031
PXT	1/x	0,195 – 25	0,01061±0,0037	-0,00299±0,0012	0,990±0,0041

Adicionalmente foram preparados os controlos de qualidade (QC`s) a quatro concentrações distintas, gama baixa: 0,049 ng/mL e 0,195 ng/mL, gama intermédia: 3,13 ng/mL e 6,25 ng/mL; e gama alta: 12,5 ng/mL. Todos os QC`s apresentaram um *BIAS* dentro dos limites estabelecidos pela FDA.

Ao analisar todos os dados descritos, é possível verificar que se trata de um método linear para todos os compostos em estudo, uma vez que a regressão linear ponderada apresenta valores de R² superiores a 0,99 e valores de *BIAS* adequados.

Relativamente aos LOQs e LODs, neste estudo foi considerado como referência para o LOQ o LLOQ. Os valores de LLOQ foram de 0,049 ng/mL para a FLX, CIT e SRT e 0,195 ng/mL para a VLX e PXT. Simultaneamente, foram avaliados os LODs (n=10), onde se obtiveram valores de 0,025 ng/mL para a FLX e SRT, 0,098 ng/mL para a PXT, 0,195 ng/mL para a VLX e 0,012 ng/mL para o CIT.

Apesar de não existirem muitos estudos publicados onde se utilize GC, pela análise da Tabela 4 pode verificar-se que Gonçalves *et al.* [85] utilizaram cartuchos OASIS® MCX para a quantificação de SRT e PXT em 500 mL de ARs, tendo obtido um LOD de 0,003 e 0,026 ng/mL e um LOQ de 0,013 e 0,104 ng/mL, respetivamente, através da análise por GC-MS. Assim, verifica-se que tanto os LODs como os LOQs obtidos no presente estudo são superiores aos alcançados por Gonçalves *et al.* [85] mas, no entanto, é de salientar que foi utilizado 5 vezes menos volume de amostra.

O presente trabalho deve ser ainda comparado com outros três trabalhos previamente publicados. O trabalho desenvolvido por Leiviskä T. *et al.* [81], onde foram usados cartuchos de extração OASIS® HLB e um volume de amostra de 50 e 100 mL, que apresentou um valor de LOQ mais elevado para o CIT (0,073-0,105 ng/mL) do que o valor do presente trabalho. Através da comparação com o trabalho realizado por Ulusoy H.I. *et al.* [82], onde é utilizada a MSPE como metodologia de extração, pode verificar-se que a extração do presente trabalho é mais eficiente garantindo valores de LODs e LOQs

inferiores. É de salientar ainda que, apesar de Huidobro-López B. *et al.* [79] apresentar valores de LOQs inferiores, os valores de LODs são muito próximos aos obtidos neste trabalho, no entanto os valores apresentados por Huidobro-López B. *et al.* [79] correspondem a valores de LOD instrumentais.

Importa ainda salientar que em muitos destes trabalhos publicados na literatura é estudado o LOQ e não o LLOQ, o que leva muitas das vezes a que sejam indicados valores de LOQs mais baixos do que aqueles que são utilizados na curva de calibração.

3.3. Precisão e Exatidão

A precisão foi um parâmetro avaliado através da precisão intradia, intermédia e interdia. A precisão intradia foi estudada através de amostras fortificadas com concentrações baixas, intermédias e altas. As amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia (n=5), estando os resultados obtidos representados na tabela 7.

Tabela 7 - Precisão intradia e exatidão para a todos os compostos em estudo.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
FLX	0,049	4,70	9,45
	1,56	14,55	6,97
	5	12,31	12,61
	12,5	11,48	3,47
VLX	0,195	12,36	-4,52
	1,56	13,26	-7,10
	5	9,76	2,41
	12,5	2,28	0,59
CIT	0,049	13,85	-5,43
	1,56	11,31	-4,59
	5	6,22	1,44
	12,5	6,61	2,18
SRT	0,049	6,94	19,28
	1,56	13,46	-5,20
	5	15,89	14,41
	12,5	11,04	6,59
PXT	0,195	3,92	-7,73
	1,56	15,11	-7,58
	5	10,27	-16,34
	12,5	12,43	-3,69

Legenda: C.V. – coeficiente de variação

A análise dos resultados obtidos para a precisão intradia permite concluir que no geral os valores se encontram dentro dos limites estabelecidos pelas *guidelines*, tendo-se verificado que os valores de C.V. e *BIAS* estão abaixo dos 20% para a concentração mais baixa e abaixo de 15% para as restantes concentrações.

As precisões interdia e intermédia foram avaliadas através de amostras fortificadas a concentrações baixas, intermédias e altas, em 5 dias diferentes. Para tal, foram utilizadas 5

concentrações abrangidas pela curva de calibração e 4 concentrações correspondentes aos QC's. Os resultados obtidos encontram-se descritos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Precisão interdia e exatidão para a todos os compostos em estudo.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
FLX	0,049	12,11	3,02
	0,195	12,80	-4,95
	0,78	13,01	-7,25
	12,5	12,73	-6,21
	25	3,08	8,10
VLX	0,195	8,46	-5,80
	0,78	6,01	-8,02
	12,5	6,45	-4,15
	25	2,91	-5,63
CIT	0,049	19,45	-7,05
	0,195	11,26	-11,21
	0,78	2,41	-6,64
	12,5	5,61	0,18
	25	3,49	-2,31
SRT	0,049	10,58	-5,67
	0,195	12,37	-1,68
	0,78	8,46	-7,93
	12,5	3,65	-7,37
	25	4,51	-6,76
PXT	0,195	9,66	-5,36
	0,78	10,04	-9,18
	12,5	7,13	-0,32
	25	5,05	-7,94

Legenda: C.V. – coeficiente de variação

Tabela 9 - Precisão intermédia e exatidão para todos os compostos em estudo.

Analito	Concentração (ng/mL)	C.V. (%)	BIAS (%)
FLX	0,049	19,27	5,02
	0,195	8,86	-3,51
	0,78	9,66	11,68
	3,13	7,52	-10,30
	12,5	8,89	-13,53
VLX	0,195	12,61	5,04
	0,78	7,94	14,30
	3,13	9,32	3,13
	12,5	6,64	-4,14
CIT	0,049	9,90	-11,76
	0,195	5,63	3,98
	0,78	5,22	5,76
	3,13	6,71	4,88
	12,5	1,24	-5,53
SRT	0,049	8,49	18,77
	0,195	0,35	0,25
	0,78	3,50	-4,37
	3,13	14,91	11,58
	12,5	13,10	-2,42
PXT	0,195	9,33	7,06
	0,78	0,15	-11,54
	3,13	3,28	12,18
	12,5	13,15	10,94

Legenda: C.V. – coeficiente de variação

Os resultados obtidos para as precisões interdia e intermédia permitem concluir que no geral todos os resultados se encontram dentro dos intervalos permitidos para C.V. e para o *BIAS*, sendo que o valor correspondente ao LLOQ está abaixo dos 20% e as restantes concentrações abaixo de 15%.

3.4. Estabilidade

O estudo da estabilidade serve para verificar se os compostos poderão sofrer alterações, como a degradação ao longo do tempo, alterações funcionais e alterações físicas, tornando-se crucial que sejam testadas as condições que podem acontecer no dia-a-dia entre a preparação e a análise de uma amostra. No presente trabalho foi estudada a estabilidade de amostras processadas.

A estabilidade foi avaliada para as concentrações de 0,049, 0,195, 3,13 e 12,5 ng/mL. Após a extração das amostras, os extratos foram analisados e posteriormente mantidos a uma temperatura de 4 °C durante 24 horas, após o qual voltaram a ser reinjetadas. Os resultados foram comparados entre si.

Os valores obtidos (Tabela 10) demonstram que existem alguns compostos que ultrapassam o limite de 15% de *BIAS*, o que traduz que não são estáveis nas respetivas concentrações.

Tabela 10 - Resultados do estudo da estabilidade de amostras processadas (n=3).

Composto	Concentração teórica (ng/mL)	C.V. (%)	<i>BIAS</i>
FLX	0,049	5,82	5,02
	0,195	4,99	-3,51
	0,78	5,94	11,68
	3,130	14,14	-10,30
	12,50	2,24	-13,53
VLX	0,195	4,36	5,04
	0,78	8,22	14,30
	3,130	5,28	3,13
	12,50	11,80	-4,14
CIT	0,049	15,09	-11,76
	0,195	3,68	-0,31
	0,78	0,15	5,76
	3,130	4,34	4,88
	12,50	5,65	-5,53
SRT	0,049	10,25	18,77
	0,195	2,14	9,96
	0,78	2,88	-4,37
	3,130	12,69	11,58
	12,50	4,73	-2,42
PXT	0,195	24,89	-47,86
	0,78	20,49	-18,80
	3,130	2,14	12,18
	12,50	12,69	10,94

Legenda: C.V. – coeficiente de variação

A PXT demonstra não ser estável a concentrações baixas pois o seu valor de *BIAS* excedeu o limite de $\pm 15\%$. Os restantes compostos demonstraram ser estáveis tanto a concentrações baixas, intermédias como altas, não tendo ultrapassado o limite de *BIAS* indicado pelas guidelines.

3.5. Recuperações

Com a finalidade de calcular as recuperações do método de extração, foram preparadas três amostras fortificadas em triplicado às diferentes concentrações da curva de calibração, por forma a avaliar este parâmetro tanto a concentrações baixas como altas (Tabela 11).

Tabela 11 - Recuperação (%) para cada composto em estudo (n=3).

Concentração Teórica (ng/mL)	Recuperação média FLX (%)*	Recuperação média VLX (%)*	Recuperação média CIT (%)*	Recuperação média SRT (%)*	Recuperação média PXT (%)*
0,19	17,91 \pm 0,46	7,84 \pm 1,27	81,14 \pm 10,40	51,34 \pm 1,03	57,93 \pm 8,16
3,13	13,10 \pm 1,70	11,78 \pm 1,10	67,91 \pm 10,38	78,24 \pm 4,54	47,60 \pm 6,12
25	17,17 \pm 1,93	6,91 \pm 0,17	75,51 \pm 2,92	65,70 \pm 6,39	59,95 \pm 7,69

*-valores expressos como recuperação média \pm desvio padrão

Ao comparar as recuperações obtidas com outros artigos, foi possível verificar que os resultados obtidos no presente trabalho são relativamente inferiores a alguns dos trabalhos já publicados. No entanto, no trabalho de *Asimakopoulos et al.* [89], onde são utilizados vários cartuchos de SPE, também foram obtidas recuperações baixas para antidepressivos. *Baker e Kasprzyk Hordern* [107] afirmam que atribuir estas recuperações baixas à utilização de sorbentes de SPE inadequados é enganador, pois pode dever-se a múltiplos fatores (contaminação, degradação da amostra ou técnicas inconsistentes de processamento de amostras). *Asimakopoulos et al.* [89] apontaram que os compostos químicos podem adquirir comportamentos únicos durante o processo de extração. *Borova et al.* [108] referiram que pressões de vácuo elevadas (superior a 10 psi) podem também afetar a recuperação, levando a valores de recuperação baixos para vários compostos químicos. Salienta-se ainda que em alguns destes trabalhos é calculada a recuperação relativa e não a recuperação absoluta (a realizada no presente estudo).

3.6. Aplicação do método a amostras reais

Por fim, de modo a completar a validação o método analítico desenvolvido foi aplicado a amostras reais para deteção e quantificação dos analitos de interesse, sendo esta uma parte fundamental de todo o processo.

Assim, o método analítico descrito foi aplicado a 56 amostras reais de águas residuais provenientes de diversas ETARs de Portugal, de forma a comprovar que é apto ao seu objetivo. As amostras foram recolhidas através de um amostrador automático, efetuando

recolha de água ao longo de 24 horas (compósito de 24 horas), de afluentes e efluentes. Para proceder à identificação dos compostos foram utilizados critérios qualitativos, tal como referido anteriormente. Como modelo de exemplo apresenta-se na Figura 13 um cromatograma relativo a uma das amostras analisadas.

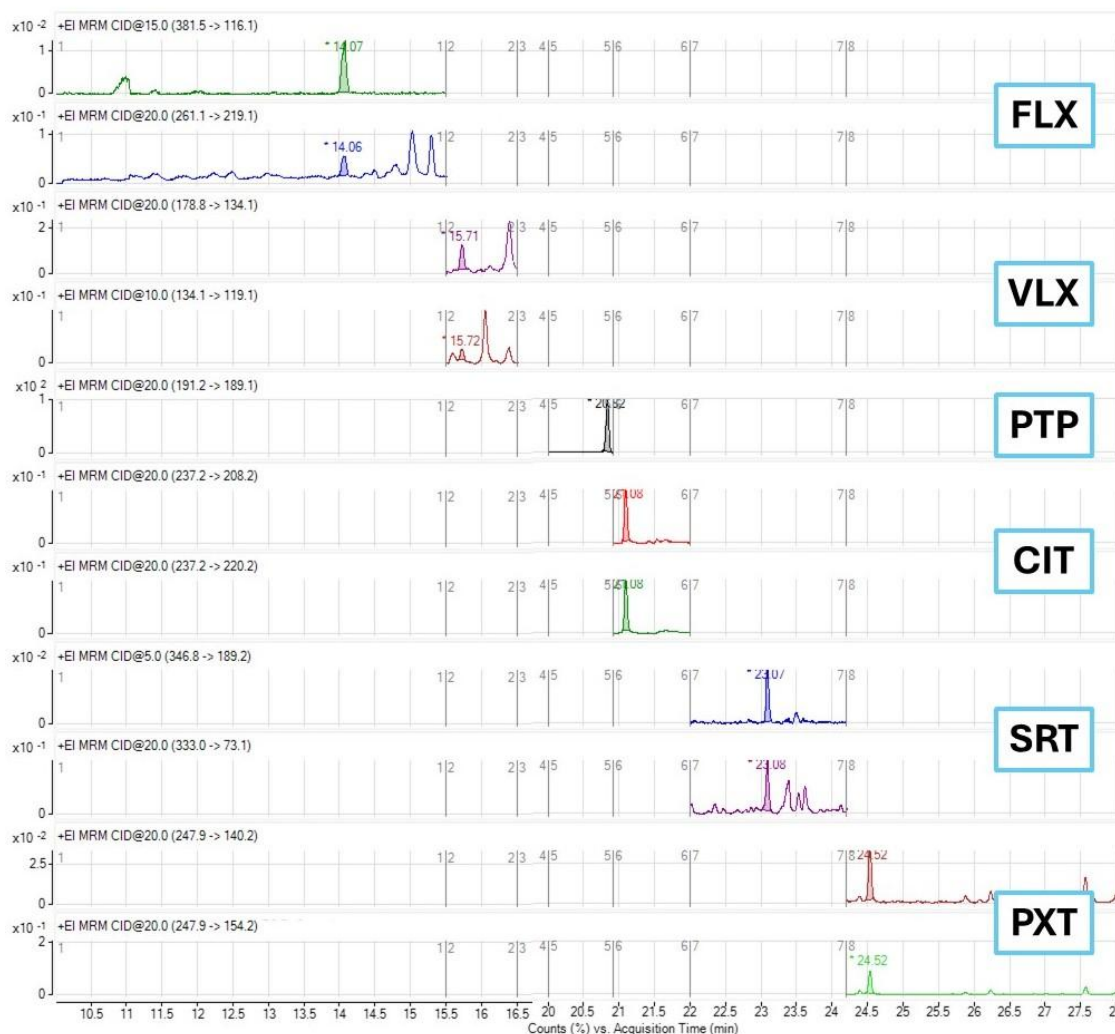


Figura 13 - Cromatograma em modo MRM de uma amostra real, onde estão representados todos os compostos em estudo e o padrão interno a 50 µg/mL.

Os resultados obtidos dos compostos detetados nas amostras analisadas estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados para as 50 amostras de ARs reais e as respectivas quantificações dos compostos em estudos.

Amostra	Tipo de amostra	FLX (ng/mL)	VLX (ng/mL)	CIT (ng/mL)	SRT (ng/mL)	PXT (ng/mL)
1	Afluente	-	-	0,21	-	0,97
2	Afluente	0,26	-	2,02	0,68	0,33
3	Afluente	-	7,46	3,25	3,68	-
4	Afluente	3,40	-	0,07	0,99	0,42
5	Afluente	-	-	-	-	-
6	Efluente	-	-	-	-	-
7	Afluente	-	-	-	-	-
8	Efluente	-	-	-	-	-
9	Afluente	0,09	0,53	-	0,26	-
10	Efluente	-	0,21	0,16	0,24	-
11	Efluente	-	-	0,19	0,16	-
12	Afluente	-	0,25	0,29	-	0,25
13	Efluente	-	-	0,20	-	-
14	Afluente	-	-	0,14	-	-
15	Efluente	0,13	-	0,22	0,14	-
16	Afluente	-	0,31	0,72	0,24	-
17	Efluente	-	-	0,09	-	-
18	Afluente	-	-	0,07	0,14	0,4
19	Efluente	-	-	0,10	-	-
20	Afluente	-	-	<LLOQ	-	-
21	Efluente	-	-	<LLOQ	-	-
22	Afluente	-	-	0,08	-	-
23	Efluente	-	-	0,09	-	-
24	Afluente	-	1,11	0,21	-	-
25	Efluente	-	0,53	-	-	-
26	Afluente	-	-	-	-	<LLOQ
27	Efluente	0,09	-	0,07	0,43	-
28	Afluente	-	-	0,09	0,17	-
29	Efluente	-	-	-	0,07	-
30	Afluente	0,08	-	0,13	0,17	-
31	Efluente	-	-	-	0,07	-
32	Afluente	-	0,28	0,08	-	-
33	Afluente	-	-	-	-	-
34	Efluente	-	-	-	0,20	-
35	Afluente	-	-	-	-	-
36	Efluente	-	-	-	-	-
37	Afluente	-	-	-	-	-
38	Efluente	-	-	-	-	-
39	Afluente	-	-	-	-	-
40	Efluente	-	-	-	-	-
41	Afluente	-	-	1,24	2,17	0,51
42	Efluente	-	-	0,97	0,35	0,45
43	Afluente	1,03	1,15	1,39	3,80	0,57
44	Efluente	-	-	1,89	0,88	-
45	Afluente	-	1,15	3,44	-	-
46	Efluente	0,81	-	1,09	-	-
47	Afluente	-	-	1,09	1,17	0,47
48	Efluente	-	1,33	1,46	1,45	0,52
49	Afluente	-	-	2,05	2,16	0,56
50	Efluente	-	1,57	1,38	-	0,47

De forma a comparar os resultados obtidos, foram também analisados os dados fornecidos pela INFARMED, onde se verificou que entre 2017 e 2023 houve um aumento no consumo de FLX, PXT, SRT e VLX em 14%, 4%, 53% e 45%, respetivamente, e um decréscimo de 6% no consumo de CIT.

No presente estudo o composto mais detetado nas amostras analisadas foi o CIT, seguindo-se a SRT, a VLX, a FLX e a PXT, e uma vez que os valores obtidos não correspondem aos dados referidos anteriormente, pois o composto mais detetado corresponde ao menos consumido, foram analisados os artigos da Tabela 4 com o intuito de perceber quais os compostos mais detetados pelos mesmos, tendo-se chegado à conclusão de que o composto mais detetado foi a VLX seguida do CIT, FLX, SRT e PXT, com concentrações entre os 0,042-1 ng/mL, 0,052-0,364 ng/mL, 0,003-0,381 ng/mL, 0,006 ng/mL e 0,002-0,037 ng/mL, respetivamente.

Adicionalmente, os resultados obtidos foram analisados de forma a verificar quais os compostos mais detetados tanto nos afluentes como nos efluentes, demonstrando que o CIT foi o composto mais detetado nos dois tipos de amostra.

Para melhor compreensão sobre o facto de o medicamento menos consumido ser o mais detetado, devem ser tidos em conta vários fatores como a persistência ambiental, biodegradabilidade, solubilidade e a bioacumulação em meios aquáticos, pois estes vão influenciar a deteção dos mesmos.

No caso da FLX e da SRT, estas apresentam alta persistência, com tempos de meia-vida ambientais de até 32 e 28 dias, respetivamente, devido à sua baixa biodegradabilidade, sendo mais difíceis de os erradicar das ETARs. No entanto, a solubilidade também desempenha um papel crítico, e enquanto a FLX tem uma solubilidade moderada, a VLX e o CIT são mais solúveis, facilitando a sua progressão no ambiente aquático e deste modo torna-os mais frequentemente detetados, mesmo apresentando menor persistência.

A PXT, por outro lado, apresenta uma persistência moderada e uma menor solubilidade, o que limita a sua presença na água, favorecendo a sua adsorção em partículas e sedimentos. No caso do CIT, que tem uma alta solubilidade, mesmo sendo menos consumido, é frequentemente o mais detetado devido à sua facilidade de dispersão na água e resistência à degradação [109,110].

Assim, pode concluir-se que não se pode apenas ter em conta o consumo do medicamento, mas também todos os outros fatores referidos anteriormente.

Por fim, realçar que a deteção positiva deste tipo de medicamentos nas águas vem demonstrar a importância da monitorização contínua destes medicamentos em ARs e serve como indicativo da necessidade de melhorar a eficiência de tratamento das estações de tratamento das ARs, bem como promover o uso consciente e o descarte adequado de medicamentos para mitigar os seus impactos ambientais. Apesar dos valores obtidos

parecerem muito baixos, estes merecem especial atenção, pois a exposição crónica a estes medicamentos mesmo a estas concentrações pode ser mais grave do que exposições agudas, podendo ter efeitos subletais. Brooks et al. [111] referem que a FLX em organismos aquáticos, como alguns peixes, provoca alterações comportamentais e fisiológicas, assim como mudanças na reprodução e resposta ao stress.

Capítulo 5| Conclusão e Perspetivas Futuras

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de um método analítico para a determinação de antidepressivos, mais concretamente CIT, FLX, SRT, PXT e VLX, em ARs, recorrendo à SPE e posterior análise por GC-MS/MS.

O método demonstrou ser seletivo, preciso, exato e linear, dentro dos intervalos estudados, segundo as diretrizes de validação da FDA e os critérios de qualificação da WADA para métodos analíticos.

Adicionalmente, o método mostrou ser linear entre 0,049 – 25 ng/mL para o CIT, FLX e SRT e entre 0,195 – 25 ng/mL para a PXT e VLX, com valores de R^2 superiores a 0,99, limites de deteção de 0,025 ng/mL para a FLX e SRT, 0,098 ng/mL para a PXT, 0,195 ng/mL para a VLX e 0,012 ng/mL para o CIT, apresentando taxas de recuperação entre 7,28 e 81,14%. Em relação à estabilidade das amostras processadas, de uma forma geral os compostos demonstraram ser estáveis, com exceção da PXT, que apresenta valores de *BIAS* superiores ao estabelecido (15%). O volume de amostra definido (100 mL) foi satisfatório, tendo possibilitado a realização da análise com sensibilidade adequada.

Outro aspeto importante de realçar é tratar-se do primeiro estudo que permite detetar ISRS e ISRNS em simultâneo, em ARs através de SPE com cartuchos OASIS® PRIME MCX e análise por GC-MS/MS. Adicionalmente, e com base na literatura consultada, podemos indicar que é o estudo mais representativo sobre a análise de antidepressivos em ARs, já que as amostras procedem de diferentes pontos do país.

Assim, e considerando todos estes fatores, a metodologia mostrou ser inovadora, apropriada e com robustez necessária, dando origem a um método com aplicabilidade no campo da toxicologia ambiental para a monitorização indireta destas subclasses de psicofármacos, assim como para alertar para possíveis consequências negativas nos ecossistemas aquáticos e para a saúde pública em geral.

Futuramente, o presente método poderá ainda contribuir para a deteção destes compostos em outros tipos de águas (superficiais, subterrâneas ou até mesmo da torneira) de forma a avaliar não só o consumo, mas também realizar outros tipos de estudos como a avaliação alimentar de culturas agrícolas próximas de águas contaminadas, assim como a flora e fauna, para além disso verificar quais as consequências tanto para os ecossistemas aquáticos como para a saúde pública.

Capítulo 6 | Lista de comunicações apresentadas

O trabalho de investigação desenvolvido nesta dissertação contribuiu para a divulgação dos resultados alcançados e para o enriquecimento do debate académico na área, tendo sido apresentado em quatro comunicações científicas, em formato de póster, e uma comunicação científica aceite para apresentação no mesmo formato.

1:

Título: Detecção de antidepressivos em águas residuais: comparação de técnicas de extração

Autores: Gonçalo Catarro; Bruno Pires; Ana Simão; Tiago Rosado; Sofia Soares; André RTS Araújo; Eugenia Gallardo

Congresso: 21º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

Data: 12-14 de outubro de 2023

2:

Título: The potencial of waters analysis in toxicology: A review of publications between 2019-2023

Autores: Gonçalo Catarro; Sofia Soares; Tiago Rosado; André RTS Araújo; Mário Barroso; Eugenia Gallardo

Congresso: X Congresso Iberoamericano de Ciências Farmacêuticas

Data: 26-28 de outubro de 2023

3:

Título: Validation of an analytical method for the determination of antidepressants in wastewaters using SPE and GC-MS/MS

Autores: Gonçalo Catarro; Sofia Soares; Tiago Rosado; André RTS Araujo; Mário Barroso; Eugenio Gallardo

Congresso: Analítica 2024 | 11th Meeting of the Analytical Chemistry Division

Data: 25-26 de março de 2024

4:

Título: Analytical validation of the antidepressants determination in wastewater using SPE and GC-MS/MS

Autores: Gonçalo Catarro; Ana Aysa Simão; Sofia Soares; Tiago Rosado; André RTS Araújo; Eugenia Gallardo

Congresso: The annual meeting of The International Association of Forensic Toxicologists 2024

Data: 2-6 de setembro de 2024

5:

Título: Determination of antidepressant drugs in Portuguese wastewater

Autores: André RTS Araújo; Gonçalo Catarro; Sofia Soares; Tiago Rosado; Mário Barroso; Eugenia Gallardo

Congresso: Winter School on contaminants of Emerging Concern (CECs) and Disinfection By-Products (DBPs): Occurrence, Impact and Elimination

Data: 25-26 de novembro de 2024

Capítulo 7 | Referências

1. Mental Health Available online: https://www.who.int/health-topics/mental-health#tab=tab_1 (accessed on 11 February 2024).
2. World Health Organization *World Mental Health Report: Transforming Mental Health for All.*; Geneva, 2022.
3. Sociedade Portuguesa de Psiquiatria e Saúde Mental Perturbação Mental Em Números Available online: <https://www.sppsm.org/informemente/perturbacao-mental-em-numeros/> (accessed on 20 July 2024).
4. American Psychiatric Association *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; 5th ed.; Washington,DC, 2022.
5. Depressão Available online: <https://www.sns24.gov.pt/tema/saude-mental/depressao/> (accessed on 11 February 2024).
6. COVID-19 Pandemic Triggers 25% Increase in Prevalence of Anxiety and Depression Worldwide Available online: <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide> (accessed on 11 February 2024).
7. Videbech, P.; Ravnkilde, B. Hippocampal Volume and Depression: A Meta-Analysis of MRI Studies. *The American Journal of Psychiatry* 2004, *161*, 1957–1966, doi:10.1176/appi.ajp.161.11.1957.
8. Gold, P.W.; Machado-Vieira, R.; Pavlatou, M.G. Clinical and Biochemical Manifestations of Depression: Relation to the Neurobiology of Stress. *Neural Plast* 2015, *2015*, doi:10.1155/2015/581976.
9. Palazidou, E. The Neurobiology of Depression. *Br Med Bull* 2012, *101*, 127–145, doi:10.1093/bmb/lds004.
10. Cryan, J.F.; Leonard, B.E. 5-HT(1A) and Beyond: The Role of Serotonin and Its Receptors in Depression and the Antidepressant Response. *Hum Psychopharmacol* 2000, *15*, 113–135, doi:10.1002/(SICI)1099-1077(200003)15:2<113::AID-HUP150>3.0.CO;2-W.
11. Wang, H.; Yang, Y.; Pei, G.; Wang, Z.; Chen, N. Neurotrophic Basis to the Pathogenesis of Depression and Phytotherapy. *Front Pharmacol* 2023, *14*, doi:10.3389/fphar.2023.1182666.
12. Dantzer, R.; O'Connor, J.C.; Freund, G.G.; Johnson, R.W.; Kelley, K.W. From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain. *Nat Rev Neurosci* 2008, *9*, 46–56, doi:10.1038/nrn2297.

13. Taylor, C.; Fricker, A.D.; Devi, L.A.; Gomes, I. Mechanisms of Action of Antidepressants: From Neurotransmitter Systems to Signaling Pathways. *Cell Signal* 2005, *17*, 549–557.
14. Pariante, C.M.; Lightman, S.L. The HPA Axis in Major Depression: Classical Theories and New Developments. *Trends Neurosci* 2008, *31*, 464–468, doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006.
15. Soares, S.; Barroso, M.; Gallardo, E. A Review of Current Bioanalytical Approaches in Sample Pretreatment Techniques for the Determination of Antidepressants in Biological Specimens. *Rev Anal Chem* 2020, *40*, 12–32.
16. Harmer, C.J.; Goodwin, G.M.; Cowen, P.J. Why Do Antidepressants Take So Long to Work? A Cognitive Neuropsychological Model of Antidepressant Drug Action. *The British Journal of Psychiatry* 2009, *195*, 102–108, doi:10.1192/bjp.bp.108.051193.
17. Horst, W.D.; Preskorn, S.H. *Mechanisms of Action and Clinical Characteristics of Three Atypical Antidepressants: Venlafaxine, Nefazodone, Bupropion*; 1998; Vol. 51.
18. Lochmann, D.; Richardson, T. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer New York LLC, 2019; Vol. 250, pp. 135–144.
19. Catterson, M.L.; Preskorn, S.H. Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Clinical Relevance. *Pharmacol Toxicol* 1996, *78*, 203–208.
20. Preskorn, S.H. Dose-Effect and Concentration-Effect Relationships with New Antidepressants. *Psychopharmacol Ser* 1993, *10*, 174–189, doi:10.1007/978-3-642-78010-3_17/COVER.
21. Leonard, B.E. Principles and Practice of Psychopharmacotherapy. 3rd Edition. P. G. Janicak, J. M. Davis, S. H. Preskorn and F. J. Ayd. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2001. Pages: 700. ISBN: 0-7817-2794-4. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 2003, *18*, 317–318, doi:10.1002/HUP.486.
22. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions Available online: <https://chemicalize.com/welcome> (accessed on 26 July 2024).
23. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*.
24. Stahl, S.M. *Mechanism of Action of Serotonin Selective Reuptake Inhibitors Serotonin Receptors and Pathways Mediate Therapeutic Effects and Side Effects*; 1998; Vol. 51.
25. Nutt, D.J.; Forshall, S.; Bell, C.; Rich, A.; Sandford, J.; Nash, J.; Argyropoulos, S. *Mechanisms of Action of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in the Treatment of Psychiatric Disorders*; 1999; Vol. 9.

26. A-Base-Fisiopatologică-Da-Farmacologia-Golan-3c2aa-Ed.
27. Hiemke, C.; Härtter, S. *Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*; 2000; Vol. 85.
28. Stahl, S.M.; Grady, M.M.; Moret, C.; Briley, M. *SNRIs: The Pharmacology, Clinical Efficacy, and Tolerability in Comparison with Other Classes of Antidepressants*; 2005; Vol. 10.
29. PSM Volume 39 Issue 6 Cover and Back Matter. *Psychol Med* 2009, 39, b1–b4, doi:10.1017/S0033291709006096.
30. Hiemke, C.; Baumann, P.; Bergemann, N.; Conca, A.; Dietmaier, O.; Egberts, K.; Fric, M.; Gerlach, M.; Greiner, C.; Gründer, G.; et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011, 44, 195–235.
31. Westanmo, A.D.; Gayken, J.; Haight, R. Duloxetine: A Balanced and Selective Norepinephrine- and Serotonin-Reuptake Inhibitor. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2005, 62, 2481–2490, doi:10.2146/ajhp050006.
32. Blier, P.; El-Mansari, M. Serotonin and beyond: Therapeutics for Major Depression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2013, 368, doi:10.1098/rstb.2012.0536.
33. Zakaraya, Z.; Abu Assab, M.; Tamimi, L.N.; Karamah, N.; Hailat, M.; Al-Omari, L.; Abu Dayyih, W.; Alasasfeh, O.; Awad, M.; Awad, R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: A Comprehensive Analysis of the Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Psychiatric Drugs. *Pharmaceuticals* 2024, doi:10.3390/ph17030280.
34. Shelton, R.C. Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitors: Similarities and Differences. *Prim psychiatry* 2009, 16, 25–35.
35. Wellington, K.; Perry, C.M. Venlafaxine Extended-Release A Review of Its Use in the Management of Major Depression. *CNS Drugs* 2021, 15, 643–669, doi:10.2165/00023210-200115080-00007.
36. Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; David Stensel, H. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*; MCGRAW-HILL EDUCATION - EUROPE, Ed.; 2013; ISBN 9780073401188.
37. Fent, K.; Weston, A.A.; Caminada, D. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006, 76, 122–159, doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009.
38. Zarei, S.; Salimi, Y.; Repo, E.; Daglioglu, N.; Safaei, Z.; Güzel, E.; Asadi, A. A Global Systematic Review and Meta-Analysis on Illicit Drug Consumption Rate through Wastewater-Based Epidemiology. *Environmental Science and Pollution Research* 2020, 27, doi:10.1007/s11356-020-09818-6.

39. Leal, A.; Gallardo, E.; Pereira, A. *Fármacos Em Águas Residuais: Análise, Remoção e Biorecuperação Experiência Profissionalizante Na Vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação, Universidade da Beira Interior: Covilhã, 2020.*
40. Barroso, M.; Moreno, I.; Da Fonseca, B.; Queiroz, J.A.; Gallardo, E. Role of Microextraction Sampling Procedures in Forensic Toxicology. *Bioanalysis* 2012, 4, 1805–1826, doi:10.4155/bio.12.139.
41. Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. Métodos de Extração e/Ou Concentração de Compostos Encontrados Em Fluidos Biológicos Para Posterior Determinação Cromatográfica. *Quim Nova* 2001, 24, 68–76.
42. Altun, Z.; Abdel-Rehim, M.; Blomberg, L.G. New Trends in Sample Preparation: On-Line Microextraction in Packed Syringe (MEPS) for LC and GC Applications: Part III: Determination and Validation of Local Anaesthetics in Human Plasma Samples Using a Cation-Exchange Sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. *Journal of Chromatography B* 2004, 813, 129–135, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.09.020.
43. Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments. *Chromatographia* 1995, 40, 474–483.
44. Figueiredo, A.L. ANÁLISE DE ÁGUAS RESIDUAIS NA MONITORIZAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONSUMO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz: Lisboa, 2014.
45. Ötles, S.; Kartal, C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2016, 15, 5–15, doi: 10.17306/J.AFS.2016.1.1.
46. Moyo, B.; Tavengwa, N.T. Critical Review of Solid Phase Extraction for Multiresidue Clean-up and Pre-Concentration of Antibiotics from Livestock and Poultry Manure. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2022, 39, 229–241.
47. Waters Oasis Sample Extraction SPE Products | Waters Available online: https://www.waters.com/waters/en_US/OasisSample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=- (accessed on 7 July 2024).
48. SUPELCO Guide to Solid Phase Extraction Available online: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/572/614/4538.pdf> (accessed on 8 July 2024).
49. Telepchak, M.J.; August, T.F.; Chaney, G. *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, 2004.
50. Filip, M.; Frankowska, M.; Zaniewska, M.; Go³da, A.; Przegaliński, E. *The Serotonergic System and Its Role in Cocaine Addiction*; 2005.

51. Richards, J.R.; Hollander, J.E.; Ramoska, E.A.; Fareed, F.N.; Sand, I.C.; Izquierdo Gómez, M.M.; Lange, R.A. β -Blockers, Cocaine, and the Unopposed α -Stimulation Phenomenon. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017, 22, 239–249.
52. Coskun, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *North Clin Istanb* 2016, doi:10.14744/nci.2016.32757.
53. Sebben, VC. Análise de Efedrinas e Anfetamina Em Urina Empregando SPE e SPME Por GC/EM/EM. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Rio Grande do Sul, 2007.
54. Karasek, F.W.; Clement, R.E. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*; Elsevier, Ed.; Países Baixos, 2012; ISBN 0080929060, 9780080929064.
55. What Is Gas Chromatography?: Shimadzu Scientific Instruments Available online: <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/index.html#top> (accessed on 24 May 2024).
56. Simão, A.; Antunes, M.; Gonçalves, J.; Soares, S.; Castro, T.; Rosado, T.; Caramelo, D.; Barroso, M.; Araújo, A.; Rodilla, J.; et al. THE ROLE OF GAS CHROMATOGRAPHY IN CLINICAL AND FORENSIC TOXICOLOGY. In *Gas Chromatography: History, Methods and Applications*; Henrichon, P., Ed.; Nova Science Publishers, 2020 ISBN 9781536173505.
57. Wu, S.; Lyu, G.; Lou, R. Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. In *Applications of Gas Chromatography*; Davarnejad, R., Jafarkhani, M., Eds.; InTech, 2012.
58. Eiceman, G.; Meyers, R. *Instrumentation of Gas Chromatography*; John Wiley & Sons, L., Ed.; 1st ed.; Encyclopedia of Analytical Chemistry: New Jersey.
59. Maurer, H.H. *Role of Gas Chromatography-Mass Spectrometry With Negative Ion Chemical Ionization in Clinical and Forensic Toxicology, Doping Control, and Biomonitoring*; 2002;
60. Agilent Technologies, I. Trace-Level Sensitivity The New Agilent 7000A Triple Quadrupole GC/MS Available online: <https://www.bercaniaga.com/Final7000AGC.pdf> (accessed on 20 May 2024).
61. Yost, R.A.; Fetterolf, D.D. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) Instrumentation. *Mass Spectrom Rev* 1983, 2, 1–45, doi:10.1002/mas.1280020102.
62. (26) Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS System - YouTube Available online: <https://www.youtube.com/watch?v=OVXCcBwoiCQ> (accessed on 24 May 2024).
63. Demoliner, A.; Caldas, S.S.; Costa, F.P.; Gonçalves, F.F.; Clementin, R.M.; Milani, M.R.; Primel, E.G. Development and Validation of a Method Using Spe and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Classes of Pesticides and Metabolites in

- Water Samples. *J Braz Chem Soc* 2010, 21, 1424–1433, doi:10.1590/S0103-50532010000800003.
64. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*; Simpson, C., Kiselica, S., Schwartz, R.B., Eds.; 9th ed.; Brooks/Cole, Cengage Learning: Belmont, 2014.
 65. Trass, M. The Effect of Temperature on Compound Elution Order in Gas Chromatography. 2009.
 66. ISO/IEC 17025:2017(En), General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en> (accessed on 8 July 2024).
 67. Maestroni, B.; Abu Alnaser, A.; Ghanem, I.; Islam, M.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Kelly, S.; Cannavan, A. Validation of an Analytical Method for the Determination of Pesticide Residues in Vine Leaves by GC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2018, 66, 6421–6430, doi: 10.1021/acs.jafc.8b00453.
 68. *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*; 2015.
 69. Swartz, M.; Krull, I. *Handbook of Analytical Validation*; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, 2012; ISBN 978-0-8247-0689-0.
 70. World Anti-Doping Agency *Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes*; 2021.
 71. Fda; Cder *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics*; 2018.
 72. De Farias, S.L.; Da Costa, L.G.; Calili, R.F.; Rios, R.M.; De Oliveira, E.C. Metrological Evaluation of the Analytical Curve for Determination of Very Low Concentrations of Sulphur Content in Diesel Oil S-10. *Quim Nova* 2015, 38, 852–858, doi:10.5935/0100-4042.20150071.
 73. Shrivastava, A.; Gupta, V. Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods. *Chronicles of Young Scientists* 2011, 2, 21, doi:10.4103/2229-5186.79345.
 74. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol* 2013, 37, 452–474, doi:10.1093/jat/bkt054.
 75. Scopus - Document Search | Signed In Available online: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic#basic> (accessed on 22 July 2024).

76. Bozyiğit, G.D.; Zaman, B.T.; Özdemir, O.K.; Kılınc, Y.; Chormey, D.S.; Bakırdere, S.; Engin, G.O. Removal of Two Antidepressant Active Pharmaceutical Ingredients from Hospital Wastewater by Polystyrene-Coated Magnetite Nanoparticles–Assisted Batch Adsorption Process. *Environ Monit Assess* 2024, 196, doi:10.1007/s10661-023-12231-4.
77. Zhong, J.; Liu, X.; Chen, L.; Li, K.; Hu, Q.; Wu, K.; Zhou, J.; Shi, Y.; Fan, H. Simultaneous Separation and Determination of Several Chiral Antidepressants and Their Enantiomers in Wastewater by Online Heart-Cutting Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Ecotoxicol Environ Saf* 2023, 263, doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115302.
78. Restrepo-Vieira, L.H.; Buseti, F.; Linge, K.L.; Joll, C.A. Development and Validation of a Direct Injection Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Illicit Drugs and Psychopharmaceuticals in Wastewater. *J Chromatogr A* 2022, 1685, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463562.
79. Huidobro-López, B.; López-Heras, I.; Alonso-Alonso, C.; Martínez-Hernández, V.; Nozal, L.; de Bustamante, I. Analytical Method to Monitor Contaminants of Emerging Concern in Water and Soil Samples from a Non-Conventional Wastewater Treatment System. *J Chromatogr A* 2022, 1671, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463006.
80. Bozyiğit, G.D.; Ayyıldız, M.F.; Chormey, D.S.; Engin, G.O.; Bakırdere, S. Trace Level Determination of Eleven Nervous System–Active Pharmaceutical Ingredients by Switchable Solvent-Based Liquid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry with Matrix Matching Calibration Strategy. *Environ Monit Assess* 2022, 194, doi:10.1007/s10661-021-09708-5.
81. Leiviskä, T.; Risteelä, S. Analysis of Pharmaceuticals, Hormones and Bacterial Communities in a Municipal Wastewater Treatment Plant – Comparison of Parallel Full-Scale Membrane Bioreactor and Activated Sludge Systems. *Environmental Pollution* 2022, 292, doi: 10.1016/j.envpol.2021.118433.
82. Sarıkaya, M.; Ulusoy, H.I.; Morgul, U.; Ulusoy, S.; Tartaglia, A.; Yılmaz, E.; Soylak, M.; Locatelli, M.; Kabir, A. Sensitive Determination of Fluoxetine and Citalopram Antidepressants in Urine and Wastewater Samples by Liquid Chromatography Coupled with Photodiode Array Detector. *J Chromatogr A* 2021, 1648, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462215.
83. Christophoridis, C.; Veloutsou, S.; Mitsika, E.; Zacharis, C.K.; Christia, C.; Raikos, N.; Fytianos, K. Determination of Illicit Drugs and Psychoactive Pharmaceuticals in Wastewater from the Area of Thessaloniki (Greece) Using LC–MS/MS: Estimation

- of Drug Consumption. *Environ Monit Assess* 2021, 193, doi:10.1007/s10661-021-09035-9.
84. Behpour, M.; Nojavan, S.; Asadi, S.; Shokri, A. Combination of Gel-Electromembrane Extraction with Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography for the Extraction and Determination of Antidepressants in Human Serum, Breast Milk and Wastewater. *J Chromatogr A* 2020, 1621, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461041.
 85. Gonçalves, R.; Ribeiro, C.; Cravo, S.; Cunha, S.C.; Pereira, J.A.; Fernandes, J.O.; Afonso, C.; Tiritan, M.E. Multi-Residue Method for Enantioseparation of Psychoactive Substances and Beta Blockers by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2019, 1125, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121731.
 86. López-García, E.; Mastroianni, N.; Postigo, C.; Barceló, D.; López de Alda, M. A Fully Automated Approach for the Analysis of 37 Psychoactive Substances in Raw Wastewater Based on On-Line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2018, 1576, 80–89, doi: 10.1016/j.chroma.2018.09.038.
 87. González-Mariño, I.; Castro, V.; Montes, R.; Rodil, R.; Lores, A.; Cela, R.; Quintana, J.B. Multi-Residue Determination of Psychoactive Pharmaceuticals, Illicit Drugs and Related Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2018, 1569, 91–100, doi: 10.1016/j.chroma.2018.07.045.
 88. Lima, D.L.D.; Silva, C.P.; Otero, M. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Quantification of Venlafaxine in Environmental Waters. *J Environ Manage* 2018, 217, 71–77, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.03.060.
 89. Asimakopoulos, A.G.; Kannan, P.; Higgins, S.; Kannan, K. Determination of 89 Drugs and Other Micropollutants in Unfiltered Wastewater and Freshwater by LC-MS/MS: An Alternative Sample Preparation Approach. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409, 6205–6225, doi:10.1007/s00216-017-0561-x.
 90. Afonso-Olivares, C.; Čadková, T.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J.; Nováková, L. Simplified Solid-Phase Extraction Procedure Combined with Liquid Chromatography Tandem–Mass Spectrometry for Multiresidue Assessment of Pharmaceutical Compounds in Environmental Liquid Samples. *J Chromatogr A* 2017, 1487, 54–63, doi: 10.1016/j.chroma.2017.01.059.
 91. Aydın, S.; Aydın, M.E.; Tekinay, A.; Kiliç, H. Antidepressants in Urban Wastewater Treatment Plant: Occurrence, Removal and Risk Assessment. *Global NEST Journal* 2017, 19, 100–106.

92. Gurke, R.; Rossmann, J.; Schubert, S.; Sandmann, T.; Rößler, M.; Oertel, R.; Fauler, J. Development of a SPE-HPLC-MS/MS Method for the Determination of Most Prescribed Pharmaceuticals and Related Metabolites in Urban Sewage Samples. *Journal of Chromatography B* 2015, 990, 23–30, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.03.008.
93. Borova, V.L.; Maragou, N.C.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N.S. Highly Sensitive Determination of 68 Psychoactive Pharmaceuticals, Illicit Drugs, and Related Human Metabolites in Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014, 406, 4273–4285, doi:10.1007/s00216-014-7819-3.
94. Sheng, L.H.; Chen, H.R.; Huo, Y. Bin; Wang, J.; Zhang, Y.; Yang, M.; Zhang, H.X. Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* 2014, 19, 1212–1222, doi:10.3390/molecules19011212.
95. Sausseureau, E.; Lacroix, C.; Guerbet, M.; Cellier, D.; Spiroux, J.; Goullé, J.P. Determination of Levels of Current Drugs in Hospital and Urban Wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol* 2013, 91, 171–176, doi:10.1007/s00128-013-1030-7.
96. Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Multi-Class Determination of around 50 Pharmaceuticals, Including 26 Antibiotics, in Environmental and Wastewater Samples by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2011, 1218, 2264–2275, doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.026.
97. Tarcomnicu, I.; Van Nuijs, A.L.N.; Simons, W.; Bervoets, L.; Blust, R.; Jorens, P.G.; Neels, H.; Covaci, A. Simultaneous Determination of 15 Top-Prescribed Pharmaceuticals and Their Metabolites in Influent Wastewater by Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* 2011, 83, 795–803, doi: 10.1016/j.talanta.2010.10.045.
98. Lajeunesse, A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2008, 80, 5325–5333, doi:10.1021/ac800162q.
99. Schultz, M.M.; Furlong, E.T. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal Chem* 2008, 80, 1756–1762, doi:10.1021/ac702154e.
100. Gómez, M.J.; Petrović, M.; Fernández-Alba, A.R.; Barceló, D. Determination of Pharmaceuticals of Various Therapeutic Classes by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis in Hospital Effluent

- Wastewaters. *J Chromatogr A* 2006, 1114, 224–233, doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.038.
101. Himmelsbach, M.; Buchberger, W.; Klampfl, C.W. Determination of Antidepressants in Surface and Wastewater Samples by Capillary Electrophoresis with Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection after Preconcentration Using Off-Line Solid-Phase Extraction. *Electrophoresis* 2006, 27, 1220–1226, doi:10.1002/elps.200500693.
102. *Estatística Do Medicamento e Produtos de Saúde 2022*; 2022;
103. Autorização de Introdução No Mercado - INFARMED, I.P. Available online: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado> (accessed on 22 July 2024).
104. Femina Carolin, C.; Senthil Kumar, P.; Janet Joshiba, G.; Vinoth Kumar, V. Analysis and Removal of Pharmaceutical Residues from Wastewater Using Membrane Bioreactors: A Review. *Environ Chem Lett* 2021, 19, 329–343, doi:10.1007/s10311-020-01068-9.
105. Nascimento, R.; Lima, A.; Barbosa, P.; Silva, V. *Cromatografia Gasosa Aspectos Teóricos e Práticos*; Lima, I., Ed.; Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 2018.
106. Rosado, T.; Oppolzer, D.; Cruz, B.; Barroso, M.; Varela, S.; Oliveira, V.; Leitão, C.; Gallardo, E. Development and Validation of a Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantitation of Several Antipsychotics in Human Plasma and Oral Fluid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2018, 32, 2081–2095, doi:10.1002/rcm.8087.
107. Baker, D.R.; Kasprzyk-Hordern, B. Critical Evaluation of Methodology Commonly Used in Sample Collection, Storage and Preparation for the Analysis of Pharmaceuticals and Illicit Drugs in Surface Water and Wastewater by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2011, 1218, 8036–8059, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.012.
108. Borova, V.L.; Maragou, N.C.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N.S. Highly Sensitive Determination of 68 Psychoactive Pharmaceuticals, Illicit Drugs, and Related Human Metabolites in Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014, 406, 4273–4285, doi:10.1007/s00216-014-7819-3.
109. Laux, G. *Serotonin Reuptake Inhibitors: Citalopram, Escitalopram, Fluoxetine, Fluvoxamine, Paroxetine, and Sertraline.*; Riederer, P., Laux, G., Nagatsu, T., Le, W., Riederer, C., Eds.; Springer, Cham, 2022.

110. Ma, L. dan; Li, J.; Li, J. jun; Liu, M.; Yan, D. zhi; Shi, W. yan; Xu, G. Occurrence and Source Analysis of Selected Antidepressants and Their Metabolites in Municipal Wastewater and Receiving Surface Water. *Environ Sci Process Impacts* 2018, 20, 1020–1029, doi:10.1039/c8em00077h.
111. Brooks, B.W.; Foran, C.M.; Richards, S.M.; Weston, J.; Turner, P.K.; Stanley, J.K.; Solomon, K.R.; Slattery, M.; La Point, T.W. Aquatic Ecotoxicology of Fluoxetine. *Toxicol Lett* 2003, 142, 169–183, doi:10.1016/S0378-4274(03)00066-3.