

Margarida Claudino Martins

**Validação de uma Metodologia Analítica para a  
Determinação de Fluoxetina e Norfluoxetina em Mexilhões  
(*Mytillus galloprovincialis*)**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e  
co-orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que ao longo do tempo sempre me apoiaram, encorajaram e criticaram, sem os quais nada teria sido possível. A todos, o meu sincero “Obrigada”.

Agradeço à Professora Doutora Angelina Pena, pela orientação, interesse e apoio demonstrado bem como a leitura crítica e sugestões que levaram a termo a redação desta tese.

À Professora Doutora Celeste Lino, pelas sugestões e pelo apoio na redação desta tese.

À Doutora Liliana Silva, pela sua disponibilidade, pelas recomendações e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Doutor André Pereira, pelo apoio e pelas sugestões feitas durante a fase experimental deste trabalho.

Um agradecimento à minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio, compreensão e amor incondicional.

Não posso também deixar de agradecer aos meus amigos, e a todas as pessoas que me deram uma palavra de amizade e incentivo. Uma palavra especial à Rute Gomes, pelo apoio, paciência e pela partilha de experiências.

À minha colega Matilde Galavotti, pela ajuda e pela companhia nas horas passadas em laboratório.

## Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
E.U.A.	Estados Unidos da América
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FLU	Fluoxetina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HCl	Ácido Clorídrico
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
norFLU	Norfluoxetina
OMS	Organização Mundial de Saúde
SPE	Extração em Fase Sólida
SSRI	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
UE	União Europeia
LC/MS <sup>n</sup>	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i>
ESI	Ionização Positiva por <i>Electrospray</i>
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Performance

## Resumo

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRIs) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e estão presentes em diferentes áreas do ambiente. Existem alguns métodos analíticos confiáveis e específicos para a detecção e quantificação de SSRIs em amostras ambientais. A maioria dos métodos referidos envolve procedimentos de limpeza que geralmente utilizam a extração em fase sólida (SPE) seguida de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC/MS<sup>n</sup>).

Neste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de Fluoxetina (FLU) e do seu metabolito norfluoxetina (norFLU) em mexilhões (*Mytillus galloprovincialis*). A FLU e a norFLU foram extraídas das amostras de mexilhões utilizando acetonitrilo 0,1% ácido fórmico, purificadas com colunas Oasis MCX e quantificadas por LC-MS-MS. As recuperações foram de 79,05% e 80,73% para a FLU para níveis de fortificação de 5 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup>, respetivamente. Para a norFLU, a 5 ng mL<sup>-1</sup>, a recuperação foi de 70,78 % e a 50 ng mL<sup>-1</sup> foi de 67,99%.

As amostras para os ensaios de exposição foram colhidas na Ria Formosa, Portugal. Estas amostras foram colocadas em aquários, separados tratando-se de grupo controlo ou de exposição, a 75 ng L<sup>-1</sup> de fluoxetina. A diferentes períodos de tempo (0, 3, 7, e 15 dias) foram removidos dos aquários mexilhões dos grupos controlo e de exposição. Nas amostras expostas, a frequência de FLU registada foi de 70, 80 e 100% para os 3, 7 e 15 dias, respetivamente. A frequência da norFLU foi mais baixo para os 3 e 7 dias de exposição, 10 e 50% respetivamente. Em 15 dias de exposição a frequência de norFLU foi 100%.

**Palavras-chave:** Metodologias analíticas, SSRIs, fluoxetina, norfluoxetina, mexilhões.

## **Abstract**

Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants are among the most prescribed pharmaceuticals worldwide and are ubiquitous in different areas of the environment. There are few reliable and specific analytical methods for the detection and quantification of SSRIs in environmental samples. The majority of the reported methods generally involve cleanup procedures that usually employ solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography with *tandem* mass spectrometry detection (LC/MS<sup>n</sup>).

This work was made in order to develop and validate an analytical methodology for the determination of fluoxetine (FLU) and its metabolite norfluoxetine (norFLU) in mussels (*Mytillus galloprovincialis*). The FLU and norFLU were extracted from the mussel samples using acetonitrile 0.1% formic acid, purified with Oasis MCX column and quantified by LC-MS-MS. Recoveries were 79.05% and 80.73% for FLU from spiked to 5 ng ml<sup>-1</sup> and 50 ng ml<sup>-1</sup>, respectively. For norFLU, 5 ng mL<sup>-1</sup>, the recovery was 70.78%, and 50 ng ml<sup>-1</sup> was 67.99%.

Samples for testing exposure were collected in Ria Formosa, Portugal. These samples were placed in separate tanks in the case of the control group or exposure to fluoxetine 75 ng L<sup>-1</sup>. At different periods (0, 3, 7 and 15 days) mussels were removed from the aquária. Were not detected levels of FLU or norFLU in control samples. In the exposed samples, the frequency of FLU was recorded at 70, 80 and 100% for the 3, 7 and 15 days of exposure, respectively. The frequency of norFLU was lower for 3 and 7 days exposure, 10 and 50% respectively. At 15 days of exposure the frequency of norFLU was 100%.

**Keywords:** Analytical methodologies, SSRIs, fluoxetine, norfluoxetine, mussels.

## Índice

I. INTRODUÇÃO .....	1
Vias de entrada no ambiente.....	2
Consumo de SSRIs .....	3
Características e modo de ação dos SSRIs.....	4
Características físico-químicas da FLU e da norFLU .....	5
Efeitos no ecossistema .....	5
Ocorrência no meio aquífero .....	6
Metodologias analíticas para a determinação de FLU e norFLU .....	9
Amostragem.....	9
Preparação da amostra.....	9
Extração em fase sólida (SPE) .....	9
Métodos de Cromatografia Líquida.....	11
II. 1. Amostragem.....	20
II. 2. Materiais e métodos.....	23
II. 2. 1. Reagentes.....	23
II. 2. 2. Soluções .....	23
II. 2. 3. Material e Equipamentos .....	24
II. 2. 4. Metodologia Analítica.....	25
II. 2. 4. 1. Extração.....	25
II. 2. 4. 2. Purificação .....	25
II. 2. 4. 3. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i> .....	25
II. 3. Validação da metodologia analítica .....	27
II. 3. 1. Sensibilidade .....	27
II. 3. 2. Linearidade .....	27
II. 3. 3. Exatidão e precisão.....	27
II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
II. 4. 1. Otimização do procedimento de extração .....	28
II. 4. 2. Otimização da SPE.....	28

II. 4. 3. Validação .....	34
II. 4. 3. 1. Limites de deteção e limites de quantificação.....	34
II. 4. 3. 2. Linearidade.....	34
II. 4. 3. 3. Exatidão e precisão .....	36
II. 4. 4. Níveis de FLU e norFLU nas amostras .....	37
Conclusão.....	41
Bibliografia .....	42

## Índice de tabelas

Tabela 1: Características físico-químicas da FLU e da norFLU.....	5
Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático.....	13
Tabela 3: Peso dos mexilhões de controlo antes e depois de serem triturados.....	20
Tabela 4: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 3 dias, antes e depois de serem triturados.....	21
Tabela 5: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 7 dias, antes e depois de serem triturados.....	22
Tabela 6: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 15 dias, antes e depois de serem triturados.....	22
Tabela 7: Gradiente cromatográfico.....	26
Tabela 8: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE.....	29
Tabela 9: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE.....	32
Tabela 10: Limites de deteção e limites de quantificação para a FLU e a norFLU.....	34
Tabela 11: Valores relativos à exatidão e precisão da FLU e norFLU.....	37
Tabela 12: Resultados obtidos nas amostras controlo de mexilhão.....	39
Tabela 13: Resultados obtidos nas amostras de mexilhão .....	49



## Índice de figuras

Figura 1: Etapas do método de SPE .....	10
Figura 2: Curva de calibração em solvente relativa à FLU.....	35
Figura 3: Curva de calibração em solvente relativa à norFLU.....	35
Figura 4: Curva de calibração na matriz relativa à FLU.....	36
Figura 5: Curva de calibração na matriz relativa à norFLU. ....	36

## Revisão Bibliográfica

## I. INTRODUÇÃO

---

Desde o início dos anos 90 que tem vindo a aumentar a preocupação relativa à presença de produtos farmacêuticos e de produtos de cuidados pessoais no ambiente, consideradas contaminantes ambientais emergentes (Daughton e Ternes, 1999).

Os fármacos e os seus metabolitos bioativos são introduzidos continuamente no ambiente aquático e, como consequência, têm sido realizados cada vez mais estudos, com o objetivo de avaliar os riscos daí inerentes (Daughton e Ternes, 1999).

Têm sido levantadas preocupações sobre os efeitos potenciais dos fármacos sobre a saúde humana e a saúde ambiental. Ao longo dos últimos anos, têm sido realizados vários estudos com o objetivo de avaliar a ocorrência, o destino, os efeitos e os riscos destes compostos no ambiente (Boxall et al., 2012).

Apesar de serem detetados no ambiente aquático em concentrações residuais, a sua presença suscita preocupação, uma vez que são substâncias biologicamente ativas desenhadas para serem persistentes (Boxall et al., 2012).

Uma das principais preocupações em torno da libertação de fármacos nas águas superficiais é o seu potencial de bioacumulação no ambiente, sendo necessário estudos de bioconcentração para a avaliação sob condições laboratoriais controladas, do comportamento químico, do impacto ambiental e dos riscos potenciais para a saúde dos organismos aquáticos (McEneff et al., 2013).

O estudo desenvolvido nesta dissertação de mestrado centra-se em dois compostos do grupo farmacoterapêutico dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (SSRIs) em mexilhões, que se encontram entre as substâncias ativas mais prescritas de administração crónica em todo o mundo.

Uma vez que o modo de ação dos SSRIs se relaciona com a modulação do neurotransmissor serotonina, os organismos aquáticos que possuem sistemas fisiológicos regulados por transportadores e recetores sensíveis à ativação por estes fármacos são potencialmente afetados mesmo que expostos a níveis residuais (Fong e Molnar, 2008; Silva et al., 2012).

A sua presença foi já descrita em diferentes compartimentos ambientais, como águas residuais, superficiais, subterrâneas e para consumo humano e sedimentos, em concentrações residuais ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\text{ng L}^{-1}$ ) (Silva et al., 2012). Os seus efeitos tóxicos em

organismos não alvos já se encontram reportados na literatura científica suscitando uma crescente preocupação a nível mundial.

A fluoxetina (FLU), um dos SSRIs mais consumido, não é completamente metabolizado pelo organismo humano e é excretada principalmente sob a forma de metabolito, a norfluoxetina (norFLU) (Heberer, 2002).

Na avaliação da potencial toxicidade na saúde humana ou ambiental, resultantes da presença destes compostos em água, os bivalves são organismos que ao filtrarem grandes quantidades de água são particularmente sensíveis à exposição aos contaminantes, sendo considerados como bioindicadores de poluição (Klosterhaus, et al., 2013).

Com o objetivo principal de avaliar a bioconcentração da FLU e da norFLU, procedeu-se ao desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a sua determinação em Mexilhões (*Mytillus galloprovincialis*) expostos a concentrações ambientalmente relevantes.

### **Vias de entrada no ambiente**

Os fármacos na sua forma não modificada assim como os metabolitos são excretados através das fezes e da urina atingindo diretamente as redes de saneamento, onde são conduzidos até às ETARs. Apesar da relevância que apresenta, este não é a única via responsável pela introdução de fármacos no meio ambiente (Ruhoy e Daughton, 2008).

Os fármacos podem também atingir o ambiente através de descargas das indústrias de produção, através do uso de águas residuais para irrigação ou por eliminação através do lixo comum, sendo depois enviado para o aterro, onde ocorre a formação de lixiviados que podem vir a contaminar o ambiente aquático (Ruhoy e Daughton, 2008).

Em 2005, Bound et al. realizaram uma pesquisa sobre a incorreta eliminação de fármacos e a perceção dos riscos para o meio ambiente. Esta pesquisa revelou que 64,9 % dos inquiridos consideram os antidepressivos, entre os oito grupos farmacológicos direcionados, como um dos grupos mais perigosos para o meio ambiente. Revelou ainda que 66,7% dos inquiridos diz eliminar os medicamentos não usados diretamente para o lixo, juntamente com os resíduos orgânicos domésticos comuns.

Os fármacos podem não ser totalmente metabolizados pelo organismo, sendo excretados na sua forma inalterada. Desta forma estas substâncias são encontradas no

ambiente sob a forma inalterada ou metabolizada. Mesmo que os fármacos sejam extensivamente metabolizados, os seus metabolitos podem continuar a ser biologicamente ativos ou, em alguns casos, serem facilmente transformados no composto principal sob as condições ambientais (Halling-Sorensen et al., 1998; Richards e Cole, 2006).

Segundo Halling-Sorensen et al. (1998) é importante:

- Identificar e determinar as concentrações de fármacos e dos seus metabolitos no ambiente;
- Compreender os seus padrões de metabolismo e de excreção;
- Avaliar a eficiência dos tratamentos de águas residuais na remoção destes poluentes;
- Compreender sua dispersão, mobilidade, persistência em condições ambientais, absorção e os efeitos sobre organismos não-alvo.

Os fármacos não são totalmente removidos pelos tratamentos nas ETARs. Como resultado, esses compostos são encontrados em efluentes de ETARs e conseqüentemente em águas superficiais e subterrâneas. Os efeitos adversos causados pelos fármacos incluem toxicidade aquática, como por exemplo o desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos (Silva, et al., 2013).

Nas ETARs, as águas residuais são submetidas a vários processos de tratamento que podem levar à eliminação dos fármacos, na tentativa de diminuir o impacto negativo, que pode advir da presença destes resíduos, tanto para o ambiente como para os seres vivos. Encontram-se descritos na literatura científica vários estudos de avaliação da eficiência de remoção das ETARs, através da comparação entre a qualidade da água nos afluentes e efluentes. Estes estudos demonstram que não existe uma eliminação total de todos os grupos farmacoterapêuticos, ocorrendo de igual modo uma variação desta taxa entre compostos do mesmo grupo (Boxal et al., 2004).

As águas residuais depois de tratadas nas ETARs vão contaminar águas de superfície e subterrâneas (Boxal et al., 2004).

### **Consumo de SSRIs**

A depressão pode atingir cerca de 20% da população, tendendo a aumentar, e é a primeira causa de incapacidade, na carga global de doenças, nos países desenvolvidos (Plano Nacional de Saúde, 2004).

A Organização Mundial de Saúde alerta para o facto de um em cada quatro europeus sofrer de distúrbios psicológicos ou psiquiátrico, desde a depressão à esquizofrenia. De forma mais leve ou mais grave, males como a melancolia, o *stress*, a ansiedade e o abuso de substâncias impedem o pleno funcionamento e desenvolvimento em todos os aspetos da vida quotidiana, tanto privados como públicos.

O Eurobarómetro sobre a saúde mental, realizado em 2010, concluiu que 1 em cada 14 cidadãos da União Europeia (UE) consumiu antidepressivos durante o ano de 2009. Além disso, a proporção de inquiridos portugueses que tomaram antidepressivos em 2009 é mais elevada do que a média da UE, 15% *versus* 7%.

Anualmente são publicadas estatísticas, pelo INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produto de Saúde, I.P.), relativas ao consumo de SSRIs por parte dos portugueses. Através da observação dos dados publicados relativos a Portugal confirma-se a tendência de um aumento marcado no consumo de SSRIs. A FLU permanece desde 2002 como o SSRI mais vendido em Portugal. Entre 2003 e 2011 as vendas de SSRIs subiram de cerca de 1,3 milhões para 2,6 milhões de embalagens, o que representa um aumento de cerca de 100% no consumo. Uma tendência semelhante foi observada em muitos países da Europa (Eurobarómetro, 2010).

### **Características e modo de ação dos SSRIs**

Os antidepressivos são medicamentos amplamente prescritos. Uma das classes mais comuns de antidepressivos são os inibidores de seletivo de recaptção de serotonina (SSRIs) que atuam por modulação dos níveis do neurotransmissor serotonina (Brooks et al., 2005). Os SSRIs são amplamente prescritos para tratar a depressão clínica, transtorno compulsivo obsessivo, transtorno do pânico, bem como outros casos em que a inibição seletiva da recaptção da serotonina seja desejável (Brooks et al., 2003; Schultz e Furlong, 2008).

Nos seres humanos, os SSRIs, através da inibição do mecanismo de recaptção de serotonina, induzem um aumento da concentração de serotonina no sistema nervoso central (Kreke e Dietrich, 2008). Após a ingestão, os SSRIs são amplamente metabolizados. A maioria destes metabolitos conserva a sua atividade farmacológica, com exceção da norfluoxetina, o metabolito ativo da fluoxetina (Silva et al., 2012).

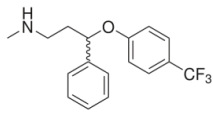
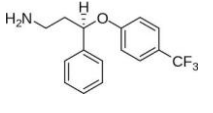
As percentagens de excreção SSRI são relatadas na literatura e as quantidades excretadas nas formas inalteradas ou conjugadas variam consideravelmente (Calisto e

Esteves, 2009). A FLU é principalmente excretada na urina (com menos de 10% excretada de forma inalterada) assim como a FLU N-glucuronido ou a norFLU (Vaswani et al., 2003). Por outro lado, outros estudos farmacocinéticos relatam que apenas cerca de 20% é excretada como norFLU e como FLU N-glucuronide (McEvoy, 2000; Nalecz-Jawecki, 2007).

### Características físico-químicas da FLU e da norFLU

As características físico-químicas da FLU e da norFLU (tabela 1) indicam o seu comportamento no ambiente. São compostos lipofílicos, com pKa que varia entre 10,05 e 10,32. Os valores de log Kow são baixos, 1,22- 1,37 e os valores de solubilidade com a água são relativamente altos. Um valor de 4,65 e 4,47 para o log Koc significa que estes compostos são persistentes (Silva et al., 2012). A polaridade de compostos ionizáveis varia com o pH do sistema de recolha e está sujeito a alterações em diferentes compartimentos biológicos, modificando assim a sua bioacumulação esperada e real (Ramirez et al., 2009).

Tabela 1. Características físico-químicas da FLU e da norFLU (Kwon e Armbrust, 2008).

Nome	Numero CAS	MM	pKa	log k <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	log k <sub>oc</sub> <sup>a,b</sup>	Estrutura molecular
FLU	54910-89-3	309,13	10,05	1,22	4,65	 (C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO)
norFLU	61869-08-7	295,30	10,32	1,37	4,47	 (C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO)

<sup>a</sup> Medido em forma de sal (HCl) de cada SSRI.

<sup>b</sup> Média calculada a partir de experiências com cinco solos e sedimentos diferentes ao pH 5,0-7,8.

### Efeitos no ecossistema

Embora os SSRIs sejam desenhados para atingir as vias metabólicas específicas dos seres humanos, muitas vezes podem ter efeitos nos sistemas metabólicos de organismos que não são alvo, especialmente de organismos invertebrados (Daughton e Ternes, 1999).

Estudos toxicológicos indicaram recentemente que, a concentrações ambientais, os SSRIs induzem efeitos biológicos em peixes, moluscos e outros invertebrados aquáticos, incluindo atrasos no desenvolvimento reprodutivo e fisiológico, diminuição da agressividade e inibição nas respostas à alimentação (Demeestere et al., 2010; Fong e Ford, 2013).

### Ocorrência no meio aquífero

A presença de SSRIs no meio ambiente, especificamente da FLU, foi pela primeira vez relatada por Kolpin et al. (2002), em águas superficiais nos Estados Unidos da América (E.U.A.) e numa ETAR, no Canadá, por Metcalfe et al. (2003).

Desde então, vários estudos científicos realizados referem a presença destes resíduos em vários tipos de amostras de água, águas residuais em concentrações que variam entre 0,15 e 32228 ng L<sup>-1</sup>, em águas subterrâneas e superficiais que oscilam entre 0,5 e 8000 ng L<sup>-1</sup>, e em águas para consumo, 0,5 a 1400 ng L<sup>-1</sup> (Silva et al., 2012).

### ***Bioacumulação***

A FLU, bem como o seu principal metabolito, norFLU, é sem dúvida o SSRI mais investigado tanto nos meios aquáticos como nas amostras de biota (Silva et al., 2012).

Brooks et al. (2005) reportaram os primeiros dados relativos à presença de FLU e norFLU no cérebro, fígado e tecidos musculares de diferentes espécies de peixes. Entre as três espécies de peixes examinados, os níveis médios de norFLU foram mais elevados no fígado (10,27 ng g<sup>-1</sup>), no cérebro (8,86 ng g<sup>-1</sup>) e no tecido muscular (1,07 ng g<sup>-1</sup>) em comparação com a FLU (1,34, 1,58, e 0,11 ng g<sup>-1</sup>, respetivamente). Na verdade, essas observações também foram feitas mais tarde por outros investigadores (Lajeunesse et al., 2011; Ramirez et al., 2009; Ramirez et al., 2007; Schultz et al., 2010). Por conseguinte, não foi possível quantificar a FLU em tecidos homogeneizados de peixe, nem no plasma, mas foi possível a determinação da norFLU em concentrações de 1,22 ng g<sup>-1</sup> e 4,08 ng mL<sup>-1</sup>, respetivamente (Gelsleichter e Szabo, 2013; Metcalfe et al., 2010). De facto, os rácios de norFLU foram de aproximadamente 2:1 em *Japanese medaka* expostos a fluoxetina durante 7 dias (Paterson e Metcalfe, 2008).

A FLU e a norFLU foram detetadas em tecidos de peixes, enfatizando a possibilidade de bioacumulação pelos organismos aquáticos. Brooks et al. (2005) constataram concentrações de



0,1-10 ng g<sup>-1</sup> de FLU, sertralina (SRT) e os seus metabolitos (norFLU e desmetilsertralina, respetivamente) em tecidos musculares, hepáticos e cerebrais de quatro espécies de peixes, num efluente municipal no Texas, EUA. Uma experiência semelhante efetuada por Chu e Metcalfe (2007) revelou concentrações entre 0,14 e 1,02 µg kg<sup>-1</sup> de FLU (Tabela 1).

### ***Estudos de ecotoxicidade***

A FLU é o SSRI mais estudado e foi relatado como sendo o que apresenta maior toxicidade aguda em geral (Brooks et al., 2003a).

A absorção e a bioacumulação de FLU na biota foi relatada em concentrações de 0,01-73 ng g<sup>-1</sup> (Chu e Metcalfe, 2007; Ramirez et al., 2007; Schultz et al., 2011, 2010). Estudos toxicológicos indicaram recentemente que, a nível das concentrações ambientais de FLU e norFLU, os efeitos biológicos em peixes, moluscos e outros invertebrados aquáticos incluem atrasos no desenvolvimento reprodutivo e fisiológico, diminuição da agressividade e inibição de respostas de alimentação (Demeestere et al., 2010; Fong e Ford, 2013).

Os bivalves são membros importantes dos ecossistemas aquáticos e marcadamente interagem com a água e os sedimentos. Estes organismos filtram grandes quantidades de água para respirarem e para se alimentarem. A água entra na cavidade paleal e banha as brânquias onde ficam retidos os microrganismos e as partículas orgânicas que se encontram em suspensão (Spooner e Vaughn, 2006).

O mexilhão do Mediterrâneo é um excelente bioindicador para monitorizar os poluentes orgânicos, pois tem o poder de bioacumular substâncias através de suas brânquias e/ ou através do trato digestivo (Gómes et al., 2012).

A FLU mostrou ser um indutor de desova em mexilhões-zebra (*Dreissena polymorpha*), em concentração da ordem dos 15,5 µg L<sup>-1</sup>, para os machos, e 1,55 mg L<sup>-1</sup> para as fêmeas. Brooks et al. (2003b) observaram que a reprodução de *Ceriodaphnia dubia* foi aumentada quando estes foram expostos a 56 µg L<sup>-1</sup> de FLU, durante 7 dias. Nos machos *Elliptio complanata*, a exposição a FLU 3000 µg L<sup>-1</sup>, durante 48 horas, induziu significativamente a liberação de gâmetas. Estes resultados sugerem que a FLU acumula-se nos tecidos de mexilhão e tem o potencial para destruir vários aspetos da reprodução destes organismos (Bringolf et al., 2010). Na estimulação de *Physa acuta*, durante 44 dias, foi observada a reprodução em concentrações inferiores (31,25 e 62,5 µg L<sup>-1</sup>). Assim, a FLU parece ter diferentes efeitos sobre a fecundidade e a reprodução, dependendo da espécie

(Pery et al., 2008). Por exemplo, duas espécies de gastrópodes, *Potamopyrgus antipodarum* e *Valvata piscinalis*, apresentaram sensibilidade diferente à FLU. Talvez isso possa ser explicado pela degradação metabólica de FLU que difere entre espécies.

Recentemente, o estudo de Luna et al. (2013) também demonstrou que a FLU, em concentrações ambientalmente relevantes, afetou as características e as taxas de crescimento populacional do caracol de água doce *Physa pomilia*.

## Metodologias analíticas para a determinação de FLU e norFLU

### Amostragem

A validade de um resultado analítico assenta inteiramente sobre a integridade dos compostos alvo na matriz da amostra (Lajeneusse et al., 2008).

As amostras de mexilhões devem ser dissecadas e armazenados até a análise (Brooks et al., 2005). Após a homogeneização dos tecidos da amostra esta pode ser armazenada (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007) e congelada a -20 °C (Ramirez et al., 2007) ou -80 °C (Brooks et al., 2005). Muitos autores argumentam que, antes da análise, é necessário fazer um tratamento de desnaturação da amostra para libertar os compostos alvo das ligações às proteínas (Chu e Metcalf, 2007).

### Preparação da amostra

A homogeneização da amostra é realizada com o objetivo de fragmentar as células, de modo a permitir toda a extração do conteúdo tecidual. É realizada com recurso a um vortex, ultra-turrax, moinho ou um equipamento de ultrassonificação (Camel, 2003).

Após a extração é efetuada uma centrifugação para que ocorra a separação da amostra sólida do extrato líquido, sendo aconselhável efetuar mais do que um processo de centrifugação de modo a obter uma melhor separação (Bueno et al., 2007).

### Extração em fase sólida (SPE)

Devido aos níveis extremamente baixos de FLU e norFLU que podem estar presentes em uma amostra, a extração e a purificação são obrigatórias, de modo a eliminar interferências e assim atingir os níveis desejados de sensibilidade analítica (López-Serna et al., 2012).

A extração em fase sólida (SPE) é realizada com solventes orgânicos ou uma mistura de solventes orgânicos e aquosos (Camel, 2003). É importante que no processo de extração não ocorram perdas de substâncias em estudo (López-Serna et al., 2012).

O método de SPE apresenta algumas vantagens, tais como a rapidez de execução, melhor reprodutibilidade, simplicidade de manuseamento e obtenção de extratos mais limpos. É passível de ser automatizada, o que pode minimizar a utilização de solventes

(Camel, 2003).

O processo geral engloba os processos de acondicionamento, passagem da amostra, lavagem e eluição.

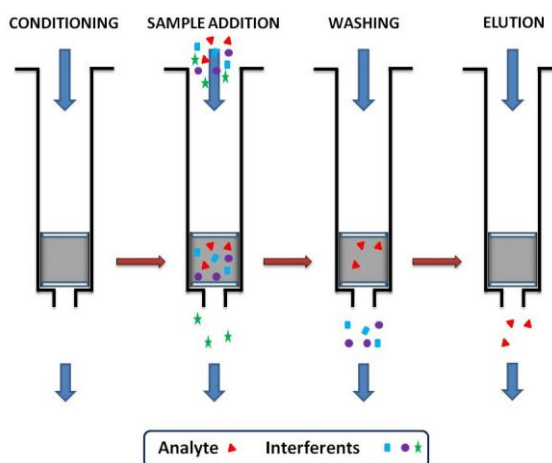


Figura 1: Etapas do método de SPE (Camel, 2003).

A maior dificuldade na análise por SPE reside na escolha do melhor adsorvente. É imprescindível que com ele se obtenha uma recuperação aceitável para todos os compostos caracterizados por diferentes propriedades físico-químicas (Hordern et al., 2007).

A seleção de um adsorvente de extração SPE apropriado depende da compreensão do mecanismo de interação entre o adsorvente e o analito de interesse. Cada adsorvente apresenta uma combinação única de propriedades e estas podem ser associadas a uma grande variedade de problemas de extração (Żwir-Ferenc e Biziuk, 2006). As publicações científicas analisadas relatam a utilização de vários adsorventes distintos.

As colunas Oasis HLB fornecem um bom desempenho em amostras de pH neutro e eluições com solventes orgânicos puros (por exemplo: metanol) (Gracia-Lor et al., 2010; Petrovic et al., 2010), enquanto outros adsorventes precisam de um ajuste de pH da amostra e de condições especiais, como por exemplo, eluição.

Em relação à análise específica dos SSRIs, Shultz e Furlong (2008) relataram que as recuperações melhoraram 5% com a acidificação das amostras. Ao utilizarem ácido fórmico a 0,1% antes da extração com Oasis HLB obtiveram valores que variaram entre 70 e 118%. Gómez et al. (2007) testaram o adsorvente Oasis HLB em diferentes valores de pH, 5, 7 e 8,5, e concluíram que o pH mais baixo melhora a recuperação para a fluoxetina.

De acordo com diversos autores, as colunas de Oasis MCX são as mais adequadas para a extração de compostos básicos e neutros de uma solução aquosa (Chu e Metcalf, 2007; Hordern et al., 2007). Assim, este adsorvente proporciona seletividade para a adsorção de SSRIs, com pKa variando entre 9,05 e 10,5 (Chu e Metcalf, 2007; Metcalf et al., 2010; Nagarnaik et al., 2011). Sousa et al. (2011) utilizaram colunas de Oasis MAX, para a determinação de diversas classes terapêuticas, incluindo a FLU, em amostras de águas residuais. Este adsorvente permitiu uma maior seletividade e sensibilidade na extração de compostos ácidos, enquanto os compostos básicos e neutros foram retidos pelo adsorvente polimérico. Experiências preliminares demonstraram que a acidificação da amostra com HCl a pH 2 assegura a retenção adequada de compostos tais como a FLU no adsorvente. (Sousa et al., 2011).

Gros et al. (2009) testaram colunas Oasis HLB e Oasis MCX na análise de FLU e norFLU na superfície das águas residuais e observaram que a recuperação de substâncias básicas, tais como a FLU, melhorou com o adsorvente Oasis MCX. Isto pode ser atribuído ao facto de que a valores de pH baixo (2 e 3) as drogas básicas são carregadas positivamente e, portanto, são fortemente ligadas à coluna. Chu e Metcalf (2007) também deram preferência a colunas Oasis MCX para a análise de FLU e norFLU em tecidos de peixe.

### **Métodos de Cromatografia Líquida**

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS-MS) tem sido a mais utilizada para a deteção de antidepressivos nas águas superficiais, nas águas residuais e na biota (Lajeneusse et al., 2008). Este método permite a deteção de quantidades residuais, bem como a identificação de um grande número de compostos em simultâneo, sem a perda de sensibilidade (Gros et al., 2012).

Como a maioria dos fármacos são compostos polares, a técnica de escolha é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massa (MS), de preferência, a MS em *tandem*, devido à sua versatilidade, especificidade e seletividade (Gros et al., 2009). O desenvolvimento de métodos mais rápidos e mais sensíveis é hoje viável utilizando técnicas como a cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC), que se tornou uma das ferramentas analíticas mais adequadas para a determinação de contaminantes em amostras ambientais (Gracia-Lor et al., 2010).

A influência do efeito da matriz na análise quantitativa por LC-MS-MS é um fenómeno

amplamente observado e estudado, uma vez que pode resultar na supressão ou no aumento do sinal, o que conduz a resultados errados (López-Serna et al., 2010). Este fenómeno torna-se mais pertinente com a complexidade da matriz da amostra (biota, águas residuais) e a quantidade de amostra a ser concentrada antes da análise (Chu e Metcalf, 2007). Os efeitos da matriz dependem também da preparação da amostra, da separação cromatográfica, da instrumentação da espectrometria de massa, e das condições de ionização. Não é possível prever se a combinação dessas condições irá afetar o sinal do analito (Gracia-Lor et al., 2011). Portanto, a avaliação do efeito de matriz deve ser incluída no processo de validação do método considerando as diferentes matrizes estudadas.

Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático.

Composto	Amostra	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação	Referencia bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina	Águas residuais	Filtração através de filtro de fibra de vidro	Oasis HLB	6 mL acetona	-	3 x 3 mL MeOH	LC/MS/MS	-	Metcalf et al., 2003
Norfluoxetina	2L	Ajuste do pH para 7,5 com hidróxido de sódio		6 mL MeOH 6 mL H <sub>2</sub> O (pH 7,5)					
	Tecido muscular de peixe 0,25 a 1,00 g	Homogeneização da amostra Diluição 1:5 com tampão fosfato 0,10 M (pH 6) Adição de 9 mL ACN Agitação 15 min Centrifugação a 820 g 5 min Evaporação em banho de água 40 °C até volume < 1 mL Adição de 4,0 mL de tampão fosfato 0,10 M (pH 6)	Bond Elute Certify	2 mL MeOH 2 mL tampão fosfato 0,10 M (pH 6)	1 mL ácido acético 1,0 M 6 mL MeOH	4 mL hidróxido de amónio em acetato de etilo	GC/MS	49 - 107	Brooks et al., 2005

**Tabela 2: Preparação da amostra e SPE na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático. (continuação)**

Composto	Amostras	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação (%)	Referencia Bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina	Peixe (tecido muscular)	PLE Adição de HCl 0,05 M ao extrato metanólico	Oasis MCX 150 mg	6 mL diclorometano 6 mL MeOH 6 mL H <sub>2</sub> O	5 mL água 2 mL HCl 0,1 M	2 mL MeOH 3 X 3 mL diclorometano 2 mL MeOH 2 mL hidróxido de amónio/ MeOH/H <sub>2</sub> O (4:30:44) 3 x 3 mL hidróxido de amónio (5:95) 2 X4 mL MeOH	LC/MS/ MS	80,1 e 92,5 a 1 µg kg <sup>-1</sup>	Chu and Metcalf, 2007
	Águas residuais 1L	Acidificação com ácido fórmico 0,1%	Oasis HLB 500 mg	5 mL H <sub>2</sub> O 5 mL MeOH	5 mL MeOH 70% em acetato de amónio 2%	10 mL MeOH 70% em ácido acético 2%	-	72 – 118 a 0,5 ng L <sup>-1</sup> 70 – 118 a 100 ng L <sup>-1</sup>	Schultz and Furlong, 2008
	Águas residuais 500 mL	Filtração através de um filtro 0,7 µm Adição de 2 mL solução de Na <sub>2</sub> EDTA 50 g L <sup>-1</sup> e 25 mg L <sup>-1</sup> ácido ascórbico	Oasis MCX	6 mL ACN 6 mL H <sub>2</sub> O	6 mL ácido fórmico 2%	2 x 5 hidróxido de amónio em ACN	-	60-101 em águas residuais 1000 ng L <sup>-1</sup> 57-93 em 500 ng L <sup>-1</sup> em águas de superfície	Batt et al., 2008



**Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático (continuação).**

Composto	Amostra	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação (%)	Referencia Bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina	Águas residuais	Filtração através de um filtro de fibra de vidro 1,5 µm	Oasis MCX 150 mg	6 mL de MeOH	2 mL de HCL 0,1 M em H <sub>2</sub> O	3 x 3 mL de 5% hidróxido de amónio/ MeOH (5:95)	LC/MS/MS	-	Metcalf et al., 2010
Norfluoxetina	100 mL Águas de rio 200 mL Água de consumo 500 mL	Ajusto de pH para 3 com HCl concentrado							
	Águas de superfície	-	Oasis HLB 200 mg	2 mL MeOH 2 mL H <sub>2</sub> O	2 mL ácido fórmico a 2% em H <sub>2</sub> O 2 mL ácido fórmico em MeOH	2 mL diclorometano/2-propanol/hidróxido de amónio (75:24,5:0,5)	LC/MS/MS	-	Alonso et al., 2010
	Águas residuais	Filtração através de filtro microfibras GF/A	Oasis HLB 200 mg	10 mL MeOH 10 mL H <sub>2</sub> O	8 mL H <sub>2</sub> O	2 x 3 mL MeOH	UPLC/MS/MS	60-101	Huerta-Fontela et al., 2010
	Águas residuais de unidade de saúde 500 mL	Filtração através de filtro 0,7 µm Adição 10 mg de Na <sub>2</sub> EDTA, e 50 mg ácido ascórbico	Oasis MCX 150 mg	6 mL ACN 2 mL H <sub>2</sub> O	6 mL ácido fórmico 2%	4 mL ACN:hidróxido de amónio (95:5)	UPLC/MS/MS	71-105	Nagarnaik et al., 2011

**Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático (continuação).**

Composto	Amostra	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação (%)	Referencia Bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina Norfluoxetina	Águas residuais e biossólido de ETAR's 0,2 g	Filtração Adição de 0,5 mL MeOH Acidificação (pH 3) com ácido fosfórico 85% Adição de MeOH / tampão ácido acético 0,1 M pH 4 (1:1) Agitação 15 min Ultrassons 15 min Adição de 4 mL H <sub>2</sub> O Centrifugação a 320 g 5 min	Strata-X-C	4 mL MeOH 8 mL H <sub>2</sub> O	2 mL HCL 2 mL MeOH	2 x 2 mL acetato de etilo 2 x 2 mL de hidróxido de amônio a 5% em MeOH	LC/MS/MS	72-102 em águas residuais 500 ng L <sup>-1</sup> 71-87 biossólidos 25 ng g <sup>-1</sup>	Lajeneusse et al., 2012
Fluoxetina	Águas residuais hospitalares 1L	- Filtração através de filtro de fibra de vidro 1,2µm Ajusto do pH para 7 com ácido sulfúrico.	Oasis-HLB	5 mL n-hexano 5 mL acetato de etilo 10 mL MeOH 10 mL H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	5 mL n-hexano 5 mL acetato de etilo 14 mL MeOH	LC/MS/MS	-	Weigel et al., 2004
	Águas residuais 2,5 L	Ajusto do pH para 12 com amônio 25% Dupla filtração com filtro no.1	Bond Elut ENV (125 µm diâmetro da partícula esférica, porosidade média 450 Å	6 mL MeOH 6 mL H <sub>2</sub> O (pH 12)	4 mL MeOH a 20%	8 mL HCl 0,3 M em MeOH	LC/MS/MS	58-84	Vasskong et al, 2006

**Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático (continuação).**

Composto	Amostra	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação (%)	Referencia Bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina	Águas residuais 200 mL (pH 8,5)	Filtração com filtro fibra de vidro 0,7 µm	Oasis-HLB	6 mL MeOH 6 mL H <sub>2</sub> O a pH 8 com de hidróxido de amónio a 20%	5 mL H <sub>2</sub> O	2 x 4 mL MeOH	LC/MS/ MS	41-45 em 500 ng L <sup>-1</sup>	Bueno et al., 2007
	Afluentes hospitalares 100 mL (pH 7)	Filtração com filtro de fibra de vidro 0,7 µm	SPE automático off-line com Oasis-HLB 200 mg	6 mL MeOH 5 mL H <sub>2</sub> O (pH 7) com HCl 2N	5 mL H <sub>2</sub> O	2 x 4 mL MeOH	LC/MS/ MS	80,1 e 92,5 em 1 µg L <sup>-1</sup>	Gómez et al., 2007
	Águas residuais 500 mL	Filtração com filtro de fibra de vidro 0,7 µm e 1,2 µm	Oasis-HLB 60 mg	-	-	5 mL MeOH	LC/MS/ MS	62-115	MacLeod et al., 2007
	Águas residuais 100 mL Águas superficiais 500 mL	Filtração com filtro fibra de vidro e filtro de membrana de nylon Adição de EDTA 5%	Oasis-HLB 60 mg	5 mL MeOH 4 mL H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	2 x 4 mL MeOH	LC/MS/ MS	84-110 em águas superficiais 50 ng L <sup>-1</sup> 84-112 em águas residuais 100 ng L <sup>-1</sup>	Groset al., 2009
	Águas residuais hospitalares 2,5 L	Filtração com GFC 0,45 µm Acidificação (pH 3) com HCl	Strata X 200 mg	5 mL MeOH 5 mL H <sub>2</sub> O 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada (pH 3) com HCl	-	6 mL MeOH 6 mL MeOH em ácido acético a 2% 6 mL MeOH em hidróxido de amónio a 2%	UPLC/M S/MS	< 50	Langford et al., 2009

**Tabela 2: Preparação da amostra, SPE e método analítico na análise de FLU e norFLU no ambiente aquático (continuação).**

Composto	Amostra	Preparação da amostra	SPE				Método analítico	Recuperação (%)	Referencia Bibliográfica
			Colunas	Acondicionamento	Lavagem	Eluição			
Fluoxetina	Águas residuais hospitalares 2,5 L	Filtração com GFC 0,45 µm Acidificação (pH 3) com HCl	Strata X 200 mg	5 mL MeOH	-	6 mL MeOH	UPLC/MS/MS	< 50	Langford et al., 2009
				5 mL H <sub>2</sub> O		6 mL MeOH em ácido acético 2%			
				5 mL H <sub>2</sub> O acidificada (pH 3) com HCl		6 mL MeOH em hidróxido de amônio 2%			
	Águas de drenagem do campo 250 mL	Filtração com filtro fibra de vidro 0,7 µm Adição de 0,2 g Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 5)	Strata X 200 mg	2 x 3 mL MeOH 2 x 3 mL H <sub>2</sub> O	2 mL 5% MeOH	2 x 3 mL MeOH	LC/MS/MS	68-121 em 100 ng L <sup>-1</sup>	Wu et al., 2009
	Águas residuais 500 mL Lamas de tratamento de águas 2 g	Filtração com filtro de membrana de nylon 0,45 µm Ajuste de pH 7-7,5 Solvente de extração ultrassônico com 2 x 2 mL MeOH e 2 x 2 mL acetona Centrifugação a 10,000 rpm 1 min Sobrenadantes diluídos com 150 mL de água	RP-C18 500 mg	1 mL MeOH 1 mL H <sub>2</sub> O	-	4 x 1 mL MeOH	LC/MS	60-82 em 100 µg L <sup>-1</sup>	Salgado et al., 2010
	Águas residuais hospitalares 5 mL	Filtração com filtro de membrana de nylon 0,45 µm Diluição 50 mL água Adição 1 mL ácido fórmico	Oasis HLB 60 mg	5 mL diclorometano 5 mL MeOH 5 mL H <sub>2</sub> O	-	1 mL hidróxido de amônio:ACN (2:98) 2 mL diclorometano	LC/MS/MS	44-876 em 1000 ng L <sup>-1</sup>	Orte et al., 2010

Parte experimental

## II. 1. Amostragem

Os ensaios de exposição foram conduzidos pelo Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Algarve. De acordo com Gonzalez-Rey e Bebianno (2013), mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*, foram colhidos, em 2010, da Ria Formosa, em Portugal. Estas amostras foram transportadas vivas para o laboratório, e após limpeza das valvas, colocadas em aquários separados tratando-se de grupo controlo ou de exposição a 75 ng L<sup>-1</sup> de FLU. Anteriormente ao período de exposição, todos os mexilhões foram mantidos por 7 dias nos aquários por forma a aclimatizarem a água do mar oxigenada de forma natural. Os aquários foram mantidos a temperatura (18,6 °C ± 1), a salinidade (33 ± 0,4), pH (8,1 ± 0,2) e a saturação de oxigénio (> 98% ± 2) constantes. Os mexilhões não foram alimentados até ao término do ensaio e a concentração de fluoxetina foi reestabelecida a cada 48 h. A diferentes períodos de tempo (0, 3, 7, e 15 dias) foram removidos dos aquários mexilhões dos grupos controlo e de exposição. Cada amostra foi imediatamente congelada em azoto líquido e armazenada, individualmente, a -20 ° C. Antes de serem analisadas as amostras foram trituradas. De acordo com as tabelas 3 a 6 os pesos dos mexilhões antes da trituração variaram de 0,40 g a 1,89 g e depois da trituração variaram de 0,42 g a 1,87 g.

Tabela 3: Peso dos mexilhões de controlo antes e depois de serem triturados.

Amostras de mexilhões Tempo de exposição	m (g) (antes de ser triturado)	m (g) (depois de ser triturado)
<b>Amostras de controlo t<sub>zero</sub></b>		
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> # 1	1,07	0,99
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> # 2	1,64	1,61
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> # 3	0,90	0,86
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> # 4	0,57	0,54
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> # 5	1,42	1,36
<b>Amostras de controlo t<sub>zero</sub></b>		
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> # 1	0,80	0,78
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> # 2	1,48	1,38
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> # 3	1,89	1,87
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> # 4	1,46	1,43
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> # 5	0,84	0,81

Tabela 3: Peso dos mexilhões de controlo antes e depois de serem triturados (continuação).

Amostras de mexilhões Tempo de exposição	m (g) (antes de ser triturado)	m (g) (depois de ser triturado)
<b>Amostras de controlo <math>t_{zero}</math></b>		
$C_2t_0$ # 1	1,02	1,00
$C_2t_0$ # 2	1,21	1,20
$C_2t_0$ # 3	1,00	0,99
$C_2t_0$ # 4	1,41	1,34
$C_2t_0$ # 5	1,14	1,11
<b>Amostras de controlo <math>t_{zero}</math></b>		
$C_3t_0$ # 1	1,41	1,34
$C_3t_0$ # 2	1,25	1,21
$C_3t_0$ # 3	1,08	1,03
$C_3t_0$ # 4	1,03	0,99
$C_3t_0$ # 5	1,22	1,18

Tabela 4: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 3 dias, antes e depois de serem triturados.

Amostras de mexilhões Tempo de exposição	m (g) (antes de ser triturado)	m (g) (depois de ser triturado)
<b>3 dias</b>		
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 1	1,02	0,99
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 2	0,4	0,47
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 3	1,28	1,23
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 4	1,04	1,02
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 5	1,03	1,01
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 6	1,03	1,01
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 7	0,95	0,95
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 8	1,37	1,31
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 9	0,97	0,94
IC/AQ $E_{1t_3}$ # 10	1,11	1,09

Tabela 5: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 7 dias, antes e depois de serem triturados.

Amostras de mexilhões Tempo de exposição	m (g) (antes de ser triturado)	m (g) (depois de ser triturado)
<b>7 dias</b>		
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 1	1,20	1,18
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 2	0,42	0,42
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 3	1,74	1,70
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 4	1,07	1,05
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 5	0,49	0,49
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 6	1,22	1,20
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 7	0,82	0,81
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 8	1,77	1,71
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 9	0,60	0,59
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> # 10	0,77	0,76

Tabela 6: Peso dos mexilhões expostos a FLU durante 15 dias, antes e depois de serem triturados.

Amostras de mexilhões Tempo de exposição	m (g) (antes de ser triturado)	m (g) (depois de ser triturado)
<b>15 Dias</b>		
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 1	0,93	0,87
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 2	1,06	1,05
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 3	0,54	0,54
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 4	1,09	1,04
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 5	1,43	1,40
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 6	0,96	0,96
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 7	1,00	0,99
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 8	1,09	1,08
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 9	1,49	1,48
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> # 10	1,18	1,17



## II. 2. Materiais e métodos

---

Neste capítulo apresentam-se todos os materiais, equipamentos e métodos utilizados para a determinação de FLU e norFLU nos mexilhões.

### II. 2. 1. Reagentes

- Acetato de amónio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Acetato de sódio (Merck, Alemanha)
- Acetonitrilo para HPLC (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Ácido acético com grau de pureza superior a 99,7% (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Ácido clorídrico a 37% (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Ácido fórmico (98%) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Água obtida através de sistema Millipore, Milli-Q System (Bedford, MA, EUA)
- Metanol, Sigma-aldrich, (St. Louis, MO, EUA)
- Azoto (Ar Líquido)
- Padrões de fluoxetina, fluoxetina-d5, norfluoxetina, com grau de pureza superior a 98%, Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, EUA).

### II. 2. 2. Soluções

A solução de acetonitrilo com 0,1% de ácido fórmico foi preparada adicionando 0,1 mL de ácido fórmico a um balão de 100 mL completando-se o volume com ACN, obteve-se um pH entre 2,0 e 2,3.

Para a solução MeOH/ tampão ácido acético 0,1 M (pH 3) (1:1) foi necessário preparar uma solução de ácido acético 0,1 M (5,7 mL de ácido acético glacial perfazendo o valor de 1L com H<sub>2</sub>O) e de acetato de sódio 0,1 M (1,4 g de acetato de sódio em 100 mL de água). Em seguida adicionou-se 982,3 mL de ácido acético com 17,7 mL de acetato de sódio, para obter 1 L de solução tampão.

A solução de 100 mL de ACN:MeOH (1:1) foi preparada em 50 mL de ACN e 50 mL de MeOH.

A solução de MeOH a 20% foi preparada com uma solução de acetato de amónio a

2%.

A solução de 250 mL de água acidificada a pH 2,5 foi preparada com HCl a 37%.

A solução de MeOH a 5% foi preparada com 95 mL de água e 5 mL de MeOH.

A solução de 100 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 5% foi preparada com 95 mL de MeOH e 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

As soluções *stock* e intermédias de FLU e norFLU, FLU-d5 e norFLU-d6 foram preparadas a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respetivamente, e foram armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . As soluções de trabalho, renovadas antes de cada análise, foram preparadas a  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ , para cada SSRI, e usadas para ensaios de linearidade, precisão e repetibilidade. Para a curva de calibração foram usadas soluções em MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90) com as seguintes concentrações:  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $35 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $25 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ . Todas as soluções foram armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  e em balões de vidro âmbar para proteger da luz.

## II. 2. 3. Material e Equipamentos

- Agitador (Edmund Buhlu, Alemanha)
- Aparelho de ultrassonificação modelo Sonorex RK 100 (Berlim, Suíça)
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285 (Toledo, Suíça)
- Centrifugadora Sigma Modelo 3-16 K (St. Louis, E.U.A.)
- Coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB – Phenyl (150 mm  $\pm$  3,0 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ )
- Colunas de extração de fase sólida Oasis MCX 6cc/ 200 mg (Damstadt, Alemanha)
- Eletrodo pH Jenway 3505 (Reagente 5, Porto, Portugal)
- Espectrómetro de massa híbrido Quadrupolo – Ion Trap (LCQ AdvantageMax, Thermo Finnigan, San José, California, E.U.A.)
- Evaporador Labconco Rapidvap vertex (Kansas)
- Material de vidro âmbar
- Membrana Durapore com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Dassel, Irlanda)
- Sistema de vácuo para extração em fase sólida Dinko (Barcelona, Espanha)
- Ultraturrax Xstral (Alemanha)

- Vortex Retsch Mixer (Alemanha).

## **II. 2. 4. Metodologia Analítica**

### **II. 2. 4. 1. Extração**

A metodologia analítica aplicada na extração em mexilhão abrange as seguintes etapas:

- 1- Pesar um grama de mexilhão para um tubo de centrífuga.
- 2- Adicionar 10 mL da solução de acetonitrilo com 0,1% ácido fórmico.
- 3- Agitar durante 5 minutos no agitador.
- 4- Ultrassonificação durante 15 minutos.
- 5- Centrifugação a 4°C a 5400 g, durante 10 minutos.
- 6- Separar o sobrenadante do tubo de centrífuga e colocar num tubo de vidro de centrífuga.
- 7- Repetir o procedimento a partir do ponto 2.
- 8- Juntar os sobrenadantes e centrifugar a 4 °C durante 10 minutos a 20000 *g*.

### **II. 2. 4. 2. Purificação**

Na extração em fase sólida (SPE) utilizaram-se coluna Oasis MCX, 200 mg (6cc) e realizaram-se as seguintes etapas:

- 1- Acondicionamento das colunas com 5 mL de MeOH, seguido de 5 mL de água Milli Q.
- 2- Passagem do extrato da amostra.
- 3- Lavagem com 2 mL de HCl, 0,1 N seguido de 2 mL de MeOH a 5% em H<sub>2</sub>O.
- 4- Secagem das colunas durante 10 minutos.
- 5- Eluição dos compostos em 2 mL de MeOH, seguido de 6 mL de NH<sub>4</sub>OH.
- 6- Concentração à secura a 40 °C sob uma corrente suave de N<sub>2</sub>.

### **II. 2. 4. 3. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em *Tandem***

Para as análises realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC/MS<sup>n</sup>), o extrato seco foi reconstituído em 1 mL de uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90) e, de seguida, microfiltrado por uma membrana Durapore com um

diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  (*loop* parcial) e o fluxo cromatográfico de 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ , quando um gradiente de água com 0,5% de ácido fórmico (A) e MeOH com 0,5% de ácido fórmico (B) (tabela 7).

A coluna cromatográfica foi mantida a uma temperatura de 45°C tendo-se utilizado uma pré-coluna do mesmo material. O espectrômetro de massa híbrido operou em modo de ionização positiva por *electrospray* (ESI) com aquisição por monitorização seletiva de reações (SRM). As temperaturas da fonte e capilar foram de 0 e 220 °C e as voltagens de 4.5 e 34 V, respetivamente. O gás nebulizador foi o azoto, com uma velocidade do fluxo de 40 arb (unidades arbitrárias) e uma velocidade do fluxo do gás auxiliar de varredura de 10 arb. O gás de colisão foi o hélio com uma energia de colisão de 30% para a fluoxetina e 35% para a norfluoxetina. Um ião precursor ( $\text{MS}^1$ ) e dois iões produto (um  $\text{MS}^2$  e um  $\text{MS}^3$ ) foram obtidos da seguinte forma: fluoxetina ( $m/z$  310  $\rightarrow$   $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  117) e norfluoxetina ( $m/z$  296  $\rightarrow$   $m/z$  134  $\rightarrow$   $m/z$  117).

Tabela 7: Gradiente cromatográfico.

Tempo (min)	% A	% B
0	90	10
2	90	10
2.1	55	45
4	55	45
8	15	85
10	15	85
10.1	5	95
15	5	95
15.1	90	10
20	90	10

A: Água com 5% de ácido fórmico.

B: Metanol com 0,5% de ácido fórmico.

## II. 3. Validação da metodologia analítica

---

A validação foi realizada para garantir que este método analítico é adequado para a determinação dos SSRIs em mexilhões. Os procedimentos de validação foram realizados abrangendo diferentes critérios de desempenho, tais como sensibilidade, os efeitos da matriz, exatidão e precisão.

### II. 3. 1. Sensibilidade

A sensibilidade do método é avaliada através dos limites de detecção (LD) e dos limites de quantificação método (LQ). Estes valores foram calculados através da curva de calibração na matriz com  $3,3 \frac{S_y}{x} / b$  e  $10 \frac{S_y}{x} / b$ , respectivamente, em que  $b$  é o declive da curva e o  $\frac{S_y}{x}$  é o desvio padrão residual da função linear.

### II. 3. 2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em permitir a obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise (Ribani et al., 2004).

A linearidade foi estudada tendo em consideração as curvas de calibração das soluções padrão em solvente e as curvas de calibração preparadas com a matriz em estudo.

A curva de calibração das soluções padrão em estudo foi realizada utilizando níveis de concentração entre  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  para a FLU, norFLU, FLU-d5 e norFLU-d6. Para o estudo da linearidade em matriz, as concentrações de FLU, norFLU, FLU-d5 e norFLU-d6 variaram entre  $50 \text{ ng g}^{-1}$  e  $2,5 \text{ ng g}^{-1}$ .

### II. 3. 3. Exatidão e precisão

A exatidão é avaliada pela taxa de recuperação, ou seja, é a razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada.

Para avaliar a exatidão do método foram utilizadas amostras fortificadas com  $50 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $25 \text{ ng g}^{-1}$  e  $5 \text{ ng g}^{-1}$  de FLU, FLU-d5, norFLU e norFLU-d6 e amostras não fortificadas. As amostras foram analisadas em triplicado, nas mesmas condições analíticas.

A precisão intra-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação de cada dia.

A precisão inter-dia foi calculada através da média dos desvios padrões das percentagens de recuperação dos três dias.

## II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### II. 4. 1. Otimização do procedimento de extração

Com o objetivo de otimizar a metodologia analítica, foram testados diferentes parâmetros do método de extração e purificação, tendo sido utilizada uma concentração de 50 ng g<sup>-1</sup>.

O parâmetro primeiramente analisado foi o solvente de extração. Utilizaram-se três reagentes de extração, MeOH/ tampão ácido acético 0,1 M pH 3 (1:1), ACN em 0,1% de ácido fórmico e ACN:MeOH (1:1). Os melhores resultados foram obtidos com ACN em 0,1% de ácido fórmico (tabela 7).

### II. 4. 2. Otimização da SPE

Para cada método de extração, foram testadas dois tipos de colunas, Oasis HLB (200 mg/ 6cc) e Oasis MCX (200 mg/ 6cc) (tabela 8). A avaliação das colunas Oasis HLB foi baseada no estudo de Schultz e Furlong (2008). O extrato da amostra foi diluído em 80 mL, 180 mL e 175 mL de água Milli Q em função de cada um dos diferentes reagentes de extração utilizados, para manter a proporção entre a fase aquosa e a ionizada do extrato adicionado à coluna de SPE.

A avaliação das colunas Oasis MCX foi testada em extrato da amostra sem diluição e com diluição em água Milli Q. Para cada método de extração foram testadas diluições de 5 mL, 20 mL e 15 mL. Os melhores resultados foram obtidos com as colunas Oasis MCX (200 mg/ 6cc), e com diluição de 20 mL de água Milli Q. A presença de água fez com que a passagem da amostra fosse mais lenta e, assim a retenção de compostos pela coluna foi maior. Para melhorar os resultados, a diluição foi aumentada para 40 mL de água Milli Q.

Para verificar se a proporção MeOH:H<sub>2</sub>O interferia aquando da redissolução dos extratos secos, procedeu-se à fortificação das amostras a 50 ng g<sup>-1</sup> e 5 ng g<sup>-1</sup> com a solução padrão preparada em MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40 e 10:90). Verificou-se que para os níveis mais baixos de fortificação se obtiveram valores mais elevados de recuperação, redissolvendo em MeOH: H<sub>2</sub>O (10:90) (tabela 9).

**Tabela 8: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE.**

<b>Solvente de Extração</b>	<b>Colunas</b>	<b>Diluições</b>	<b>Procedimentos</b>	<b>Recuperação %</b>
MeOH/ 0,1 M tampão ácido acético pH 3 (1:1)	Oasis HLB	80 mL H <sub>2</sub> O	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada	FLU- 71,79%
	(200 mg; 6 cc)		Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU- d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	FLU-d5- 75,65%
			Lavagem: 5mL MeOH acetato de amônia a 2% Eluição: 8 mL ácido acético em MeOH	norFLU – 69,60% norFLU-d6- 75,48 %
	Oasis MCX	-		FLU- 81,81%
	(200 mg; 6 cc)		Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada	FLU-d5- 81,82%
			Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU- d5, norFLU-d6) 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	norFLU – 66,54% norFLU-d6- 83,88%
	Oasis MCX	5 mL H <sub>2</sub> O		FLU- 77,28 %
	(200 mg; 6 cc)		Lavagem: 2 mL HCl 0,1 N; 2 mL MeOH a 5% em H <sub>2</sub> O	FLU-d5- 82,92 %
			Eluição: 4 mL MeOH; 4 mL NH <sub>4</sub> OH em MeOH	norFLU – 71,33 % norFLU-d6- 80,17 %

**Tabela 8: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE (continuação).**

Solvente de Extração			Colunas		Diluições	Procedimentos	Recuperação %
ACN fórmico	0,1%	ácido	Oasis	HLB	180 mL H <sub>2</sub> O	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada	FLU- 70,92 %
			(200	mg;		Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-	FLU-d5- 80,62%
			6cc)			d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	norFLU – 66,05 %
					Lavagem: 5mL MeOH acetato de amônia a 2%	norFLU-d6- 78,14 %	
					Eluição: 8 mL ácido acético em MeOH		
			Oasis	MCX	-		FLU- 80,33 %
			(200	mg;			FLU-d5- 82,61 %
			6cc)			Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada	norFLU – 63,96 %
						Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-	norFLU-d6- 84,79 %
			Oasis	MCX	20 mL H <sub>2</sub> O	d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	FLU- 85,71 %
			(200	mg;		Lavagem: 2 mL HC 10,1 N; 2 mL MeOH a 5% em H <sub>2</sub> O	FLU-d5- 82,71 %
			6cc)			Eluição: 4 mL MeOH; 4 mL NH <sub>4</sub> OH em MeOH	norFLU – 69,20 %
							norFLU-d6- 83,31%



Tabela 8: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE (continuação).

Solvente de Extração	Colunas	Diluições	Procedimentos	Recuperação %
ACN:MeOH (1:1)	Oasis HLB (200 mg; 6cc)	175 mL H <sub>2</sub> O	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40) Lavagem: 5mL MeOH acetato de amônia a 2% Eluição: 8 mL ácido acético em MeOH	FLU- 85,30 % FLU-d5- 83,85 % norFLU – 61,09 % norFLU-d6- 88,95 %
	Oasis MCX (200 mg; 6cc)	-	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	FLU- 75,36 % FLU-d5- 86,12 % norFLU – 71,06 % norFLU-d6- 78,35 %
	Oasis MCX (200 mg; 6cc)	15 mL H <sub>2</sub> O	Lavagem: 2 mL HCl 0,1 N; 2 mL MeOH a 5% em H <sub>2</sub> O Eluição: 4 mL MeOH; 4 mL NH <sub>4</sub> OH em MeOH	FLU- 85,61 % FLU-d5- 85,74 % norFLU – 61,66 % norFLU-d6- 81,56 %

**Tabela 9: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE.**

Solvente de Extração			Fortificação	Colunas	Diluições	Procedimentos	Recuperação %
ACN fórmico	0,1% ácido		50 ng g <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90)	Oasis MCX (200 mg; 6cc)	40 mL H <sub>2</sub> O	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40) Lavagem: 2 mL HCl 0,1 N; 2 mL MeOH a 5% em H <sub>2</sub> O Eluição: 2 mL MeOH; 6 mL NH <sub>4</sub> OH em MeOH	FLU- 80,73 % FLU-d5- 81,75 % norFLU – 67,99 % norFLU-d6 - 81,11 %
			50 ng g <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)				FLU- 89,00% FLU-d5- 76,59 % norFLU – 67,56 % norFLU-d6 - 66,59 %

Tabela 9: Ensaios de otimização do método de extração e do método de SPE. (continuação)

Solvente de Extração			Fortificação	Colunas	Diluições	Procedimentos	Recuperação %
ACN fórmico	0,1% ácido		5 ng g <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90)	Oasis MCX (200 mg; 6cc)	40 mL H <sub>2</sub> O	Acondicionamento: 5 mL MeOH; 5 mL H <sub>2</sub> O acidificada Amostra: 1 g adicionada de 1 mL de padrão (FLU, norFLU, FLU-d5, norFLU-d6) a 50 ng mL <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	FLU- 79,05 % FLU-d5- 81,30 % norFLU – 70,78 % norFLU-d6 – 82,29 %
			5 ng g <sup>-1</sup> MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)			Lavagem: 2 mL HCl 0,1 N; 2 mL MeOH 5% em H <sub>2</sub> O Eluição: 2 mL MeOH; 6 mL NH <sub>4</sub> OH em MeOH	FLU- 79,29 % FLU-d5- 78,59 % norFLU – 65,07 % norFLU-d6 – 81,93 %

## II. 4. 3. Validação

### II. 4. 3. 1. Limites de detecção e limites de quantificação

Os limites de detecção (LD) obtidos foram de 0,69 ng g<sup>-1</sup> para FLU e de 0,81 para norFLU (tabela 10).

Os limites de quantificação (LQ) obtidos foram de 2,09 ng g<sup>-1</sup> para FLU e de 2,45 para norFLU (tabela 10).

**Tabela 10: Limites de detecção e limites de quantificação para a FLU e a norFLU.**

	LD (ng g <sup>-1</sup> )	LQ (ng g <sup>-1</sup> )
FLU	0,69	2,09
norFLU	0,81	2,45

### II. 4. 3. 2. Linearidade

A avaliação da linearidade foi efetuada em solvente entre 2,5 e 50 ng mL<sup>-1</sup>, e com extratos de amostras fortificadas a 6 níveis de concentração que variaram entre 2,5 e 50 ng g<sup>-1</sup>.

A linearidade foi adequada tanto para o solvente como para a matriz, tendo-se obtido coeficientes de correlação de 0,9999 para a FLU e norFLU (figuras 2 a 5).

O efeito-matriz determinou-se dividindo a percentagem do declive da curva de calibração em matriz (B) pelo declive da curva em calibração em solvente (A). Assim, a razão (B / A × 100) foi definida como o efeito-matriz absoluto (ME%). O valor obtido foi interpretado da seguinte forma: o valor de 100% indica uma ausência de efeito-matriz, acima de 100% um aumento do sinal e abaixo de 100% uma supressão de sinal. Os resultados do efeito-matriz foram de 98,59% e 100%, para a FLU e norFLU, respetivamente.

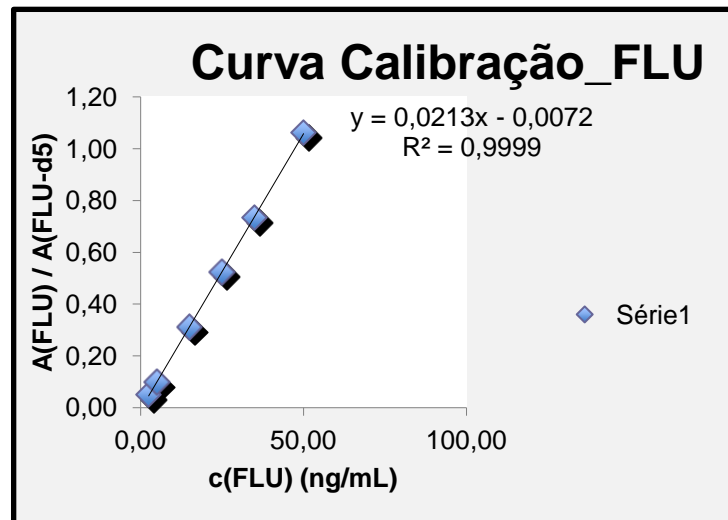


Figura 2: Curva de calibração em solvente relativa à FLU.

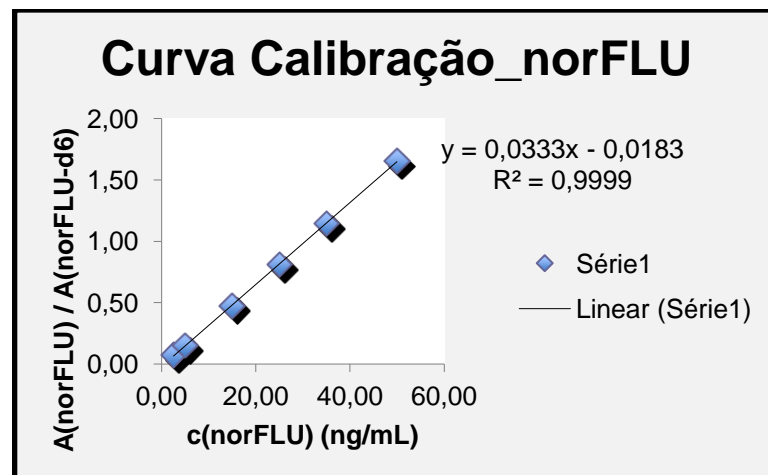


Figura 3: Curva de calibração em solvente relativa à norFLU.

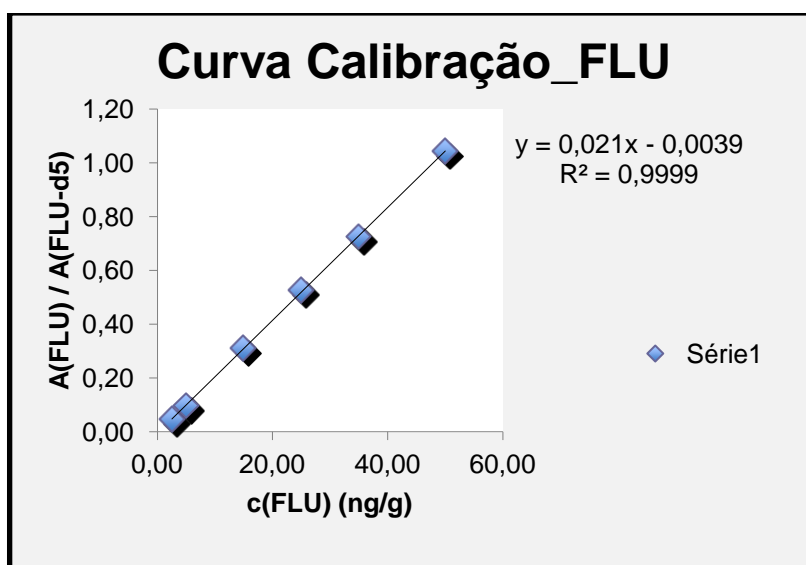


Figura 4: Curva de calibração na matriz relativa à FLU.

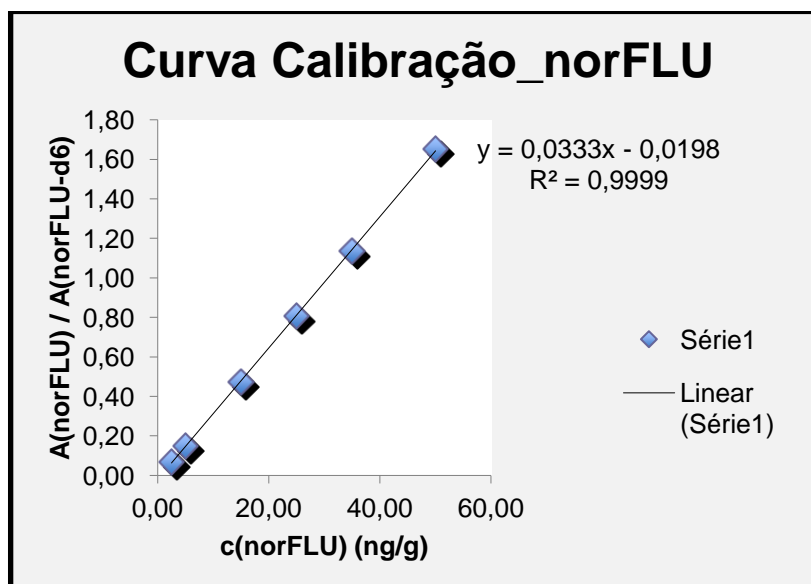


Figura 5: Curva de calibração na matriz relativa à norFLU.

#### II. 4. 3. 3. Exatidão e precisão

Os resultados das percentagens de recuperação nas amostras fortificadas foram semelhantes para a FLU e norFLU (tabela II). Os melhores resultados foram obtidos na fortificação de 50 ng g<sup>-1</sup>, com valores superiores a 99%. Para a fortificação 5 ng g<sup>-1</sup> as recuperações foram mais baixas, 90,55% para a FLU e 86,08% para norFLU.

Os valores mais altos de precisão intra-dia foram obtidos nos níveis de fortificação 5 ng g<sup>-1</sup> para a norFLU (2,3%). Quanto ao valor mais baixo destaca-se o nível de fortificação 25

ng g<sup>-1</sup> para a norFLU (0,1%).

Em relação aos valores de precisão inter-dia, o valor mais alto verificou-se para a norFLU (3,1%) com nível de fortificação 5 ng g<sup>-1</sup>. O valor mais baixo foi o de 0,3% para a norFLU a 50 ng g<sup>-1</sup>.

Tabela 11: valores relativos à exatidão e precisão da FLU e norFLU (n=3).

	Nível de fortificação (ng g <sup>-1</sup> )	Recuperação %	Precisão intra-dia (% RSD)	Precisão inter-dia (% RSD)
FLU	5	90,55	0,2	3,1
	25	91,31	0,8	0,8
	50	99,76	0,7	0,6
norFLU	5	86,08	2,3	1,5
	25	95,68	0,1	1,2
	50	99,66	1,9	0,3

#### II. 4. 4. Níveis de FLU e norFLU nas amostras

Das vinte amostras de controlo de mexilhão não foram detetados níveis de fluoxetina (tabela 12).

Para as amostras expostas durante 3 dias a 75 ng L<sup>-1</sup> de FLU e norFLU os resultados mostram uma frequência de acumulação de 70% para FLU e 10% para norFLU. O resultado mais elevado é de 5,48 ng g<sup>-1</sup> para a FLU. A concentração média para a FLU foi 3,61 ng g<sup>-1</sup> (tabela 13).

Para as amostras expostas durante 7 dias a 75 ng L<sup>-1</sup> de FLU e norFLU os resultados mostram um aumento da frequência de acumulação para 80% para a FLU e 50% para a norFLU, sendo o resultado mais elevado de 7,81 ng g<sup>-1</sup> para a FLU e 7,18 ng g<sup>-1</sup> para a norFLU. A concentração média para a FLU foi de 5,54 ng g<sup>-1</sup> e para a norFLU de 5,69 ng g<sup>-1</sup> (tabela 13).

Para as amostras expostas durante 15 dias a 75 ng L<sup>-1</sup> de FLU e norFLU os resultados mostram uma frequência de acumulação de 100% para FLU e para a norFLU. O resultado mais elevado para a FLU foi 24,81 ng g<sup>-1</sup> e para a norFLU foi 24,10 ng g<sup>-1</sup>. As concentrações médias foram de 9,31 ng g<sup>-1</sup> e 11,65 ng g<sup>-1</sup> para FLU para norFLU, respetivamente (tabela 13).

São poucos os estudos realizados para detetar e quantificar FLU e norFLU em mexilhões. Em um estudo realizado por Hazelton et al. (2013) em mexilhões, as frequências de acumulação de FLU foram de 84%. Outro estudo em que os mexilhões foram expostos a fluoxetina durante 72 horas a concentrações entre 0,64 e 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ , os valores de frequência de acumulação oscilaram entre 62,5% e 86,3% (Nentwig, 2007).

Os estudos que avaliam a presença de FLU e norFLU em mexilhões são escassos. Existem mais estudos sobre a presença destes compostos em peixes.

Chu e Metcalfe (2007) estudaram presença de FLU em peixe. Depois de otimizarem o método, as recuperações foram superiores a 85%. As análises mostraram que a norFLU estava presentes nos tecidos dos peixes em concentrações de 0,37  $\text{ng g}^{-1}$ .

Paterson e Metcalfe (2007) avaliaram a presença de FLU em peixes. Os peixes estiveram durante 7 dias a uma concentração de 0,64  $\text{mg L}^{-1}$  de FLU. A frequência de acumulação foi de 74% e 80% para FLU e norFLU.

Num estudo em peixes, realizado por Brooks et al. (2005) para detetar FLU e norFLU, foram observados resultados para norFLU de 0,11  $\mu\text{g g}^{-1}$  a 10,27  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As recuperações foram de 49 a 107%.



Tabela 12: Resultados obtidos nas amostras controlo de mexilhão (ng g<sup>-1</sup>).

Amostra	FLU	norFLU
<i>Controlo T0</i>		
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> #1	ND	ND
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> #2	ND	ND
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> #3	ND	ND
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> #4	ND	ND
C <sub>0</sub> t <sub>0</sub> #5	ND	ND
<i>Frequência</i>	-	-
<i>Intervalo</i>	-	-
<i>Média ± SD</i>	-	-
<i>Controlo T3</i>		
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> #1	ND	ND
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> #2	ND	ND
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> #3	ND	ND
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> #4	ND	ND
C <sub>1</sub> t <sub>0</sub> #5	ND	ND
<i>Frequência</i>	-	-
<i>Intervalo</i>	-	-
<i>Média ± SD</i>	-	-
<i>Controlo T7</i>		
C <sub>2</sub> t <sub>0</sub> #1	ND	ND
C <sub>2</sub> t <sub>0</sub> #2	ND	ND
C <sub>2</sub> t <sub>0</sub> #3	ND	ND
C <sub>2</sub> t <sub>0</sub> #4	ND	ND
C <sub>2</sub> t <sub>0</sub> #5	ND	ND
<i>Frequência</i>	-	-
<i>Intervalo</i>	-	-
<i>Média ± SD</i>	-	-
<i>Controlo T15</i>		
C <sub>3</sub> t <sub>0</sub> #1	ND	ND
C <sub>3</sub> t <sub>0</sub> #2	ND	ND
C <sub>3</sub> t <sub>0</sub> #3	ND	ND
C <sub>3</sub> t <sub>0</sub> #4	ND	ND
C <sub>3</sub> t <sub>0</sub> #5	ND	ND
<i>Frequência</i>	-	-
<i>Intervalo</i>	-	-
<i>Média ± SD</i>	-	-

Tabela 13: Resultados obtidos nas amostras de mexilhão expostas a FLU 75 ng L<sup>-1</sup>.

Amostra	Fluoxetina	Norfluoxetina
<b>FLU T3</b>		
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 1	ND	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 2	ND	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 3	3,11	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 4	4,44	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 5	2,52	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 6	5,48	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 7	3,44	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 8	2,68	3,06
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 9	ND	ND
IC – E <sub>1</sub> t <sub>3</sub> # 10	3,63	ND
<i>Frequência</i>	70 %	10 %
<i>Intervalo</i>	2,52 – 5,48	–
<i>Média ± SD</i>	3,61 ± 1,04	–
<b>FLU T7</b>		
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #1	3,25	ND
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #2	ND	ND
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #3	7,81	4,53
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #4	5,25	7,18
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #5	4,39	4,82
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #6	4,26	6,61
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #7	6,45	ND
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #8	5,85	5,33
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #9	ND	ND
IC – E <sub>2</sub> t <sub>7</sub> #10	7,06	ND
<i>Frequência</i>	80 %	50%
<i>Intervalo</i>	3,25 – 7,06	4,53 – 7,18
<i>Média ± SD</i>	5,54 ± 1,54	5,69 ± 1,15
<b>FLU T15</b>		
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #1	9,97	10,71
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #2	9,04	13,29
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #3	2,86	6,19
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #4	10,64	11,65
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #5	6,82	7,83
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #6	10,58	12,05
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #7	23,81	24,10
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #8	2,52	5,44
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #9	8,55	12,08
IC – E <sub>3</sub> t <sub>15</sub> #10	8,29	13,16
<i>Frequência</i>	100 %	100%
<i>Intervalo</i>	2,52 – 23,81	5,44 – 24,10
<i>Média ± SD</i>	9,31 ± 5,87	11,65 ± 5,21

## Conclusão

---

Foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação de fluoxetina e norfluoxetina. Os melhores resultados de recuperação foram verificados com o solvente de extração ACN e 0,1% de ácido fórmico. As colunas Oasis MCX apresentaram melhores resultados de recuperação do que as colunas Oasis HLB. A preparação da solução padrão em MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90) foi mais eficiente do que em MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40).

Com o método otimizado, as recuperações oscilaram entre 67,56 %, para norFLU a 50 ng mL<sup>-1</sup>, e 82,29 %, para norFLU-d6 a 5 ng mL<sup>-1</sup>.

Os resultados para as amostras expostas durante 3 dias a 75 ng L<sup>-1</sup> de fluoxetina mostram uma concentração média de  $3,61 \pm 1,04$  ng g<sup>-1</sup> para FLU e  $5,69 \pm 1,15$  ng g<sup>-1</sup> para norFLU. Para as amostras expostas durante 7 dias a média de concentração foi de  $5,54 \pm 1,54$  ng g<sup>-1</sup> para a FLU e de  $5,69 \pm 1,15$  para os norFLU. Os valores de concentração média para os 15 dias de exposição foram de  $9,31 \pm 5,87$  para a FLU e  $11,65 \pm 5,21$  para a norFLU.

É de extrema importância a continuação destes estudos para uma melhor avaliação da contaminação de bivalves, de modo a garantir a segurança alimentar.

## **Bibliografia**

- Adams SM. Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2003**, 9: 17–35.
- Alonso, S. G.; Catalá, M.; Maroto, R. R.; Rodríguez, J. L. G.; Miguel, A. G.; Valcárcel, Y. Pollution by Psychoactive Pharmaceuticals in the Rivers of Madrid Metropolitan Area (Spain). *Environ. Int.* **2010**, 36, 195–201.
- Arantes-Gonçalves, F; Coelho, R. - Depressão e tratamento, Apoptose, Neuroplasticidade e Antidepressivos. Porto. Serviço de Psiquiatria e Saúde Mental. Hospital de São João/Faculdade de Medicina do Porto. Artigo de revisão. *Acta. Med. Port.* **2006**, 19, 9–20.
- Ashton, D.; Hilton, M.; Thomas, K.V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* **2004**, 333, 167–184.
- Barclay, V. K. H.; Tyreforsa, N. L.; Johansson, M. I.; Pettersson, C. E. Trace Analysis of Fluoxetine and Its Metabolite Norfluoxetine. Part I: Development of a Chiral Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Wastewater Samples. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5587–5596.
- Batt, A. L.; Kostich, M. S.; Lazorchak, J. M. Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC/MS/MS. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5021–5030.
- Bound, J.P.; Voulvoulis, N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113, 1705–1711.
- Boxall, A. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization. Reports Vol. 5*, **2004**, 1111–1115
- Boxall, A., et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions. *Environ. Health Perspect.* **2012** 120: 1221–1229
- Boyd G, Reemtsma H, Grimm D, Mitra S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* **2003**, 311:135–149.
- Bringolf, B.; Heltsley M.; Newton T.; Eads C.; Fraley S.; Shea D.; Cope W. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, 29:1311–1318.

- Brooks, B. W.; Chambliss, K.; Stanley, J. K.; Ramirez, A.; Banks, K.; Johnson, R. D.; Lewis, R. J. Determination of Select Antidepressants in Fish from an Effluent-Dominated Stream. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 464–469.
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E. a, Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere.* **2003**, *52*, 135–42 (a).
- 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 (b).
- Bueno, M. J. M.; Aguera, A.; Gómez, M. J.; Hernando, M. D.; Reyes, J. F. G.; Alba, A. R. F. Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9372–9384.
- Calisto, V., Esteves, V.I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere.* **2009**, *77*, 1257–74.
- Camel V. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta B.* **2003**, *58*, 1177–1233.
- Chu, S.; Metcalfe, C. D. Analysis of PAR, FLU and norFLU in Fish Tissues Using Pressurized Liquid Extraction, Mixed Mode Solid Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*, 112–118.
- Clarke KR. Nonmetric multivariate analysis in community level ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*: 118–127.
- Crane M, Watts C, Boucard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total. Environ.* **2006**, *367*: 23–41.
- Cunningham, V.L.; Buzby, M.; Hutchinson, T.; Mastrocco, F.; Parke, N.; Roden, N. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 3456–3462.
- Daughton CG., Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *6*:907–38.
- Demeestere, K., Petrović, M., Gros, M., Dewulf, J., Van Langenhove, H., Barceló, D. Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based

solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 825–37.

- Eckstein, G; Sherk, G. “Alternative Strategies for Managing Pharmaceutical and Personal Care Products in Water Resources.” Texas, Texas Tech University Center for Water Law & Policy, **2011**, 806, 742–3990.

- Eurobarometer. Mental health part I: Report directorate general health and consumers survey co-ordinated by directorate general, communication; 2010, 1–64.

- Fent, K; Weston, A; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Review. Aquatic Toxicology*, **2005**, 122–125.

- Fick, J.; Söderström, H.; Lindberg, R. et al. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. and Chem.* **2009**, 12, 2522–2527.

- Fong, P. P.; Molnar, N. Norfluoxetine Induces Spawning and Parturition in Estuarine and Freshwater Bivalves. *Bulletin of Environ. Contamin. and Toxicology*. **2008**, 81, 6, 535–538.

- Fong, P.P. Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *Biol. Bull.* **1988**, 194, 143.

- Gaworecki, K.M., Klaine, S.J. Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquat. Toxicol.* **2008**, 88, 207–13.

- Gelsleichter, J., Szabo, N.J. Uptake of human pharmaceuticals in bull sharks (*Carcharhinus leucas*) inhabiting a wastewater-impacted river. *Sci. Total Environ.* **2013**, 456- 457, 196–201.

- Gómez E., Bachelot M., Boillot C., Munaron D., Chiron S., Casellas C., Fenet H. Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under controlled laboratory conditions. *Environ Sci Pollut Res.* **2012**, 19, 2561–2569.

- Gomez, M. J.; Bueno, M. J.; Lacorte, S.; Fernandez-Alba, A. R.; Aguera, A.; Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere.* **2007**, 66, 993–1002.

- Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Pollut.* **2013**, 173, 200–209.

- 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.

- Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Simultaneous Determination of Acidic, Neutral and Basic Pharmaceuticals in Urban Wastewater by Ultra High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 622–632.

- Gros M.; Petrović M.; Ginebreda A.; Barceló D.; Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Int* **2010**, 36, 15–26. [Internet, Jan [cit 2014 Mai 30]; disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819553>].

- Gros M.; Rodríguez-Mozaz S.; Barceló D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *J Chromatogr A* **2012**, 1248, 104–21. [Internet, Elsevier B.V.; Jul 27 [cit. 2014 Mai 30]; disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704668>].

- Gros, M.; Petrovic, M.; Barceló, D. Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 898–912.

- Gust, M.; Buronfosse, T.; Giamberini, L.; Ramil, M.; Mons, R., Garric, J. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ. Pollut.* **2009**, 157, 423–9.

- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten Lutzhoft, H.C.; Jørgensen, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment, a review. *Chemosphere.* **1998**, 36, 357–393.

- Hazelton, P.; Cope, W.; Mosher, S.; Pandolfo, T.; Belden J.; Barnhart, M.; Bringolf, R. Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis. *Science Total Environ.* **2013**, 94–100.

- Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett.* **2002**, 131, 5 –17.

- Henry, T.B., Kwon, J.-W., Armbrust, K.L., Black, M.C. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol Chem.* **2004**, 23, 2229–33.

- Henry, T.B., Black, M.C. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 54, 325–30.
- Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.* **2006**, 69, 334–342.
- Hordern, B. K.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. Multi-residue Method for the Determination of Basic/Neutral Pharmaceuticals and Illicit Drugs in Surface Water by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography–Positive Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1161, 132–145.
- Huerta-Fontela, M.; Galceran, M. T.; Ventura, F. Fast Liquid Chromatography–Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry for the Analysis of Pharmaceuticals and Hormones in Water Resources. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 4212–4222.
- INFARMED. Monitorization of the market. Consult. 18 Agot 2014 - Consult. 18 Agot 2014. Disponivel na Internet em  
:http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA\_MEDICAMENT/ Est\_Medicamento2008.pdf, **2008**
- Johnson, D.J.; Sanderson, H.; Brain, R. a, Wilson, C.J.; Solomon, K.R. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol. Environ.* **2007**, 67, 128–39.
- Jorgensen C.; Famme P.; Kristensen H.; Larsen PS.; Mohlenberg F.; Riisgard H. The bivalve pump. *Mar Ecol Prog Ser.* **1986**, 34, 69–77.
- Klosterhaus, S.; Grace, R.; Hamilton, C.; Yee, D. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environment International.* **2013**, 54 92–99.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci.* **2002**, Technol. 36, 1202–11.
- Kosjek, T.; Heath, E. Tools for Evaluating Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Residues as Environmental Contaminants. *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 832–847.
- Kreke, N., Dietrich, D.R. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit.*



*Rev. Toxicol.* **2008**, 38, 215–47.

- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Snider, R.G., Kagley, A.N., Varanasi, U. Environmental contaminants and the prevalence of hemic neoplasia (leukemia) in the common mussel (*Mytilus edulis* complex) from Puget Sound, Washington, U.S.A. *J. Invertebr. Pathol.* **1999**, 73, 135–146.
- Kwon, J.-W.; Armbrust, K. L. Aqueous Solubility, *n*-Octanol–Water Partition Coefficient, and Sorption of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors to Sediments and Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 81, 128–135.
- 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.
- Lajeunesse, A.; Smyth, S. A.; Barclay, S.; Sauvé, S.; Gagnon, C. Distribution of Antidepressant Residues in Wastewater and Biosolids Following Different Treatment Processes by Municipal Wastewater Treatment Plants in Canada. *Water Res.* **2012**, 46, 5600–5612.
- Langford, K. H.; Thomas, K.V. Determination of Pharmaceutical Compounds in Hospital Effluents and Their Contribution to Wastewater Treatment Works. *Environ. Int.* **2009**, 35, 766–770.
- López-Serna, R.; Pérez, S.; Ginebreda, A.; Petrović, M.; Barceló, D. Fully Automated Determination of 74 Pharmaceuticals in Environmental and Waste Waters by Online Solid Phase Extraction–Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2010**, 83, 410–424.
- López-Serna, R.; Petrović, M.; Barceló, D. Development of a Fast Instrumental Method for the Analysis of Pharmaceuticals in Environmental and Wastewaters Based on Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) Tandem Mass Spectrometry (MS/MS). *Chemosphere* **2011**, 85, 1390–1399.
- Luna, T.O., Plautz, S.C., Salice, C.J. Effects of 17 $\alpha$ ethynylestradiol, fluoxetine, and the mixture on life history traits and population growth rates in a freshwater gastropod. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, 32, 2771–8.
- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B. The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurized liquid

extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 9509–9521

- Metcalfe, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Struger, J. Distribution of Acidic and Neutral Drugs in Surface Waters Near Sewage Treatment Plants in the Lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, 22, 2881–2889.

- Metcalfe, C.; Chu, S.; Judt, C.; Li, H.; Ken, D. O.; Servos, M. R.; Andrews, D. M. Antidepressants and Their Metabolites in Municipal Wastewater, and Downstream Exposure in an Urban Watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, 29, 79–89.

- Nagarnaik, P.; Batt, A.; Boulanger, B. Source Characterization of Nervous System Active Pharmaceutical Ingredients in Healthcare Facility Wastewaters. *J. Environ. Manage.* **2011**, 92, 872–877.

- Nałecz-Jawecki, G. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. *Chemosphere.* **2007**, 70, 29–35.

- Nentwig, G. Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part II: The Antidepressant Drug Fluoxetine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, 52, 163–170.

- Ort, C.; Lawrence, M. G.; Reungoat, J.; Eaglesham, G.; Carter, S.; Keller, J. Determining the Fraction of Pharmaceutical Residues in Wastewater Originating from a Hospital. *Water Res.* **2010**, 44, 605–615.

- Pascoe, D.; Karntanut, W.; Müller, C.T. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* **2003**, 51, 521–8.

- Paterson, G., Metcalfe, C.D. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* **2007**, 74, 125–30.

- Péry, a R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere.* **2008**, 73, 300–4.

- Petrovic, M.; Cruz, H. M. S.; Barceló, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples. A review. *J. Chromatog. A.* **2005**, 1067, 1–14

- Petrovic, M.; Farré, M.; Lopez de Alda, M.; Perez, S.; Postigo, C.; Köck, M.; Radjenovic, J.; Gros, M.; Barceló, D. Recent Trends in the Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Organic Contaminants in Environmental Samples. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217,

4004–4017.

- Plano Nacional de Saúde (Direção Geral de Saúde, **2004**; vol. 2, pág. 85)
- Ramirez, A., Brain, R.A.S., Usenko, Sas., Mottaleb, M.A., O'donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D.I., Pitt, J.L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W., Chambliss, C.K. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish : results of a national pilot study in the united states. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, 28, 836 2587–2597.
- Ribani, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforeticos. *Quim. Nova.* **2004**, 27, 771–780.
- Richards, S.M., Cole, S.E. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicol.* **2006**, 15, 647–56.
- Rossi, D. T.; Zhang, N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J. Chromatogr.* **2000**, 885, 97–113.
- Ruhoy, I.; Daughton, C. The Afterlife of Drugs and the Role of PharmEcovigilance. *Drug Safety.* **2008**, 31, 1069–1082.
- Salgado R, Noronha JP, Oehmen A, Carvalho G, Reis MAM. Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. *Water Sci. Technol.* **2010**, 62 (12), 2862–71.
- Sanderson H, Johnson DJ, Reitsma T, Brain RA, Wilson CJ, Solomon KR. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2004**, 39, 158–183.
- Sanderson, H.; Johnson, D.; Wilson, C.; Brain, R.; Solomon, K. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae. ECOSAR screening. *Toxicol. Lett.* **2003**, 144, 383–395.
- 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.
- Silva, L.J.G., Lino, C.M., Meisel, L.M., Pena, A. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: an ecopharmacovigilance approach. *Sci. Total Environ.* **2012**, 437, 185–95.
- Silva, M - Remoção de compostos farmacêuticos de águas residuais por carvão activados. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, **2013**. Tese de

Mestrado.

- Silverman H.; Lynn J.; Dietz TH.; Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha*: structure and function of latero-frontal cirri. *Biol. Bull.* **1996**, 191, 42–54.
- Snyder, S.A. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. *Ozone-Sci. Eng.* **2008**, 30, 65–69.
- Sousa, M. A.; Gonçalves, C.; Cunha, E.; Hajslová, J.; Alpendurada, M. F. Cleanup Strategies and Advantages in the Determination of Several Therapeutic Classes of Pharmaceuticals in Wastewater Samples by SPE–LC–MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 807–822.
- Sousa, R., Gutiérrez, J.L., Aldridge, D.C. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biological Invasions.* **2009** 11 (10), 2367–2385.
- Spooner, D.E., Vaughn, C.C. Context-dependent effects of freshwater mussels on stream benthic communities. *Freshwater Biology.* **2006**, 51, 1016–1024.
- Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* **2007**, 69, 9–16.
- Tankersley, R.A., Dimock, R.V. The effect of larval brooding on the respiratory physiology of the freshwater unionid mussel *Pyganodon cataracta*. *American Midland Naturalist.* **1993**, 130, 146–163.
- Van der Ven, K., Keil, D., Moens, L.N., Van Hummelen, P., Van Remortel, P., Maras, M., De Coen, W. Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere.* **2006**, 65, 1836–1845.
- Vasskong, T.; Berger, U.; Samuelsen, J.; Kallenborn, R.; Jensen, E. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Sewage Influent and Effluent from Tromsø, Norway. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1115, 187–195.
- Vaswani, M.; Linda, F.K.; Ramesh, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **2003**, 27, 85–102.
- Weigel, S.; Berger, U.; Jensen, E.; Kallenborn, R.; Thoresen, H.; Hühnerfuss, H. Determination of Selected Pharmaceuticals and Caffeine in Sewage and Seawater from Tromsø/Norway with Emphasis on Ibuprofen and Its Metabolites. *Chemosphere* **2004**, 56, 583–592.

- Weinberg, J.R., Leavitt, D.F., Lancaster, B.A., Capuzzo, J.M. Experimental field studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the induction and effect of hematopoietic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* **1997** 69, 183–194.
- Wu, C.; Witter, J. D.; Spongberg, A. L.; Czajkowski, K. P. Occurrence of Selected Pharmaceuticals in an Agricultural Landscape, Western Lake Erie Basin. *Water Res.* **2009**, 43, 3407–3416.
- Zwir-Ferenc A, Bizuik M. Solid phase extraction technique-trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ Stud.* **2006**, 15, 677–690.