



Susana Filipa Neto do Nascimento

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UM EFLUENTE MUNICIPAL COMO UMA CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO ALTERNATIVO AO TESTE LETAL COM PEIXES

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Susana Filipa Neto do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UM  
EFLUENTE MUNICIPAL COMO UMA  
CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DE UM  
ENSAIO ALTERNATIVO AO TESTE LETAL COM  
PEIXES**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,  
Área de especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente**

Professora Doutora Maria João Moreno

Doutora Elsa Teresa Rodrigues

**Setembro 2017**

**Universidade de Coimbra**



# Agradecimentos

A realização deste projeto permitiu-me adquirir novos conhecimentos e evoluir, tanto a nível profissional, como pessoal. No entanto, a finalização desta etapa não teria sido possível sem o apoio de diversas pessoas, às quais gostaria de agradecer.

À Professora Doutora Maria João Moreno, pela orientação, transmissão de conhecimentos, apoio, amizade, conselhos, paciência e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas. Tudo isto foi essencial para o desenvolvimento deste projeto, muito obrigada!

À Doutora Elsa Rodrigues, pela paciência e disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas, orientação, transmissão de conhecimentos e amizade incansáveis durante todo o trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelas correções e sugestões para melhorar o trabalho, pelas palavras de incentivo que me permitiram ultrapassar os momentos mais difíceis da realização deste projeto. A sua ajuda foi sem dúvida essencial. Muito obrigada, principalmente pela oportunidade de trabalhar na área da ecotoxicologia aquática que foi sem dúvida uma experiência fantástica.

A todas as pessoas que pertencem ao grupo do Professor Doutor Miguel Pardal por me terem recebido tão bem, pela boa disposição e simpatia.

À Doutora Martina Costa, pela oportunidade que me proporcionou de poder realizar uma parte do meu projeto científico na Globalab, por toda a ajuda e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas.

A todas as pessoas que trabalham na Globalab, por me terem recebido bem, pela disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas e ensinamentos transmitidos, especialmente à técnica Patrícia. À Jéssica, pela boa disposição, simpatia, amizade e companhia na hora do almoço.

Aos meus amigos e colegas de curso, um muito obrigado pelo vosso apoio e incentivo neste percurso. De forma especial, agradeço à Rita e à Maria. Obrigada pelos conselhos e apoio incondicional, pela amizade, por estarem sempre disponíveis para me ajudar e por me fazerem sorrir quando os dias não corriam tão bem. À Patrícia e à Liliana, agradeço a amizade, ajuda, todos os momentos de diversão e as palavras de força no momento certo.

Ao Bruno, um agradecimento especial por todo o apoio, carinho, compreensão e pelas palavras de força, em todos os momentos.

Por último, mas não menos importante, à minha família, especialmente aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós, por acreditarem sempre em mim, por todo o incentivo, carinho e força que me deram.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e contribuíram para a realização deste projeto, muito obrigado.

Parte deste trabalho foi realizado no âmbito do Projeto *FishFree* (PTDC/AAG-TEC/4966/2014), com o apoio da Fundação para Ciência e a Tecnologia (FCT) através de financiamento nacional (3599-PPCDT) e cofinanciamento do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (POCI-01-0145-FEDER-016875), no âmbito do Acordo de Parceria PT2020. Foi ainda financiado no âmbito do Acordo de Parceria PT2020 e COMPETE 2020 pelo Projeto Estratégico do Centro de Ecologia Funcional (UID/BIA/04004/2013) e pelo Projeto Estratégico do Centro de Química de Coimbra (Projecto Nº 007630 UID/QUI/00313/2013).

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

# Índice

Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Capítulo 1 - Introdução	3
1.1 Estação de tratamento de águas residuais do Choupal	9
1.2 Caracterização físico-química	10
1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	13
1.3.1 Extração em fase sólida	14
1.3.2 Validação do método analítico	16
Capítulo 2 - Experimental	21
2.1 Metodologia de amostragem	21
2.2 Caracterização físico-química das amostras	23
2.2.1 Sólidos suspensos totais	24
2.2.2 Carência química do oxigénio	24
2.2.3 Carência bioquímica do oxigénio	25
2.2.4 Dureza total	25
2.2.5 Azoto amoniacal	26
2.2.6 Nitratos e azoto total	27
2.2.7 Fosfatos e fósforo total	29
2.2.8 Determinação do sulfametoxazol e carbamazepina	29
2.2.8.1 Reagentes e padrões analíticos	29
2.2.8.2 Preparação das soluções	30
2.2.8.3 Preparação das amostras	30
2.2.8.4 Condições cromatográficas	31

2.2.8.5 Validação do método analítico	32
2.3 Toxicidade ao nível da célula	36
2.3.1 Manutenção da linha celular H9c2	36
2.3.2 Ensaio da Sulforrodamina B	37
2.4 Análise estatística	39
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	45
3.1 Caracterização físico-química das amostras	45
3.2 Determinação do sulfametoxazol e carbamazepina	55
3.2.1 Validação do método analítico	57
3.2.2 Testes de recuperação e de reutilização para a extração em fase sólida	61
3.2.3 Análise das amostras do Rio Mondego e efluente	64
3.3 Toxicidade ao nível da célula	67
Capítulo 4 - Conclusão	73
Bibliografia	77
Anexos	83
Anexo A – Recipientes para colheita de águas residuais e superficiais	83
Anexo B – Estudo dos fatores de ponderação para a carbamazepina e sulfametoxazol	85
Anexo C – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	87



# Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

CBO<sub>5</sub> - Carência Bioquímica de Oxigênio ao fim de 5 dias

CBZ – Carbamazepina

CQO - Carência Química de Oxigênio

CV – Coeficiente de Variação

DAD – Detector com matriz de diodos (do inglês, Diode Array Detector)

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DQA - Diretiva Quadro da Água

ER – Erro Relativo

ETA - Estação de Tratamento de Água

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography)

IC – Intervalo de Confiança

IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% da multiplicação celular (do inglês, inhibitory concentration)

ICH – Conferência Internacional sobre a Harmonização (do inglês, International Conference on Harmonisation)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (do inglês, Organisation for Economic Cooperation and Development)

OD – Oxigénio Dissolvido

PBS – Solução salina de tampão fosfato (do inglês, Phosphate buffered saline)

PET - Politereftalato de Etileno

QC – Quociente de Risco

SMZ - Sulfametoxazol

SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês, Solid Phase Extraction)

SRB - Sulforrodamina B

SST - Sólidos Suspensos Totais

u.p. – ultrapura

VLE – Valor Limite de Emissão

VMA – Valor Máximo Admissível

# Resumo

A ciência tem sugerido inúmeras estratégias para o desenvolvimento de ensaios alternativos ao uso de peixes em ecotoxicologia aquática. No entanto, a maior parte dos estudos diz respeito à comparação da toxicidade de substâncias ativas de fármacos e pesticidas e trabalhos com amostras recolhidas em meio natural, como sejam os efluentes, têm sido esquecidos. Deste modo, este projeto de mestrado pretende contribuir para a validação de um ensaio *in vitro* alternativo ao uso de peixes em ensaios letais para estimar a toxicidade aquática de um efluente municipal. O trabalho científico teve como principal objetivo comparar os resultados da caracterização química de amostras que representam um gradiente natural de um efluente municipal com os resultados de citotoxicidade obtidos usando a linha celular H9c2. Para se chegar ao objetivo principal foram delineados vários objetivos específicos: 1) definir qual o efluente municipal a estudar; 2) caracterizar quimicamente o gradiente natural do efluente municipal definido em 1; 3) desenvolver ensaios de toxicidade com a linha celular H9c2 usando as amostras definidas em 1 e, 4) relacionar os resultados de toxicidade obtidos em 3 com a caracterização química feita em 2.

A área de estudo escolhida foi um troço do rio Mondego, junto à cidade de Coimbra, onde foram recolhidas quatro amostras de água superficial, e a ETAR do choupal, responsável pelo tratamento do efluente municipal da cidade, onde foi recolhida uma amostra de efluente, imediatamente antes da sua descarga em meio recetor, o rio Mondego. As quatro amostras recolhidas no rio Mondego englobam uma amostra considerada de referência por ter sido recolhida a montante da descarga do efluente, junto à ETA da cidade de Coimbra; uma amostra recolhida em meio recetor junto à descarga do efluente; e duas amostras recolhidas a 300 e 600 metros a jusante da descarga do efluente. Além dos parâmetros sílica, condutividade elétrica, dureza total e fosfatos, os parâmetros físico-químicos analisados foram alguns dos recomendados pela Diretiva Quadro de Água e listados no *Anexo XVIII* e *Anexo XXI* do Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto: temperatura, oxigénio dissolvido, taxa de saturação de oxigénio, carência química de oxigénio, carência bioquímica de oxigénio, pH, sólidos suspensos totais, nitratos, azoto amoniacal, azoto total e fósforo total. Uma vez que a ETAR escolhida recebe

águas residuais de um Hospital Central, também se recorreu à análise em HPLC com detecção por DAD para a quantificação de alguns compostos orgânicos específicos, a carbamazepina e o sulfametoxazol.

A caracterização físico-química das amostras analisadas mostrou para a maioria dos parâmetros o seguinte gradiente: Referência → 600 metros → 300 metros → Meio Recetor → Efluente. No entanto, os resultados de toxicidade ao nível da célula só conseguiram discriminar as amostras com maior evidência de contaminação (Efluente, Meio Recetor e 300 metros) das potencialmente menos contaminadas (Referência e 600 metros).

Palavras-chave: Ecotoxicologia aquática; Ensaio alternativo; Efluentes municipais; Caracterização físico-química; Ensaio da Sulforrodamina B; H9c2; IC<sub>50</sub>.

# Abstract

The science has been suggested innumerable strategies for the development of alternative assays to replace standard fish lethality tests in aquatic ecotoxicology. However, most of the studies compare the toxicity of active substances of drugs for human use or pesticides, and studies with effluent samples have been forgotten. Thus, this master's project intends to contribute for the validation of an alternative *in vitro* assay for the regulatory fish lethal test by estimating the aquatic toxicity of a municipal effluent. The main objective of this scientific study was to compare the results of the chemical characterization of samples representing a natural gradient of a municipal effluent with the cytotoxicity results obtained using the H9c2 cell line. In order to achieve this main goal, several specific objectives were outlined: 1) defining which municipal effluent to study; 2) characterizing chemically the natural gradient of the municipal effluent defined in 1; 3) developing toxicity tests with the H9c2 cell line using the samples defined in 1, and 4) linking the toxicity results obtained in 3 with the chemical characterization made in 2.

The study area chosen was a section of the Mondego River, near the city of Coimbra, where four samples of surface water were collected, and the WWTP of the Choupal, which is responsible for the treatment of the municipal effluent from the city, where an effluent sample was collected, immediately before being discharged into the effluent receiving water, the Mondego River. The four samples collected in the Mondego River include the reference sample since it was collected upstream the effluent discharge point, near the ETA of the city; a sample collected in the effluent receiving water next to the discharge of the effluent; and two samples collected at 300 and 600 meters downstream from the effluent discharge. Besides to the parameters silica, electrical conductivity, total hardness and phosphates the physicochemical parameters analyzed were some of those recommended by the Water Framework Directive and listed in *Annex XVIII* and *Annex XXI* of Decree-Law 236/98 of 1 August: temperature, dissolved oxygen, oxygen saturation rate, chemical oxygen demand, biochemical oxygen demand, pH, total suspended solids, nitrates, ammoniacal nitrogen, total nitrogen and total phosphorus. Since the chosen WWTP receives waste water from a Central Hospital, it was also

used HPLC analysis with DAD to quantify of some specific organic compounds, carbamazepine and sulfamethoxazole.

The physical-chemical characterization of the analyzed samples showed for the majority of parameters the following gradient: Reference → 600 meters → 300 meters → effluent receiving water → effluent. Regarding the cell toxicity results, it can only discriminate the samples with the highest contamination level (effluent, receiving medium and 300 meters) from the potentially least contaminated (reference and 600 meters).

Keywords: Aquatic ecotoxicology; Alternative assays; Municipal effluents; Physicochemical characterization; Sulforhodamine B assay; H9c2; IC<sub>50</sub>.

# Capítulo 1

---

## Introdução





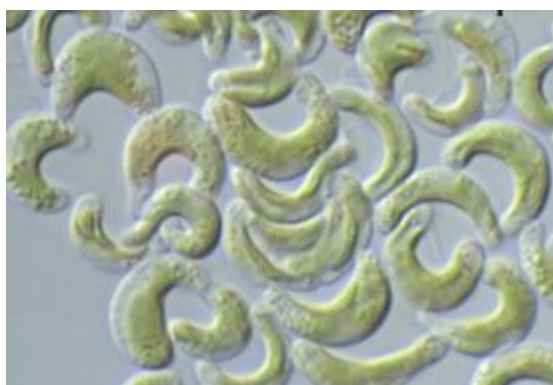
# Capítulo 1

## Introdução

O aumento da população humana, bem como do desenvolvimento industrial têm levado a um aumento da utilização dos cursos de água, quer para captação de água para consumo, quer para descarga de efluentes, originando a degradação da qualidade da água e potenciais desequilíbrios ecológicos. De forma a evitar esses desequilíbrios, é importante determinar a qualidade das águas superficiais e a toxicidade das águas residuais descarregadas nos cursos de água. No nosso país, é avaliado o cumprimento do disposto no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, que estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Este Decreto-Lei integra vários anexos, como sejam o *Anexo XVIII*, que estabelece o valor limite de emissão (VLE) na descarga de águas residuais e o *Anexo XXI*, que determina os valores paramétricos para se atingir os objetivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais. No caso das águas residuais, a sua avaliação global deve integrar ensaios ecotoxicológicos complementando o exigido no referido Decreto-Lei, baseado unicamente numa avaliação química e microbiológica. Esta avaliação global está a ser estudada no âmbito da União Europeia e é já obrigatória em vários estados membros, mas até à data ainda não foi transposta para Portugal.

Toxicidade é a capacidade de uma substância provocar efeitos adversos nos organismos com os quais entra em contacto. Estes efeitos podem manifestar-se a diferentes níveis da organização biológica, desde o nível molecular e celular, até ao nível das populações e das comunidades; e podem ir desde alterações comportamentais, de crescimento ou reprodução, entre outras, até à morte dos organismos.<sup>1, 2</sup> No caso da ecotoxicologia aquática, e de modo a obtermos a toxicidade a vários níveis tróficos e funcionais, realizam-se ensaios regulamentares que avaliam os efeitos adversos em algas (exemplo, Figura 1), invertebrados aquáticos

(exemplo, Figura 2) e peixes (exemplo, Figura 3) sempre que existe um pedido de autorização para comercialização de um novo composto (por exemplo, pesticida ou fármaco) ou em avaliações de risco ambiental no compartimento água.<sup>3, 4</sup> Estes ensaios são considerados convencionais e a elaboração e implementação de protocolos para estes ensaios é realizada por vários órgãos internacionais, como por exemplo *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), e têm como objetivo uniformizar os ensaios ecotoxicológicos. Estes ensaios laboratoriais são realizados em condições específicas e controladas utilizando organismos-teste, que são expostos a diferentes concentrações do composto ou amostra de água ou efluente a estudar. A relação entre a concentração a que um organismo é exposto e o efeito produzido sobre ele é conhecida como relação dose-resposta. Esta relação permite quantificar a toxicidade dos compostos, permitindo a avaliação de risco dos mesmos nos vários compartimentos ambientais. A representação da relação dose-resposta tipicamente obtida em testes de toxicidade é ilustrada na Figura 4. No final, e para a maior parte dos ensaios, são quantificados os efeitos tóxicos, determinando por um método estatístico o  $EC_{50}$ <sup>7</sup> (do inglês, *effect concentration*), que corresponde à concentração que originou 50% do efeito estudado (inibição da atividade enzimática, inibição do crescimento, mortalidade, etc). Deste modo, permite-se a comparação à escala global dos resultados para diferentes compostos, bem como a sensibilidade de diferentes organismos ao mesmo composto.



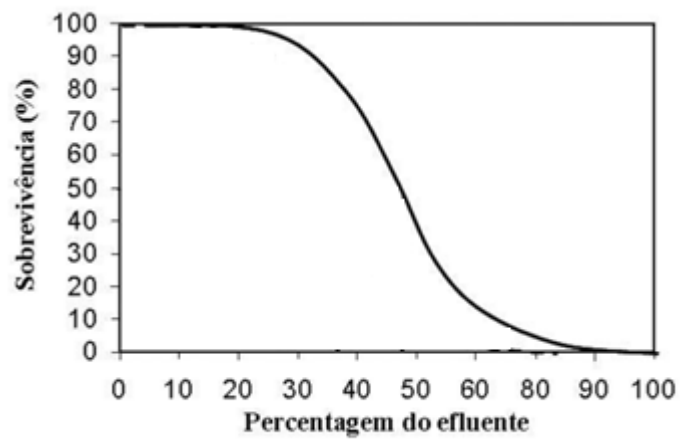
**Figura 1** - Exemplo de uma alga, a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Retirado de 5.



**Figura 2** - Exemplo de um invertebrado aquático, a *Daphnia magna*. Retirado de mblaquaculture.



**Figura 3** - Exemplo de um peixe, o *Danio rerio* (peixe zebra). Retirado de 6.



**Figura 4** - Representação da relação dose-resposta obtida em testes de toxicidade para um efluente. Adaptado de 8.

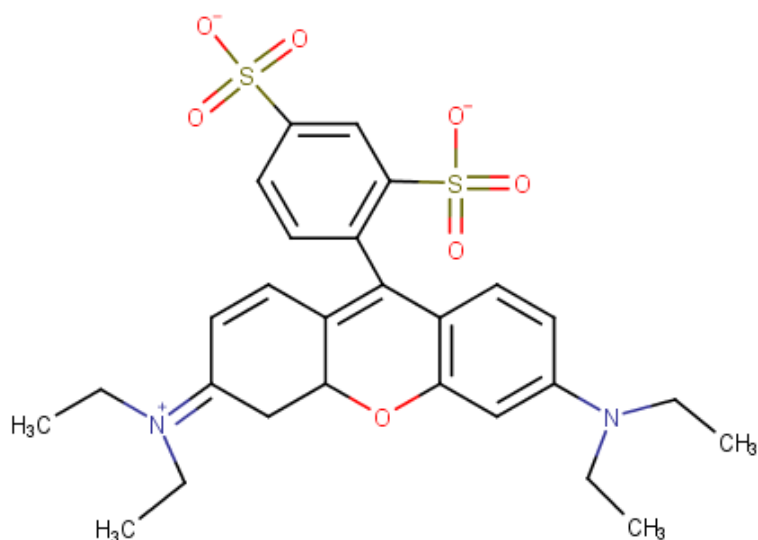
Os peixes são considerados bons modelos para a avaliação do estado ecológico de um rio, porque estão presentes em quase todos os tipos de ecossistemas aquáticos, possuem elevada sensibilidade e, por exemplo, o seu ciclo de vida é melhor conhecido relativamente a outros organismos aquáticos.<sup>9</sup> São os principais representantes dos consumidores secundários aquáticos e, por isso, são muito utilizados em ensaios ecotoxicológicos, sendo uma das espécies modelo, o *Danio rerio* (nome comum peixe zebra, Figura 3).<sup>10, 11</sup> No entanto, a utilização de peixes em avaliações ecotoxicológicas tem sido motivo de discussões bioéticas, devido ao facto de serem um animal vertebrado, considerado senciente. O princípio dos 3Rs - Reduce (reduzir), Refine (refinar) e Replace (substituir) está, assim, na base da criação de Legislação Europeia recente, a Diretiva 2010/63/EU (Diretiva 86/609/EEC), que regula e protege a utilização de animais vivos em investigação científica.<sup>12</sup> Este princípio tem sido utilizado com o objetivo de reduzir o número de peixes utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, minimizar a sua dor e desconforto, e proporcionar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*. Relativamente ao número de peixes utilizados na Europa, os dados disponíveis são muito escassos. No entanto, o último relatório da Comissão Europeia, referente ao ano 2011, informa que os animais de sangue frio, onde se incluem os peixes, constituem o segundo grupo de animais mais utilizados para fins científicos, verificando-se um aumento de 310 307 peixes em relação a 2008.<sup>13</sup> Em Portugal, segundo os últimos dados publicados, em 2014, pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) foram utilizados 8005 peixes, sendo estes os segundos animais mais utilizados para fins experimentais.<sup>14</sup>

O desenvolvimento de ensaios alternativos é um caminho que os cientistas estão neste momento a percorrer, sendo a utilização de linhas celulares uma possível alternativa *in vitro* que ultrapassa questões éticas.<sup>15</sup> As linhas celulares são células cultivadas em laboratório que apresentam a característica de imortalidade, ou seja, são células que em condições ótimas de cultura se podem multiplicar indefinidamente. Estas podem ser tumorais ou não tumorais, bem como, por exemplo, derivadas de peixes, insetos ou mamíferos.

A substituição do teste regulamentar com peixes pela utilização de um ensaio *in vitro* com células só é possível se forem encontradas correlações fortes entre os resultados dos ensaios alternativo e convencional e se as sensibilidades absolutas de ambos forem

semelhantes. Uma correlação elevada, quanto à sensibilidade relativa, entre os resultados de citotoxicidade *in vitro* com linhas celulares derivadas de peixe e os LC<sub>50</sub> (do inglês, *lethal concentration*, concentração que provoca 50% de mortalidade) com peixes já foi confirmada.<sup>16</sup> No entanto, quando a correspondência é considerada em termos absolutos, as células de peixes, até agora, provaram ser menos sensíveis do que o teste letal com peixes.<sup>17</sup> Contudo, um estudo recente revelou que, de várias linhas celulares utilizadas, derivadas de peixes e de mamíferos, e de várias respostas celulares avaliadas, a linha celular de mamífero H9c2 (células derivadas de cardiomiócito de ratinho com características não tumorais) e o ensaio da Sulforrodamina B (SRB), apresenta sensibilidades absolutas idênticas em ensaios *in vivo* e *in vitro* para o fungicida azoxistrobina.<sup>18</sup> Este estudo concluiu ter sido encontrada uma alternativa ética adequada e credível para substituir o ensaio letal com peixes para a azoxistrobina. Deste modo, a linha celular H9c2 e o ensaio da SRB estão, neste momento, a ser utilizados para se comprovarem as sensibilidades absolutas para outros compostos.

O ensaio da SRB mede a inibição da proliferação celular através de uma quantificação colorimétrica, a 545 nm, das celulares coradas com o pigmento SRB. A SRB (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, Figura 5) é um corante aniônico brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfônicos e dois grupos amina, solúvel em água. Sob condições ácidas, estes dois grupos sulfônicos são capazes de se ligar aos resíduos dos aminoácidos das células que foram fixadas com ácido acético 1% em metanol e o corante dissocia-se em condições básicas. Este ensaio é considerado um método sensível, simples, rápido e apresenta estabilidade na cor.<sup>19</sup>



**Figura 5** - Estrutura da Sulforrodamina B na sua forma ionizada mais abundante a pH neutro.

A utilização de linhas celulares em ensaios ecotoxicológicos apresenta várias vantagens relativamente ao ensaio com peixes. Além de ser eticamente correto, é um ensaio mais barato e simples de preparar, não obriga à produção contínua de peixes especificamente para fins experimentais em biotérios licenciados, nem à acreditação dos investigadores para o seu manuseamento. A quantidade de resíduos finais de tratamento obrigatório é também mais reduzido. Por outro lado, qualquer ensaio ecotoxicológico que utilize peixes obriga a um pedido de autorização e pagamento prévios à DGAV.

Este projeto de mestrado pretende contribuir para o desenvolvimento de um ensaio *in vitro* alternativo ao uso de peixes em ensaios letais, usando a linha celular H9c2 e o ensaio da SRB para testar um gradiente natural de toxicidade: uma amostra de efluente e quatro amostras de água de rio. O principal objetivo é verificar se o gradiente químico obtido pela análise físico-química das amostras e avaliado de acordo com a legislação Portuguesa é captado ao nível da célula utilizando o ensaio de toxicidade SRB e a linha celular H9c2. Para isso, foi escolhida uma área de estudo que engloba um troço do Rio Mondego, com uma parte a montante e uma parte a jusante da descarga do efluente da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Choupal (Coimbra).

## 1.1 Estação de tratamento de águas residuais do Choupal

A ETAR do Choupal (Figura 6) descarrega o seu efluente no Rio Mondego (meio recetor). Este rio possui a segunda maior bacia hidrográfica de Portugal, que ocupa uma área de 6 645 km<sup>2</sup> e abrange 48 concelhos.<sup>20</sup> Esta ETAR localiza-se junto à cidade de Coimbra e foi inaugurada em 1992.<sup>21</sup> Além dos esgotos da zona urbana, recebe águas provenientes da zona norte e de uma parte da zona sul do concelho de Coimbra.



Figura 6 - ETAR do Choupal. Retirado de águasdocontrolitoral.

A ETAR tem a capacidade de tratar águas residuais de uma população aproximadamente equivalente a 213 mil habitantes e a capacidade de tratamento é, em média, de 36 000 m<sup>3</sup> por dia.<sup>21</sup> O efluente quando chega à ETAR é sujeito a um pré-tratamento na mesma, onde há a separação dos resíduos sólidos de maiores dimensões, areias e gorduras. De seguida, o efluente é sujeito a um tratamento primário que tem como objetivo a remoção parcial de sólidos suspensos e de matéria orgânica suspensa, ou seja, ocorre a sedimentação das partículas mais pesadas e a formação das lamas. Por último, o efluente é sujeito a um tratamento secundário, ou biológico, que consiste na remoção da matéria orgânica por processos biológicos aeróbios ou anaeróbios com a formação de biomassa microbiana. No fim, o efluente clarificado é descarregado para o Rio Mondego através de uma conduta.<sup>22, 23</sup>

## 1.2 Caracterização físico-química

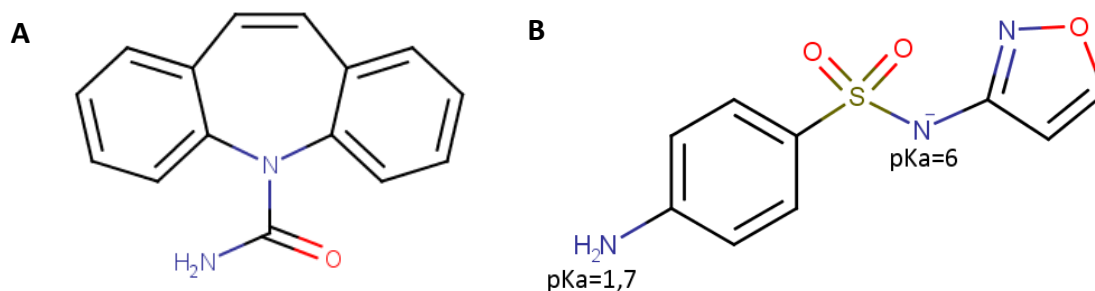
Para a caracterização físico-química das cinco amostras foram utilizados, além dos parâmetros sílica (mg/L Si), que possibilita o estudo da variação da produção primária na área de estudo; condutividade elétrica ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), que mostra a capacidade de uma solução aquosa para transportar corrente elétrica e depende da presença e concentração total de íões; dureza total (mg/L  $\text{CaCO}_3$ ), que reflete a presença de íões cálcio e magnésio na água; e fosfatos ( $\text{PO}_4$ , mg/L  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), que permitem avaliar a qualidade da água quanto ao enriquecimento por este nutriente; alguns dos parâmetros recomendados pela Diretiva Quadro de Água (DQA) e listados no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxigénio dissolvido (OD, mg/L), taxa de saturação de oxigénio (% de saturação), carência química de oxigénio (CQO, mg/L  $\text{O}_2$ ), carência bioquímica de oxigénio ( $\text{CBO}_5$ , mg/L  $\text{O}_2$ ), pH, sólidos suspensos totais (SST, mg/L), nitratos ( $\text{NO}_3$ , mg/L  $\text{NO}_3$ ), azoto amoniacal ( $\text{NH}_4$ , mg/L  $\text{NH}_4$ ), azoto total (AT, mg/L N) e fósforo total (FT, mg/L P).

A temperatura da água é um das características físicas mais importantes, uma vez que esta pode influenciar reações químicas e bioquímicas, processos biológicos e a solubilidade de muitos compostos químicos, o que pode provocar efeitos nos organismos aquáticos, sendo por isso um dos parâmetros avaliados.<sup>24, 25</sup> A concentração do oxigénio dissolvido na água é importante para a vida dos peixes e outros organismos aquáticos, sendo o objetivo ambiental de qualidade mínima para as águas superficiais de pelo menos 50% de saturação.<sup>26</sup> A carência química de oxigénio mede a quantidade de oxigénio necessária para oxidar a matéria orgânica presente numa água. Assim, a carência química de oxigénio é proporcional à matéria orgânica presente na amostra.<sup>27</sup> A carência bioquímica de oxigénio é um parâmetro que mede a quantidade de oxigénio consumido por microrganismos aeróbios para a degradação da matéria orgânica biodegradável numa água durante 5 dias, a  $20^{\circ}\text{C}$ .<sup>28</sup> Assim, quanto maior a quantidade de matéria orgânica biodegradável nas amostras, maior será o consumo de oxigénio durante o período de incubação, logo, maior será o valor da  $\text{CBO}_5$ . A diferença entre  $\text{CBO}_5$  e CQO é que a última refere-se à oxidação da matéria orgânica através da utilização de reagentes químicos, enquanto na  $\text{CBO}_5$  essa oxidação é realizada por microrganismos. Deste modo, a comparação dos valores obtidos para a  $\text{CBO}_5$  com os valores de CQO permite avaliar a biodegradabilidade



das águas. A medição do pH é bastante importante, pois além de influenciar a fisiologia das diversas espécies aquáticas, também influencia a solubilidade de várias substâncias. Quando os valores de pH se encontram acima ou abaixo dos limites estipulados por lei para águas superficiais, pode ocorrer o desaparecimento de espécies aquáticas.<sup>28</sup> O azoto total é uma medida da concentração total de azoto presente na água, esteja este associado a espécies químicas de natureza inorgânica ou orgânica. O azoto é maioritariamente encontrado no meio aquático sob a forma de nitratos e azoto amoniacal, sendo estes compostos azotados provenientes principalmente da decomposição da matéria orgânica, de efluentes urbanos e industriais e do lixiviamento de solos.<sup>27, 28</sup> O fósforo pode encontrar-se na água sob a forma de ortofosfatos e fosfatos. Os fosfatos nas águas superficiais podem ser provenientes de adubos, uma vez que são usados como fertilizantes, e de efluentes domésticos ou industriais. O fósforo é um dos nutrientes essenciais para o crescimento de algas e em elevadas quantidades pode contribuir para a eutrofização.<sup>27, 28</sup>

Uma vez que a cidade de Coimbra tem um hospital central de referência nacional, analisaram-se por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com detetor de díodos (HPLC-DAD) também dois fármacos, a carbamazepina (CBZ) e o sulfametoxazol (SMZ). Estes dois fármacos foram escolhidos uma vez que, segundo a Agência Portuguesa do Ambiente, foram os dois compostos encontrados em maior quantidade num estudo recente feito em amostras recolhidas no Rio Mondego.<sup>29</sup> A CBZ é um medicamento antiepilético utilizado para o tratamento da epilepsia.<sup>30</sup> Também é utilizada no tratamento de algumas doenças neurológicas e em certas situações psiquiátricas, como por exemplo, perturbações de humor bipolares.<sup>31</sup> O uso da CBZ também é indicada para síndrome da abstinência alcoólica, na neuropatia diabética e diabetes insípida central.<sup>31</sup> O SMZ é um antibiótico utilizado no tratamento de infeções do trato urinário, trato respiratório superior e inferior, por exemplo, em situações de bronquite, faringite, sinusite e otite, e do sistema gastrointestinal.<sup>32</sup> A Figura 7 representa a estrutura química da CBZ e do SMZ e a Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas.<sup>33</sup>



**Figura 7** - Estrutura da carbamazepina (A) e do sulfametoxazol (B), na sua forma ionizada mais abundante a pH neutro (o valor de pKa dos grupos ionizáveis [33, 34] encontra-se indicado junto dos mesmos).

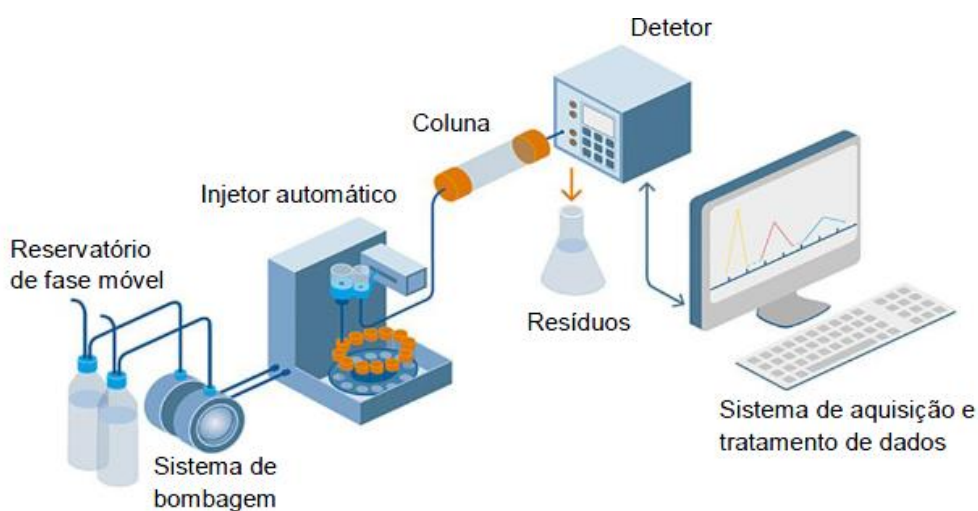
**Tabela 1** - Propriedades físico-químicas da carbamazepina e do sulfametoxazol.<sup>33</sup>

Substância	Fórmula Química	Massa Mola (g/mol)	pKa	logP
Carbamazepina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	236,27		2,47
Sulfametoxazol	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	253,28	1,7 <sup>34</sup> ;6 <sup>33</sup>	0,89

O consumo de medicamentos para o tratamento de diversas doenças tem aumentado nas últimas décadas.<sup>35</sup> Consequentemente, o aparecimento destes compostos em águas residuais tem aumentado e, a sua eliminação durante os processos de tratamento nas ETARs não se tem verificado.<sup>33</sup> Assim, uma das preocupações atuais é a avaliação dos níveis destes, e de outros compostos orgânicos, nas águas superficiais por terem potenciais efeitos adversos nos organismos aquáticos. A caracterização do risco destes dois compostos nos sistemas aquáticos pode ser feita calculando a razão do valor de exposição máximo encontrado nas águas dos rios pelo valor PNEC (do inglês *predicted no effect concentration*), chamado Quociente de Risco (RQ, do inglês Risk Quotient). Quando RQ >1 considera-se haver possíveis efeitos adversos no compartimento água resultantes da utilização dos fármacos e mais estudos que comprovem essa possibilidade devem ser delineados pelas Agencias Ambientais ou pela comunidade científica.

### 1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de HPLC permite separar, identificar e quantificar com elevada precisão e sensibilidade uma variedade de compostos, presente em vários tipos de matrizes complexas. Nesta técnica os analitos movem-se através da fase estacionária por ação da fase móvel e é a interação entre estes que determina a separação dos compostos. Assim, os compostos fracamente retidos pela fase estacionária são eluídos em primeiro lugar. Já os compostos que estabelecem interações mais fortes com a fase estacionária são mais tempo retidos por esta. Atualmente, esta é uma das técnicas de separação mais utilizadas em química analítica.<sup>36</sup> Na Figura 8 está representado um esquema genérico de um sistema de HPLC e os seus componentes principais: bomba de alta pressão, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, detetor e um sistema de registo e processamento de dados.



**Figura 8** – Esquema representativo dos principais componentes de um sistema de HPLC. Retirado de 37.

A fase móvel é bombeada, a elevadas pressões, num determinado fluxo (mL/min) até à coluna. A composição da fase móvel pode variar gradualmente ao longo da eluição, designando-se por eluição em gradiente, ou pode ser constante, designando-se por eluição isocrática.<sup>38</sup> O sistema de injeção, automático ou manual, transfere a amostra que se pretende separar para a fase móvel, que a transporta até à coluna cromatográfica (fase estacionária), onde se efetua a separação dos analitos de interesse de acordo com a força relativa das

interações estabelecidas com a fase móvel e fase estacionária.<sup>36, 39</sup> Os analitos são eluídos da coluna e passam por um detetor. Por fim, os dados obtidos pelo detetor são enviados para um sistema de aquisição de dados, e são tratados num *software* apropriado, obtendo-se um cromatograma que é a representação gráfica da intensidade do sinal em função do tempo.<sup>36, 39</sup>

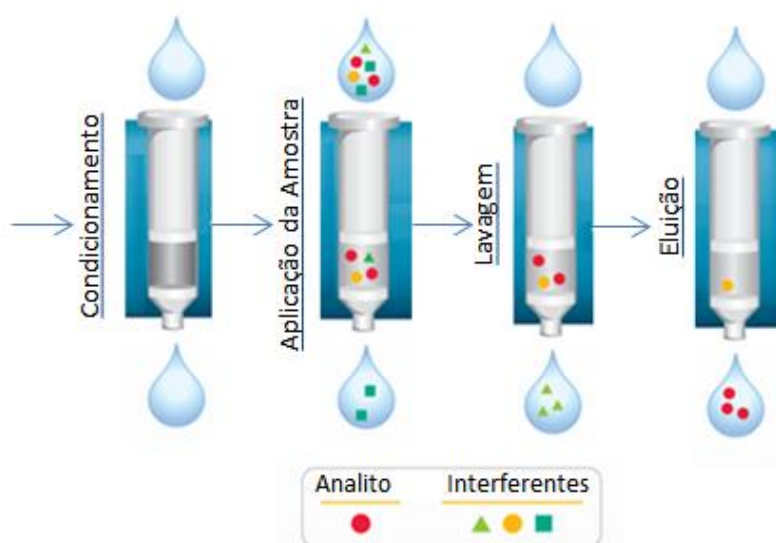
A técnica de HPLC pode ser dividida em cromatografia de fase normal ou cromatografia de fase reversa. Estes dois tipos de cromatografia podem ser distinguidos com base nas polaridades das fases estacionária e móvel.<sup>38</sup> Na cromatografia de fase normal, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, enquanto, que na fase reversa verifica-se o oposto. Assim, na cromatografia de fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos pela fase estacionária do que os compostos polares, pelo que o composto mais polar irá ser eluído primeiro.<sup>36, 39</sup> A fase estacionária, geralmente, consiste em grupos orgânicos, por exemplo, grupos octadecilo (C<sub>18</sub>), ligados quimicamente à sílica.<sup>40</sup> Desta forma, a separação eficiente dos compostos de uma mistura resulta da combinação de uma fase estacionária e móvel adequada.

### 1.3.1 Extração em fase sólida

Uma vez que todas as amostras recolhidas para o presente trabalho são consideradas uma matriz complexa, a técnica de HPLC exige um passo prévio de tratamento das amostras. Este pré-tratamento tem como objetivo aumentar a concentração dos analitos de interesse presentes na matriz e remover, tanto quanto possível, os compostos interferentes presentes nas amostras.<sup>41, 42</sup> Neste trabalho, a técnica utilizada foi Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). Atualmente, esta é uma das técnicas mais utilizadas, permitindo obter amostras com concentrações que podem ser eficientemente analisadas por HPLC.<sup>41, 42</sup>

A SPE é uma técnica de separação sólido-líquido onde a capacidade de separação está relacionada com a afinidade do analito pela fase estacionária em comparação com a matriz da amostra. Um cartucho típico utilizado para a extração é de polipropileno e contém cerca de 50 a 500 mg de fase estacionária, com 40 a 60 µm de tamanho de partícula imobilizada entre dois filtros com tamanho de poro 20 µm.<sup>42</sup> A maioria das fases estacionárias é composta por grupos

orgânicos C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub> ligados quimicamente à sílica ou por polímeros.<sup>43</sup> O procedimento experimental da SPE contém quatro etapas (Figura 9): 1) acondicionamento da fase estacionária; 2) aplicação da amostra, onde os analitos e às vezes alguns interferentes ficam retidos pela fase estacionária, dependendo das interações estabelecidas com a mesma; 3) lavagem do cartucho para eliminar interferentes da matriz que possam ter ficado retidos no passo anterior, utilizando para isso um solvente que permita arrastar os interferentes, mas não ao analitos e; 4) eluição dos analitos retidos na fase estacionária.<sup>42, 44, 45</sup>

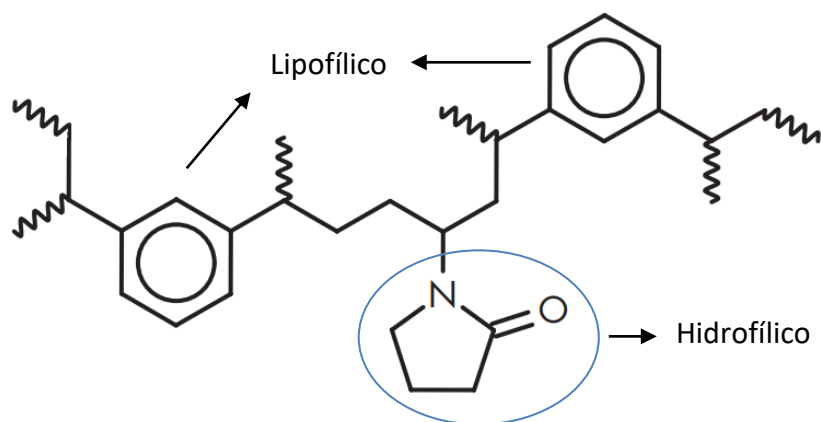


**Figura 9** - Etapas do procedimento experimental da SPE. Adaptado de 46.

A estrutura química do analito e a composição da matriz da amostra são dois pontos a ter em conta quando se seleciona a fase estacionária. Deste modo, as interações que se estabelecem entre os componentes da amostra e a fase estacionária podem ser apolares, polares ou iónicas.<sup>42, 45</sup> A fase estacionária pode ser de fase normal, quando é mais polar do que a amostra, ou de fase reversa, quando se verifica o oposto. Assim, a retenção do analito, na fase normal, ocorre por interações hidrofílicas (ligação hidrogénio e interação dipolo-dipolo) e, na fase reversa, por interações hidrofóbicas do tipo Van der Waals.<sup>42, 45</sup>

No presente trabalho, as colunas utilizadas para a SPE foram as Oasis HLB (fase reversa) compostas por um polímero macroporoso poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)

representado na Figura 10. Este polímero possui propriedades lipofílicas e hidrofílicas e é estável para todo o intervalo de pH.



**Figura 10** – Estrutura química do enchimento das colunas Oasis HLB. Adaptado de Waters.

### 1.3.2 Validação do método analítico

A validação de um método analítico tem como objetivo avaliar a qualidade, consistência e fiabilidade dos resultados obtidos, bem como a sua eficiência.<sup>47</sup> Desta forma, o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para o fim a que se destina, ou seja, para a quantificação de um analito numa matriz. Um laboratório deve validar um método analítico criado ou desenvolvido pelo próprio laboratório e métodos que sofrem modificações nos seus parâmetros.<sup>48</sup> A validação de um método analítico depende do tipo de método utilizado e passa pela avaliação de alguns dos seguintes parâmetros: seletividade e especificidade; gama de trabalho; linearidade; limites de deteção e quantificação; precisão e exatidão.<sup>49, 50</sup>

No presente trabalho, os parâmetros considerados para efetuar a validação do método foram: gama de trabalho e linearidade, limite de deteção e limite de quantificação, precisão e exatidão. A linearidade é definida como a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em estudo, dentro da gama de trabalho escolhida.<sup>50</sup> O limite de deteção (LD) representa a menor quantidade de analito, presente numa amostra, que é possível detetar, mas que não é necessariamente quantificável.

Já o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração de analito, presente numa amostra, que pode ser quantificado com uma determinada exatidão e precisão.<sup>49</sup> A precisão, segundo a guia Relacre, é “um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas”. A Conferência Internacional sobre a Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonisation*) define a exatidão de um procedimento analítico como “a aproximação da concordância entre o valor obtido através do novo método e um valor de referência, aceite como verdadeiro”.<sup>49, 50</sup>

No capítulo 2 serão detalhados os procedimentos metodológicos para a determinação dos parâmetros já mencionados e que irão caracterizar quimicamente as amostras.





# Capítulo 2

---

## Experimental



## Capítulo 2

### Experimental

#### 2.1 Metodologia de amostragem

Foram efetuadas duas saídas de campo, uma em Dezembro de 2016 e outra em Maio de 2017. Em ambas foram recolhidas cinco amostras: quatro amostras de água do rio Mondego (água superficial) e uma amostra do efluente da ETAR do Choupal. A amostra considerada de referência (R) foi recolhida a montante da ETAR, junta à Estação de Tratamento de Água (ETA) da Boavista, em Coimbra, mais concretamente, na Praia do Rebolim (Figura 11), enquanto as restantes amostras foram recolhidas na área envolvente à ETAR do Choupal. Uma das amostras foi recolhida no efluente, amostra E, e outra na zona de descarga do efluente no rio Mondego, amostra MR (Meio Recetor, Figura 12). As restantes duas amostras foram recolhidas a jusante da descarga do efluente, a 300 (Figura 13) e 600 metros, amostras 3 e 4, respetivamente.



**Figura 11** - Ponto de amostragem onde foi recolhida a amostra de Referência – Praia do Rebolim.



**Figura 12** – Ponto de amostragem Meio Recetor.



**Figura 13** – Ponto de amostragem a 300 metros a jusante da descarga do efluente.

Para a recolha de algumas das amostras foi utilizado um copo de recolha acoplado a uma haste telescópica (Figura 14). Nas cinco situações, as amostras foram primeiro recolhidas para um balde de  $\approx 7,0$  L e, só depois de homogeneizadas, foram distribuídas pelos vários recipientes de acordo com os parâmetros a analisar. Para os parâmetros físico-químicos foram utilizados recipientes de PET (Politereftalato de Etileno) e vidro, cumprindo o recomendado no Anexo A, e para os ensaios com linhas celulares foram utilizados frascos de vidro âmbar autoclavados. As amostras para estes ensaios foram filtradas utilizando filtros estéreis de 0,2

$\mu\text{m}$  (Milipore Millex-FG). Para o transporte até aos vários laboratórios, todos os recipientes com as amostras foram acondicionados em malas térmicas refrigeradas.



Figura 14 – Copo de recolha acoplado a uma haste telescópica.

## 2.2 Caracterização físico-química das amostras

Para a caracterização físico-química das amostras foram selecionados vários parâmetros, a maioria dos quais listados no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto. Foram medidos *in situ*, com o auxílio de sondas de campo WTW, os parâmetros físico-químicos temperatura, condutividade e oxigénio dissolvido. O parâmetro pH foi medido assim que as amostras chegaram ao laboratório. A análise de sílica (mg/L) foi realizada no Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra utilizando o kit Nanocolor Silica (Test 1-48 Macherey-Nagel). A sílica dissolvida reage com o molibdato de amónio, em meio ácido (pH 1.2), dando um composto amarelo, o ácido molibdosilícico. Este é reduzido pela adição de ácido aminonaftolsulfónico, originando um complexo de cor azul, suscetível de dosagem espectrofotométrica a 690 nm. Os parâmetros SST (mg/L), CQO (mg/L O<sub>2</sub>), CBO<sub>5</sub> (mg/L O<sub>2</sub>), dureza total (mg/L CaCO<sub>3</sub>), azoto amoniacal (mg/L NH<sub>4</sub>), nitratos (mg/L NO<sub>3</sub>), azoto total (mg/L N), fosfatos (mg/L P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e fósforo total (mg/L P) foram determinados no laboratório da Globalab – Ensaios Químicos e Microbiológicos, que é um laboratório que atua no mercado das análises microbiológicas e físico-químicas de águas, alimentos e ambiente desde 2004. Foi ainda realizada, no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, a determinação de CBZ ( $\mu\text{g/L}$ ) e SMZ ( $\mu\text{g/L}$ ) por HPLC.

### 2.2.1 Sólidos suspensos totais

Os sólidos suspensos totais correspondem aos sólidos em suspensão presentes na água e removidos por filtração.<sup>51</sup> A concentração de SST foi determinada após a filtração da amostra e a sua secagem. Previamente foi determinado o peso da caixa de petri e do filtro (VWR 516-0861). Depois de homogeneizada, inicia-se a filtração da amostra. Retira-se o filtro com o resíduo e seca-se em estufa a  $104\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante pelo menos 3 horas. Arrefece-se em exsiccador e pesa-se. O teor de SST é dado pela Equação 1.

$$SST = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{V} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$m_1$  é a massa, em mg, da cápsula com o filtro;

$m_2$  é a massa, em mg, da cápsula com o filtro e resíduo;

$V$  é o volume, em mL, utilizado no ensaio.

### 2.2.2 Carência química do oxigênio

A CQO foi determinada pelo método do dicromato utilizando o kit COD Cell Test (Merck 114541). Neste método, as amostras são oxidadas com uma solução sulfúrica de dicromato de potássio, a elevada temperatura, na presença do catalisador sulfato de prata e sulfato de mercúrio. A interferência mais comum é a do ião cloreto, pois este tem a capacidade de reagir com o ião prata, inibindo desta forma a atividade catalítica do sulfato de prata. Desta forma, as interferências causadas podem ser reduzidas, complexando o cloreto com sulfato de mercúrio. O ião dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) oxida a matéria orgânica contida na amostra, resultando na variação do crómio do estado hexavalente (VI) para o estado trivalente (III). A concentração de  $\text{Cr}^{3+}$  (verde) é determinada num espectrofotómetro de UV/Visível a 605 nm (concentrações até 1500 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ) e a concentração de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  é determinada a 445 nm (concentrações até 150 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ). A concentração CQO presente na amostra é depois calculada com recurso à curva de

calibração realizada previamente, com a solução padrão de hidrogenoftalato de potássio, uma vez que é equivalente à matéria orgânica oxidada.

### 2.2.3 Carência bioquímica do oxigênio

Para a determinação da  $CBO_5$ , as amostras foram colocadas em frascos de incubação preenchidos totalmente. Procedeu-se à determinação do teor de oxigênio dissolvido da amostra à temperatura de  $20 \pm 2$  °C no equipamento robotizado, semiautomático SKALAR – SP100. Os frascos foram fechados e colocados numa incubadora a  $20 \pm 1$  °C durante 5 dias, como referido anteriormente. Decorrido este tempo, procede-se novamente à determinação do teor em oxigênio dissolvido. O valor de  $CBO_5$  é dado pela Equação 2.

$$CBO_5 = (D_1 - D_5) \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

$D_1$  corresponde ao oxigênio dissolvido lido no primeiro dia;

$D_5$  corresponde ao oxigênio dissolvido lido no quinto dia após a incubação da amostra;

Quando a carência bioquímica de oxigênio é maior do que a disponibilidade de oxigênio dissolvido numa amostra, devem ser realizadas diluições antes da incubação. Como os microorganismos que oxidam a matéria orgânica necessitam de nutrientes como azoto, fósforo, magnésio e cálcio, estes são adicionados à água de diluição.

### 2.2.4 Dureza total

A dureza total da água foi determinada por titulação com EDTA 0,01 M (Merck 109992). Inicialmente, medem-se 50 mL da amostra para um *erlenmeyer*, adicionam-se 2,0 mL da solução tampão (6,75 g  $NH_4Cl$  (VWR 21236.291), 57 mL de  $NH_3$  (Merck 105432) e diluem-se a 100 mL com água destilada) e 3 gotas de solução de negro de eriocromo T (0,5 g de  $C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$  (Merck 103170), 100 g de  $C_6H_{15}NO_3$  (VWR 28746.290) em 100 mL de álcool

etílico a 94°). De seguida, titula-se com a solução titulante Na<sub>2</sub>-EDTA 0,01 M até à viragem da cor vermelho-vinoso a azul. A dureza total da água é dada pela Equação 3.

$$\text{Dureza (mg/L CaCO}_3) = \frac{1000 \times V_1}{V} \quad (\text{Equação 3})$$

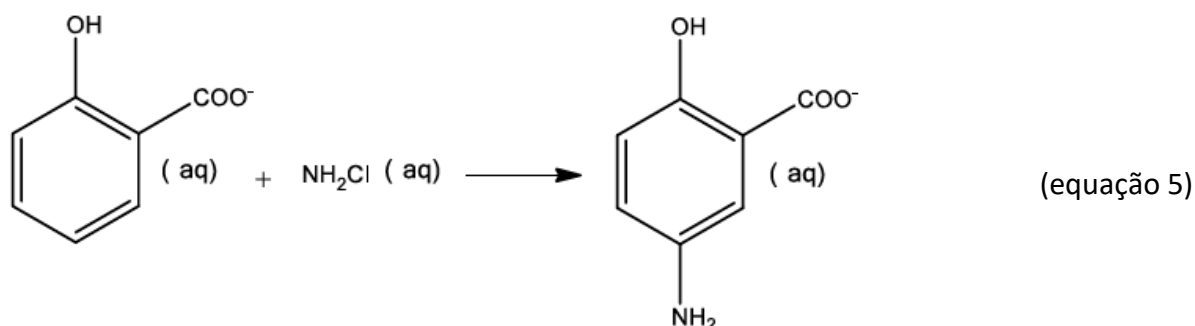
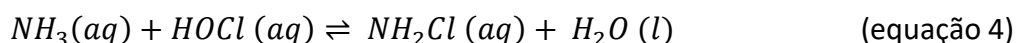
Onde:

$V$  é o volume da amostra utilizada (mL);

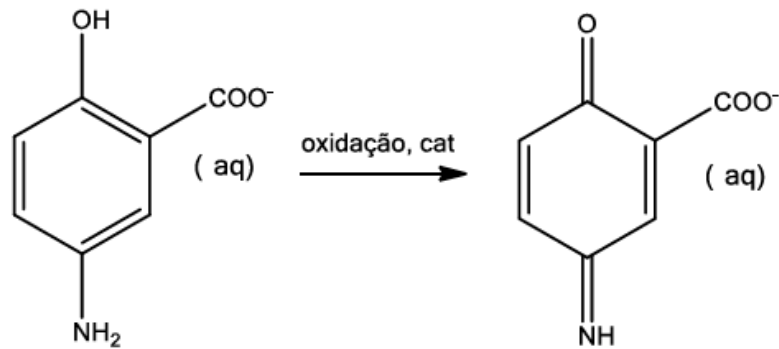
$V_1$  é o volume da solução titulante gasta na titulação (mL).

## 2.2.5 Azoto amoniacal

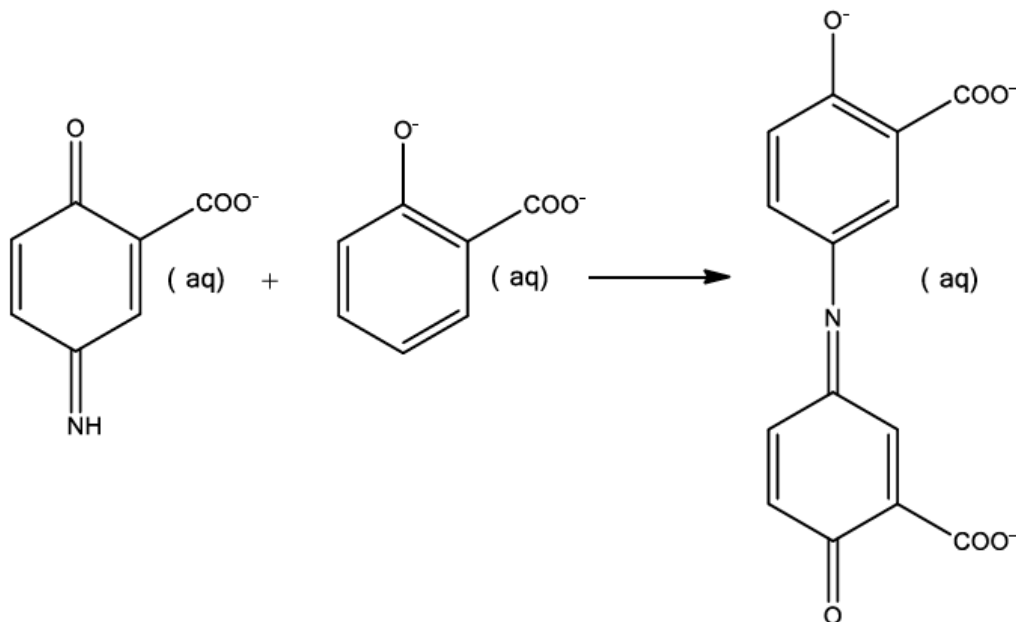
O azoto amoniacal das amostras foi determinado por fluxo contínuo segmentado. A amostra é diluída com uma solução tampão, composta por tártaro de sódio e potássio e citrato de sódio, para complexar os catiões. O amoníaco reage com o ácido hipocloroso para formar a monocloramina (equação 4). A monocloramina reage com o salicilato de sódio originando o 5-aminossalicato (equação 5). Ocorre a oxidação do 5-aminossalicato catalisada pelo nitropussiato de sódio (equação 6). Por fim, gera-se um complexo de cor verde e a cor desenvolvida é lida por colorimetria a 660 nm (equação 7).







(equação 6)

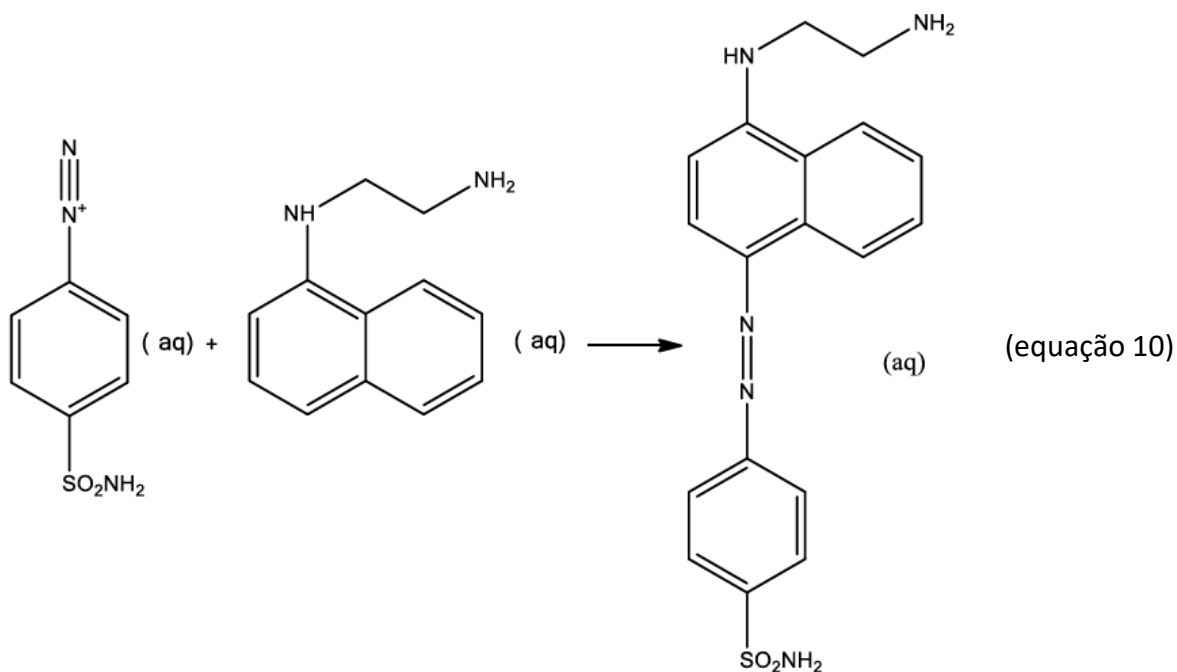
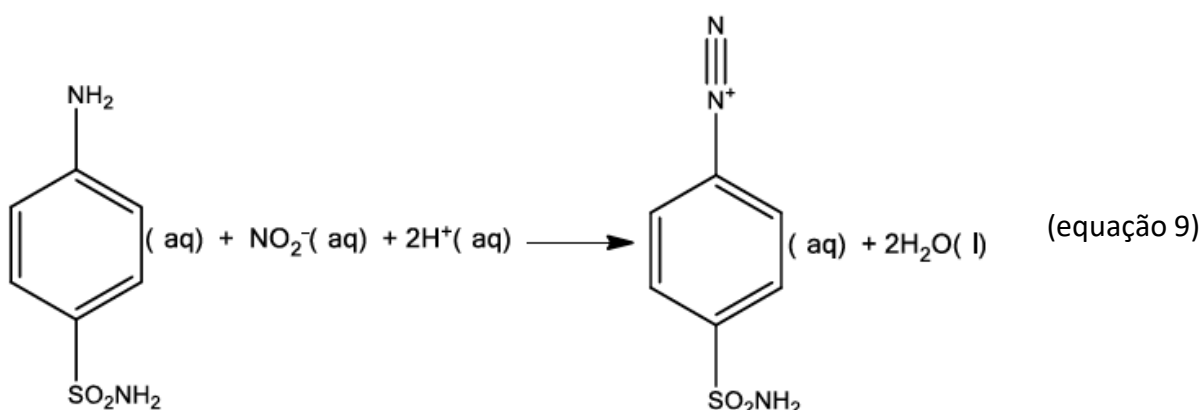
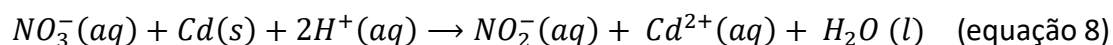


(equação 7)

## 2.2.6 Nitratos e azoto total

Os nitratos presentes nas amostras foram determinados por fluxo contínuo segmentado. No procedimento, a amostra é diluída num tampão de cloreto de amónio (pH 8,2) e bombeada através de uma coluna de cádmio, onde ocorre a redução do ião nitrato a ião

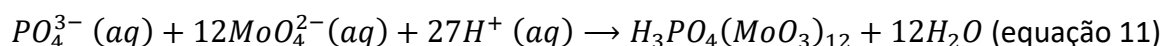
nitrito (equação 8). O nitrito (originalmente existente na amostra e o reduzido do nitrato) é determinado por diazotização com sulfanilamida (equação 9) e N-(1-naftil)-etilenodiamida dihidroclórica formando um composto corado (equação 10). A absorvância é medida a 540 nm e é proporcional à concentração de nitrito e nitrato na amostra. As concentrações de nitrato são obtidas por subtração dos valores de nitrito, que foram determinados separadamente sem o procedimento da passagem pela coluna de cádmio.



O azoto total também foi determinado por fluxo contínuo segmentado. Inicialmente ocorre a digestão da amostra com persulfato, em meio alcalino, que consiste na oxidação de todos os compostos de azoto a nitrato. De seguida, procede-se da mesma forma anteriormente descrita.

## 2.2.7 Fosfatos e fósforo total

Os fosfatos presentes nas amostras foram também determinados por fluxo contínuo segmentado. Os iões ortofosfato presentes na amostra reagem com o molibdato, em meio ácido, formando o heteropoliácido 12-molibdofosfórico (equação 11). Este ácido é reduzido pelo ácido ascórbico a um complexo de cor azul intensa, cuja absorvância é medida a 880 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de iões fosfato.



O fósforo total também foi determinado por fluxo contínuo segmentado. Inicialmente ocorre a digestão da amostra com persulfato, em meio ácido, que consiste na oxidação de todos os compostos de fósforo a ortofosfato. De seguida, procede-se da mesma forma anteriormente descrita.

## 2.2.8 Determinação do sulfametoxazol e carbamazepina

### 2.2.8.1 Reagentes e padrões analíticos

Foram utilizados dois padrões analíticos, a carbamazepina (Sigma-Aldrich S7507) e o sulfametoxazol (Sigma-Aldrich 94496). Os reagentes utilizados foram: metanol (Sigma-Aldrich 34860), acetonitrilo (Carlo Erba 412392000), acetato de amónio (Sigma-Aldrich A-8920) e ácido acético (Sigma-Aldrich 537020).

### **2.2.8.2 Preparação das soluções**

Inicialmente procedeu-se à determinação do comprimento de onda máximo de absorção da CBZ e SMZ e, para isso, foram preparadas duas soluções individuais com a concentração de 0,1 mM que foram analisadas utilizando um espectrofotómetro de UV/Visível (Spectronic Unicam UV 500), obtendo-se um espectro de absorção para cada composto.

Seguidamente foi preparada uma solução padrão stock de 500 µM resultante da mistura da CBZ e SMZ em metanol, que foi armazenada a 4 °C. A partir desta solução foram preparadas as restantes diluições em metanol-água (25:75 v/v), correspondentes à gama de concentrações (0,03; 0,06; 0,12; 0,3; 0,6 e 5 µM) utilizadas para a construção da curva de calibração.

### **2.2.8.3 Preparação das amostras**

O método utilizado para a preparação das amostras e SPE foi adaptado do método apresentado por Gros et al. (2006)<sup>33</sup> e otimizado para o presente trabalho. Todas as soluções padrão (100 mL) e amostras (500 mL) foram previamente filtradas com filtros de membrana de nylon de 0,45 µm (Filtres Fioroni 0464A00023), de modo a remover partículas que poderiam bloquear o fluxo através da coluna. Procedeu-se posteriormente à extração e concentração dos analitos utilizando cartuchos Oasis HLB (Waters 186000116), que foram previamente acondicionados com a passagem de 5,0 mL de metanol seguidos de 5,0 mL de água desionizada a um fluxo de 1,0 mL/min. As amostras passaram através do cartucho a um fluxo de 10 mL/min obtido mediante aplicação de vácuo no recipiente recetor. Posteriormente, o cartucho foi lavado com 5,0 mL de água desionizada e seco sob vácuo durante 15 a 20 minutos, para remover o excesso de água. A eluição foi realizada com 8,0 mL de metanol (4 x 2 ml) a um fluxo de 1,0 mL/min. No fim, o extrato foi seco num evaporador rotativo e reconstituído em 1,0 mL de metanol-água (25:75 v/v).

## 2.2.8.4 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada utilizando um equipamento de HPLC constituído por um degaseificador Agilent 1100 série G 1379A, uma bomba quaternária Agilent 1100 série G1310A, um forno de coluna Agilent 1200 série G1316A, um injetor manual de amostras HP 1100 série G1328 A e um detetor de díodos (DAD) Agilent 1200 série G1315D. O *software* utilizado foi o ChemStation B.03.01. A coluna utilizada foi uma Zorbax ODS C18 (250 x 4.6 mm, 5 µM, Agilent Technologies) com uma pré-coluna Zorbax ODS C18 (12.5 x 4.6 mm, 5 µM, Agilent Technologies).

O método utilizado para a separação da CBZ e SMZ foi adaptado do método apresentado por Gros et al. (2006)<sup>33</sup>. As condições cromatográficas e o gradiente de eluição usado para a análise das amostras encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3, respetivamente.

**Tabela 2** - Condições cromatográficas do método de HPLC usado.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
<b>Fase móvel</b>	Eluente A - Acetonitrilo /Metanol (2:1 v/v) Eluente B –Acetato de Amónio 5 mM/ Ácido Acético a pH 4,7
<b>Fluxo</b>	1 mL/min
<b>Temperatura do forno da coluna</b>	25 °C
<b>Volume de injeção</b>	200 µL
<b>Tempo de análise</b>	52 min
<b>Modo de Separação</b>	Fase Reversa

**Tabela 3** - Programa de gradiente utilizado para análise das amostras.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	15	85
3	15	85
25	95	5
32	95	5
37	15	85
52	15	85

A CBZ e o SMZ presentes nas amostras foram identificados com base no tempo de retenção, por comparação com os tempos obtidos para os padrões analíticos. Após a identificação, a quantificação dos compostos presentes nas amostras foi realizada com base na curva de calibração.

### 2.2.8.5 Validação do método analítico

Neste trabalho os parâmetros considerados para efetuar a validação do método foram: (A) gama de trabalho e linearidade, (B) limite de detecção e limite de quantificação, (C) precisão e (D) exatidão.

#### A) Gama de trabalho e linearidade

Antes de proceder ao estudo da linearidade, deve-se avaliar a homogeneidade das variâncias para decidir qual o modelo de calibração mais adequado. Assim, recorre-se ao teste de Fisher (F), no qual o valor experimental ( $F_{exp}$ ) é calculado através da Equação 12.

$$F = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde:

$S_1^2$  é a variância das amostras fortificadas com concentração igual ao calibrador de menor concentração;

$S_2^2$  é a variância das amostras fortificadas com concentração igual ao calibrador de maior concentração.

Este valor deve ser comparado com o valor teórico de F ( $F_{crit}$ ), tabelado para um nível de confiança a 99% e  $f_1=f_2=n-1$  graus de liberdade. Se o  $F_{exp} \leq F_{crit}$ , existe homogeneidade da variância, ou seja, pode usar-se o modelo de regressão linear simples. Caso se verifique o oposto,  $F_{exp} > F_{crit}$ , existe heterogeneidade da variância e deve ser escolhido um modelo de regressão linear ponderada. Neste caso, é necessário introduzir um fator de ponderação que minimize os efeitos da contribuição dos calibradores de maior concentração. Os principais fatores de ponderação a serem estudados são:  $1/x$ ;  $1/x^2$ ;  $1/x^{1/2}$ ;  $1/y$ ;  $1/y^2$  e  $1/y^{1/2}$ .<sup>52</sup>

O declive da reta (b) e a ordenada na origem (a), considerando um modelo de regressão linear ponderada, para os diferentes fatores de ponderação, podem ser calculados através das Equações 13 e 14, respetivamente.

$$b = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Equação 13})$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \times \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

$(x_i, y_i)$  é o par de valores  $i$  do  $n$  total de pares de valores;

$w_i$  representa o fator de ponderação.

O fator de ponderação mais adequado é escolhido com base em dois parâmetros: o somatório dos resíduos ( $\sum res$ ), em percentagem, calculado através da soma dos erros relativos associados a cada calibrador (Equação 15) e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtido através da Equação 16. Quanto menor for o valor de  $\sum res$  melhor será o ajuste e o modelo de regressão mais adequado é o que apresenta um valor de  $R^2$  mais próximo da unidade.<sup>52</sup>

$$ER(\%) = \frac{C_{Exp} - C_{Nom}}{C_{Nom}} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

Onde:

$ER$  é o erro relativo, em percentagem;

$C_{Exp}$  é a concentração experimental;

$C_{Nom}$  é a concentração nominal.

$$R = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \times \sqrt{\sum w_i \times \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (\text{Equação 16})$$

Como o  $\sum$  res e  $R^2$  são independentes entre si, foi necessário normalizar os resultados de cada parâmetro, pela aplicação da Equação 17.

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (\text{Equação 17})$$

Onde:

$\sigma$  é o desvio padrão;

$\mu$  é a média aritmética.

Para avaliar a linearidade foi preparada uma curva de calibração com seis pontos (0,03; 0,06; 0,12; 0,3; 0,6 e 5  $\mu\text{M}$ ) para a CBZ e SMZ, por fortificação de 100 mL de água desionizada, a partir das soluções de CBZ e SMZ preparadas em metanol-água (25:75 v/v), para cada ponto. Para avaliar a homogeneidade da variância foram preparados dois conjuntos de água desionizada, em triplicado, em que o primeiro foi fortificado com uma concentração igual ao limite inferior da curva de calibração (0,03  $\mu\text{M}$ ) e o segundo com uma concentração igual ao limite superior da curva de calibração (5,0  $\mu\text{M}$ ).



## B) Limite de detecção e limite de quantificação

Neste trabalho os limites de detecção e quantificação da CBZ e SMZ foram calculados com base nos parâmetros da curva de calibração. As expressões matemáticas utilizadas para o cálculo encontram-se descritas nas equações 18 e 19, respetivamente.

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 18})$$

$$LD = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 19})$$

Onde:

$S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração;

$b$  é o declive da curva de calibração.

## C) Precisão

Neste trabalho, a precisão do método utilizado foi avaliada com base nos coeficientes de variação determinados nos ensaios de repetibilidade. A repetibilidade ou precisão intra-ensaio é expressa pela precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas de funcionamento, ou seja, refere-se a ensaios efetuados sobre a mesma amostra em condições estáveis. Para avaliar a repetibilidade, as seguintes condições de funcionamento devem ser constantes: mesmo laboratório, mesmo operador, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo.<sup>49</sup> O coeficiente de variação de repetibilidade (CV) é expresso em percentagem e para cada nível de concentração, é dado pela Equação 20.

$$CV = \frac{S_n}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 20})$$

Onde:

$S_n$  é o desvio padrão das diferentes repetições efetuadas;

$\bar{x}$  é a média das determinações efetuadas.

A repetibilidade do método foi estudada através da injeção de 5 replicados independentes, preparados por fortificação de 100 mL água desionizada a duas gamas de concentração (0,03 e 5  $\mu$ M), a partir das soluções de CBZ e SMZ preparadas em metanol-água (25:75 v/v) para cada ponto, em condições de repetibilidade.

## D) Exatidão

A exatidão do método foi avaliado através do cálculo do erro relativo (ER), Equação 21. Neste trabalho, a avaliação deste parâmetro foi efetuada em simultâneo com a precisão.

$$ER(\%) = \frac{Média_{C_{Exp}} - C_{Nom}}{C_{Nom}} \times 100 \quad (\text{Equação 22})$$

Onde:

$C_{Exp}$  é a concentração experimental;

$C_{Nom}$  é a concentração nominal.

## 2.3 Toxicidade ao nível da célula

### 2.3.1 Manutenção da linha celular H9c2

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células H9c2 e respetivos meios de cultura foram efetuadas em câmara de fluxo laminar (pbi brand), utilizando material estéril descartável. As células H9c2 foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC). As células H9c2 crescem em monocamada aderente e o meio de cultura utilizado para manter a cultura foi o Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) - high glucose (Sigma-Aldrich D5648)

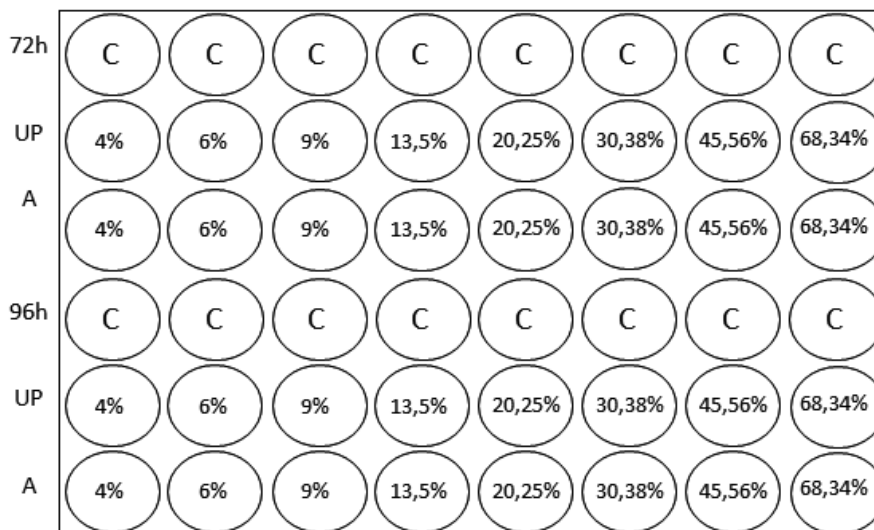
com  $1,8 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich S6297) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco 10270-106) e 1% antibiótico/antimicótico (Gibco 15240-062) a pH 7,3. Após a preparação, o meio de cultura foi filtrado utilizando-se um sistema descartável de filtração, equipado com filtro de  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  (VWR 514-0332). Para a subcultura, sempre que atingiam aproximadamente 70% de confluência, foi removido o meio de cultura e as células foram lavadas com uma solução salina de tampão fosfato autoclavado (PBS, do inglês *Phosphate-buffered Saline*, 8g de NaCl (Sigma-Aldrich S7653), 0,2g KCl (Sigma-Aldrich P9541), 0,609 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich S5136), 0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich P0662) em 1000 mL de água ultrapura (u.p.)) e destacadas do fundo do frasco de cultura pela adição de tripsina-EDTA 0,05 % (Gilco 25300-062). O destacamento das células foi confirmado ao microscópio ótico invertido. O efeito da tripsina foi, depois, anulado por adição de igual volume de meio de cultura. O meio do frasco de cultura com as células destacadas foi transferido para um tubo falcon de 15 mL que foi, depois, centrifugado durante 3 minutos a 10 000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células (pellet) em novo meio de cultura, que foi homogeneizado cuidadosamente 10 vezes com uma pipeta. Semearam-se as células, ou seja, colocou-se metade da suspensão das células em cada novo frasco de cultura, ao qual já tinha sido adicionado meio de cultura novo.

### **2.3.2 Ensaio de Sulforrodamina B**

Para iniciar o ensaio, as células foram semeadas em placas de cultura de 48 poços (Costar 3548) com uma densidade de  $10^4$  células por mL. A contagem das células foi feita com recurso a um contador automático de células (TC20 Bio-Rad) e a suspensão de células foi preparada usando a Equação 22. O preenchimento dos poços da placa de cultura com  $500 \text{ }\mu\text{L}$  da suspensão de células foi feita com recurso a uma pipeta automática de multi-descarga (Multipette E3x Eppendorf). A placa foi incubada durante 24 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , em atmosfera humidificada e contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

$$Volume_{Tubo\ de\ Falcon} = \frac{n^{\circ}\ células\ pretendidas \times volume\ pretendido}{n^{\circ}\ células\ vivas\ por\ mL} \quad (\text{Equação 22})$$

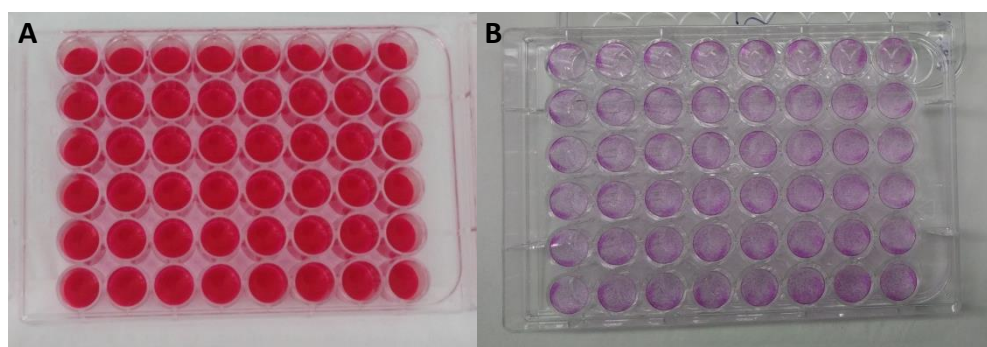
Em cada placa de cultura foram preparados 8 poços só com meio de cultura (controles negativos) e 8 poços com diluições de 4 a 68,34% de meio de exposição (fator de diluição 1,5), preparado a partir das amostras. As várias diluições de cada amostra (A) foram preparadas previamente em tubos falcon estéreis com meio de cultura, por adição direta (sem ajuste dos constituintes do meio). Em cada placa foram preparados dois tempos de exposição (72 e 96 horas). Para se avaliar o efeito da matriz água presente em todas as amostras na inibição do crescimentos das células (resposta celular avaliada neste trabalho), em cada placa foram ainda preparados poços em que se substituiu a concentração de amostra por água u.p.. Para cada amostra foram feitas seis réplicas independentes (N=6). A Figura 15 ilustra o esquema de preparação das placas de cultura.



**Figura 15** - Exemplo de uma das placas de 48 poços para os tempos de exposição 72 e 96 horas.

Depois de preparado o ensaio, as placas de 48 poços foram incubadas em atmosfera humidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. No final do primeiro tempo de exposição (72 horas), as células desse tempo foram lavadas com PBS (500 µL) e os poços secos. No final do segundo tempo de exposição (96 horas), procedeu-se de igual modo. O ensaio terminou com a fixação das células adicionando 300 µL de ácido acético glacial 1% preparado em metanol frio a

todos os poços. As placas de cultura foram depois guardadas no congelador durante pelo menos 1 hora. Removeu-se de seguida o metanol das placas e deixou-se secar os poços a 21 °C. As células foram depois coradas com SRB 0,05% (Sigma-Aldrich S9012) preparado em 1% de ácido acético durante 1 hora a 21 °C. O excesso de corante foi removido lavando os poços, pelo menos quatro vezes, com ácido acético a 1% preparado em água u.p. (Figura 16). Depois de secos, adicionou-se a cada poço 500 µL de Tris/base 10 mM (NZYTech MB01601) a pH 10 e colocaram-se as placas num agitador orbital de microplacas (Rotamax 120Heidolph) à temperatura ambiente para dissolver o corante ligado à proteína. O ensaio terminou com a medição da absorvância a 545 nm, num leitor de microplacas (BioTek Synergy HT).



**Figura 16** – Células coradas com uma solução de SRB (A) e após a remoção do excesso da solução de SRB (B).

## 2.4 Análise estatística

Para os ensaios com as linhas celulares, o coeficiente de variação (CV), expresso na Equação 23, foi calculado para os controlos e por réplica independente para verificar a reprodutibilidade e como critério de aceitação do ensaio. O ensaio é aceite se  $CV < 20\%$ .

$$CV(\%) = (SD/\sqrt{n})/média \times 100 \quad (\text{Equação 23})$$

Onde:

*SD* é o desvio padrão;

*n* é o número de controlos.

As concentrações de amostra necessárias para inibir 50% da multiplicação celular ( $IC_{50}$ , do inglês *inhibitory concentration*) e intervalos de confiança a 95% foram determinados com recurso ao software GraphPad Prism versão 6. O modelo utilizado foi: "log(inhibitor) vs. response - Variable slope (four parameters)", que é expresso pela Equação 24, onde X é o logaritmo da concentração de amostra (em % de volume).

$$Y = \mathbf{Bottom} + (\mathbf{Top} - \mathbf{Bottom}) / (1 + 10^{((\mathbf{Log}IC_{50} - X) \times \mathbf{HillSlope})} \quad \text{(Equação 24)}$$

Onde:

*Bottom* é o valor mínimo do eixo dos yy;

*Top* é o valor máximo do eixo dos yy;

Para o cálculo foi escolhida a opção *Bottom* = zero, uma vez que não foi possível obter este parâmetro diretamente a partir da análise dos resultados. É importante referir que a concentração mais elevada de amostra testada (68,34%) não foi considerada na análise dos resultados, pois às 72 h (final do ensaio) a cor do meio encontrava-se alterada para amarelo (indicando uma diminuição significativa do pH do meio, reportada pelo indicador de pH vermelho de fenol introduzido no meio de cultura). Não foi determinado o  $IC_{50}$  para nenhum dos ensaios com tempo de exposição 96 horas pelo facto dos dados não respeitarem o modelo de inibição selecionado. Concluiu-se, assim, não ter havido condições ótimas de crescimento durante as 96 horas do ensaio.

Uma vez que os resultados dos cinco  $IC_{50}$  obtidos mostraram alguma sobreposição dos limites de confiança 95% (ver Capítulo 3, Resultados e Discussão), não se podendo discriminar a toxicidade individual de cada uma das amostras com a devida confiança, foi efectuado um teste estatístico de hipóteses para avaliar se os parâmetros obtidos para cada amostra são ou não estatisticamente diferentes. Os valores de  $IC_{50}$  para as várias réplicas de cada amostra (necessários para a aplicação do teste estatístico) foram calculados recorrendo à função Solver do Excel® obtendo-se o melhor ajuste da equação 23 aos resultados experimentais. Assim, inicialmente aplica-se o teste de Grubbs para identificar a presença de possíveis *outliers*. Uma vez determinados e eliminados, procede-se à comparação das variâncias, com o objetivo de concluir acerca da sua homogeneidade ou heterogeneidade, porque as expressões utilizadas

serão diferentes em cada caso. Por fim, determina-se o valor de teste (TV), que vai ser comparado com o valor teórico de t-student ( $t_{crit}$ ) tabelado para um nível de confiança a 95% e  $N_1+N_2-2$  graus de liberdade. Em todos os casos houve homogeneidade da variância, pelo que a expressão TV utilizada é dada pela Equação 25.

$$TV = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{Spool \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (\text{Equação 25})$$

Onde:

$$Spool = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times S_1^2 + (n_2 - 1) \times S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$\bar{x}$  é a média;

$n$  é o número de réplicas;

$S$  é o desvio padrão.

Se o  $TV \leq t_{crit}$ , a hipótese nula é aceite e as amostras não são estatisticamente diferentes. Caso se verifique o oposto,  $TV > T_{crit}$ , antes de rejeitar a hipótese nula, tem de se calcular o valor de prova (*p-value*) dado pela Equação 26. Se este for igual a zero, a hipótese nula é rejeitada e as amostras são estatisticamente diferentes.

$$p - value = DISTT(TV; N_1 + N_2 - 2; 2) \quad (\text{Equação 26})$$

Onde:

$N$  é o número de graus de liberdade





# Capítulo 3

---

## Resultados e Discussão



## Capítulo 3

### Resultados e Discussão

#### 3.1 Caracterização físico-química das amostras

Na Tabela 4 são apresentados os valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* e no laboratório, referentes às amostras recolhidas nas saídas de campo de Dezembro de 2016 e Maio 2017, assim como os VLE na descarga de águas residuais e valores máximos admissíveis (VMA) para as águas superficiais de acordo com o Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto.

A temperatura (Figura 17) registada nas amostras recolhidas no Rio Mondego em Dezembro e Maio é mais elevada na amostra MR. A amostra E, em ambos os meses, apresenta uma temperatura superior às amostras de água superficial. Verifica-se que os valores de temperatura em todas as amostras no mês de Dezembro são inferiores aos registados em Maio, de acordo com as diferenças habituais de temperatura entre Inverno e Primavera. Os resultados mostram ainda que de um modo geral existe um gradiente de concentração de R para E. A temperatura registada em todos os pontos de amostragem, em Dezembro e em Maio, não ultrapassa os valores limite estabelecidos por lei.

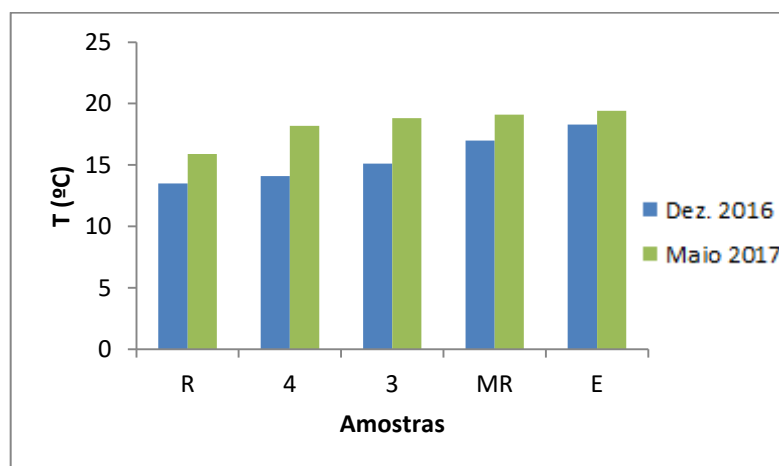


Figura 17 – Resultados obtidos para o parâmetro temperatura.

Tabela 4 – Resultados obtidos para amostras recolhidas nas saídas de campo de Dezembro de 2016 e Maio 2017.

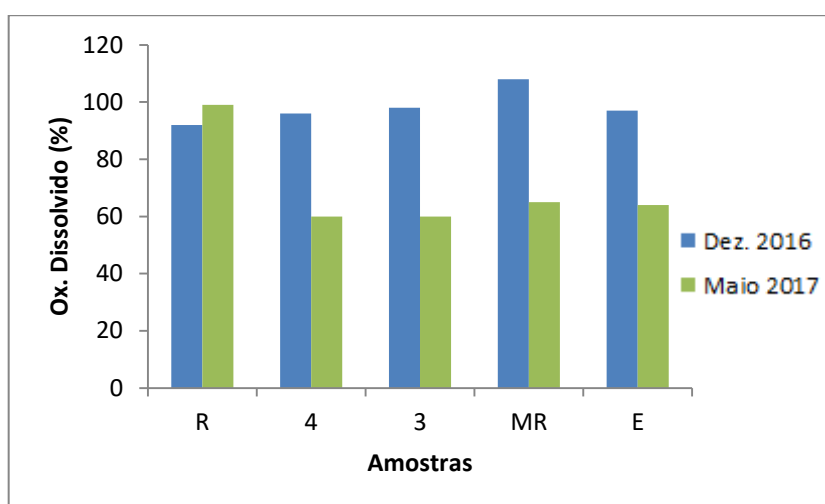
	Referência		Meio Recetor		300 metros		600 metros		VMA		Efluente		VLE
	12/2016	05/2017	12/2016	05/2017	12/2016	05/2017	12/2016	05/2017	12/2016	05/2017	12/2016	05/2017	
	T (°C)	13,5	15,9	17	19,1	15,1	18,8	14,1	18,2	30	18,3	19,4	
Ox. Dissolvido (%)	92	99	108	65	98	60	96	60	50	97	64	-	
pH	7,46	7,05	7,57	7,46	7,19	7,42	7,40	7,21	5,0-9,0	7,56	7,49	6,0-9,0	
Condutividade (µs/cm)	86,5	82,3	488	723	262	655	162,1	365	-	663	807	-	
Sílica (mg/L Si)	1,800	2,915	3,283	2,974	2,730	3,009	2,460	2,969	-	3,720	2,916	-	
SST (mg/L)	8,8	< 5**	15,2	7,2	18,7	6,8	14,8	< 5**	-	17,4	20,0	60	
CQO (mg/L O <sub>2</sub> )	13	< 10**	78	96	29	114	18	30	-	79	91	150	
CBO5 (mg/L O <sub>2</sub> )	< 3**	< 3**	5	< 3**	< 3**	5	< 3**	< 3**	5	15	4	40	
Dureza Total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	100	16	270	76	150	76	120	56	-	420	86	-	
Azoto Total (mg/L N)	< 2**	< 2	20,7	33,0	9,7	30,0	2,2	12,0	-	35,6	32,0	15	
Fósforo Total (mg/L P)	< 2**	< 2**	< 2**	< 2**	< 2**	< 2**	< 2**	< 2**	1	2,20	2,05	10	
Azoto amoniacal (mg/L NH <sub>4</sub> )	1,18	0,20	14,70	21,96	5,77	18,29	1,50	11,06	1,3	23,55	24,20	10	
Fosfatos (mg/L P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,1	< 0,1**	3,09	3,02	0,51	2,07	0,48	1,38	-	4,27	3,23	-	
Nitratos (mg/L NO <sub>3</sub> )	< 5**	< 5**	34,9	33,8	17,0	28,8	5,0	13,8	25***	54,3	38,9	50	

(\*) Temperatura do meio recetor após a descarga de água residual, medida a 30 m a jusante do ponto de descarga.

(\*\*) Inferior ao limite de quantificação.

(\*\*\*) Limite máximo para o estabelecimento do bom estado ecológico em rios, de acordo com o Instituto Nacional da Água (INAG).<sup>53</sup>

Os valores registados para o oxigénio dissolvido (Figura 18) são semelhantes, em Dezembro, nas amostras recolhidas no Rio Mondego. No entanto, em Maio o valor registado para a amostra R é superior às amostras MR, 3 e 4. A amostra E em Dezembro apresenta uma percentagem de oxigénio dissolvido semelhante às restantes amostras e em Maio é bastante inferior à amostra R, mas semelhante às amostras MR, 3 e 4. Verifica-se que os valores de oxigénio dissolvido em todas as amostras, à exceção da amostra R, em Maio são bastante inferiores aos obtidos em Dezembro. Assim, os valores indiciam uma forte influência da descarga do efluente nos valores deste parâmetro no rio Mondego em Maio. A percentagem de oxigénio dissolvido obtida para as amostras recolhidas no rio Mondego, tanto em Dezembro, como em Maio, não ultrapassa o VMA.



**Figura 18** – Resultados obtidos para o parâmetro oxigénio dissolvido.

Os valores de pH (Figura 19) registados em ambas as saídas de campo aproximam-se do pH neutro (pH = 7,00), sendo as amostras caracterizadas como ligeiramente básicas ou alcalinas (pH > 7,0). Desta forma, os valores obtidos para as amostras recolhidas no rio Mondego não ultrapassam o VMA e os resultados obtidos para o efluente não ultrapassam o VLE.

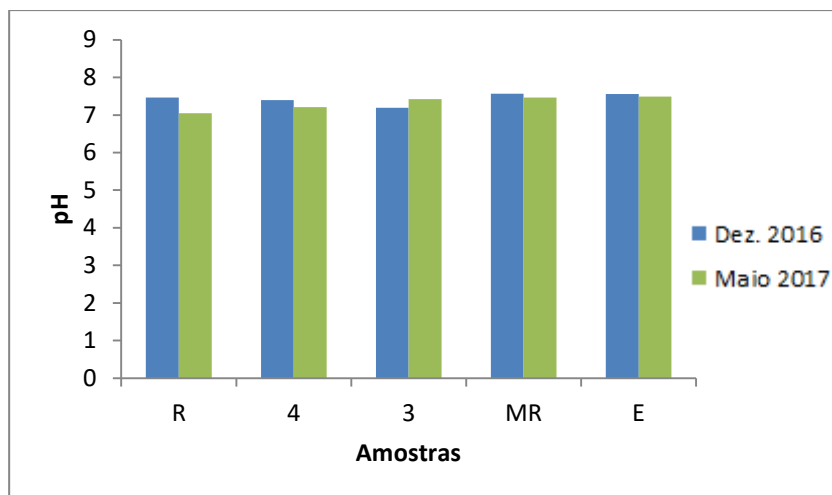


Figura 19 – Resultados obtidos para o parâmetro pH.

A condutividade (Figura 20) registada para as amostras recolhidas no Rio Mondego em Dezembro e Maio na amostra R é semelhante, sendo esta a amostra que apresenta um menor valor obtido. A amostra E, em ambos os meses, apresenta uma condutividade superior às amostras de água superficial. Os resultados mostram a existência de um gradiente de concentração de R para E, indicando que a descarga do efluente tem influência nos valores deste parâmetro no rio Mondego. Por outro lado, em Maio foram obtidos valores mais elevados do que Dezembro, uma vez que em Maio a amostragem ocorreu depois de fortes chuvadas, o que favorece o escoamento superficial de compostos químicos e de detritos que acabaram no rio.

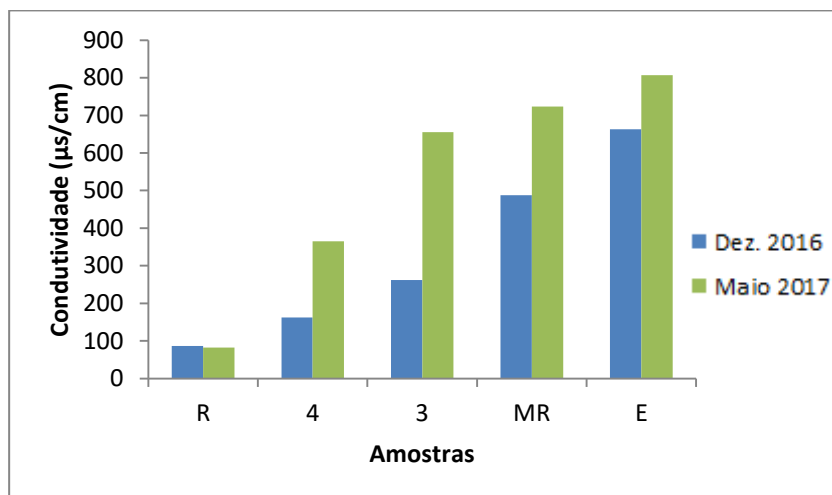
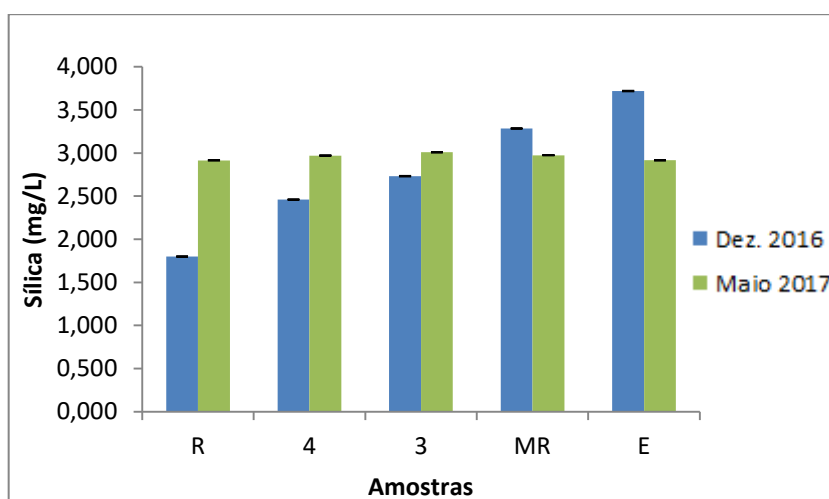


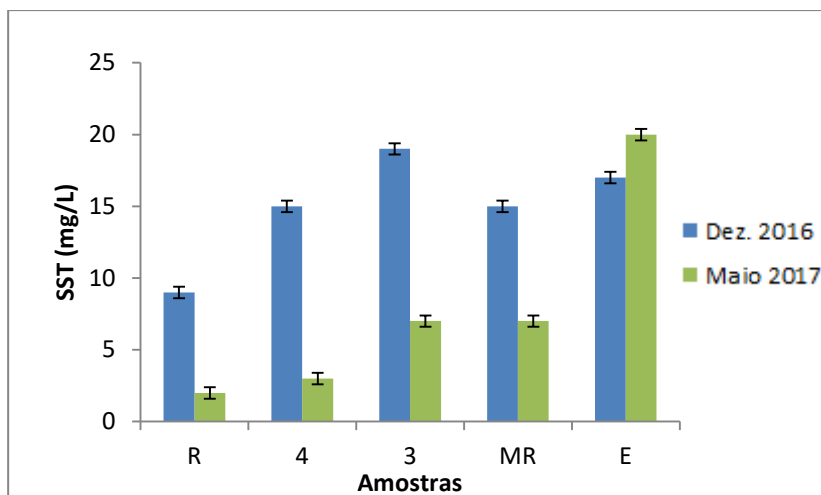
Figura 20 – Resultados obtidos para o parâmetro condutividade.

Os valores de sílica (Figura 21) registados para as amostras recolhidas no Rio Mondego no mês de Maio são aproximadamente iguais. Já para o mês de Dezembro, o valor mais elevado foi obtido para a amostra MR. Na amostra E, em Maio, o valor de sílica é aproximadamente igual ao das restantes amostras e em Dezembro é superior. Os resultados mostram que em Dezembro existe um gradiente de concentração de sílica de R para E, indicando que a descarga do efluente tem influência nos valores deste parâmetro no rio Mondego. Por outro lado, em Maio, todas as estações de amostragem apresentam aproximadamente o mesmo valor. Este facto deve estar ligado às grandes chuvadas que caíram na véspera da saída de campo, que homogeneizaram de algum modo a água do rio Mondego e aproximaram os valores de sílica ao determinado para o efluente.



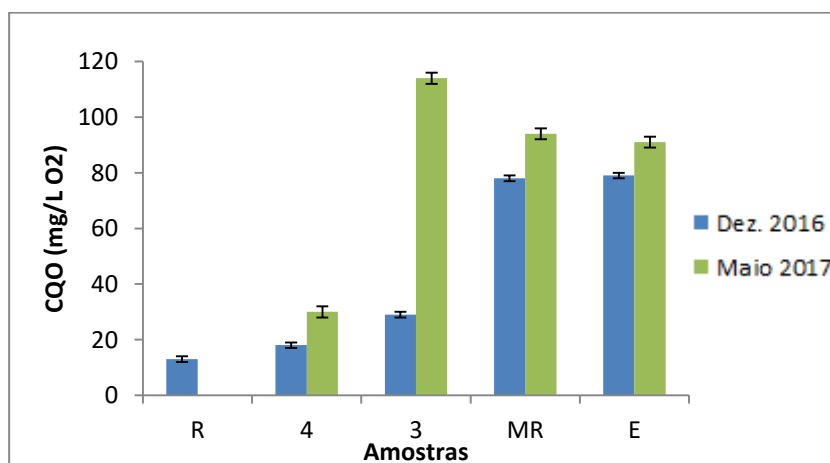
**Figura 21** – Resultados obtidos para o parâmetro sílica.

As concentrações de sólidos suspensos totais (Figura 22) registadas para as amostras recolhidas no Rio Mondego em Dezembro são superiores às de Maio. A amostra E em Maio apresenta uma concentração mais elevada do que em Dezembro. De um modo geral, os resultados obtidos nas amostras em Dezembro são superiores aos de Maio. Os resultados obtidos para o efluente não ultrapassam o VLE.



**Figura 22** – Resultados obtidos para o parâmetro sólidos suspensos totais.

A carência química de oxigénio (Figura 23) registada para as amostras recolhidas no Rio Mondego, à exceção da amostra R (não representada na Figura 23, uma vez que o resultado obtido é inferior ao limite de quantificação), em Maio é superior às de Dezembro. Este resultado pode ser justificado pela possível ressuspensão de matéria orgânica com origem nas chuvadas intensas que ocorreram na véspera da saída de amostragem. Na amostra E, o resultado obtido também é superior em Maio. No entanto, os resultados obtidos, tanto em Maio, como em Dezembro, para o efluente não ultrapassam o VLE.



**Figura 23** – Resultados obtidos para o parâmetro carência química de oxigénio.

Os valores de carência bioquímica de oxigénio (Figura 24) registados para as amostras recolhidas no Rio Mondego são, na maioria, inferiores ao limite de quantificação. No entanto,



os valores obtidos para a amostra 3 em Maio e amostra MR em Dezembro são iguais ao VMA. A amostra E apresenta valores superiores em Dezembro. Os valores obtidos para as amostras recolhidas no rio Mondego não ultrapassam o VMA e os resultados obtidos para o efluente não ultrapassam o VLE.

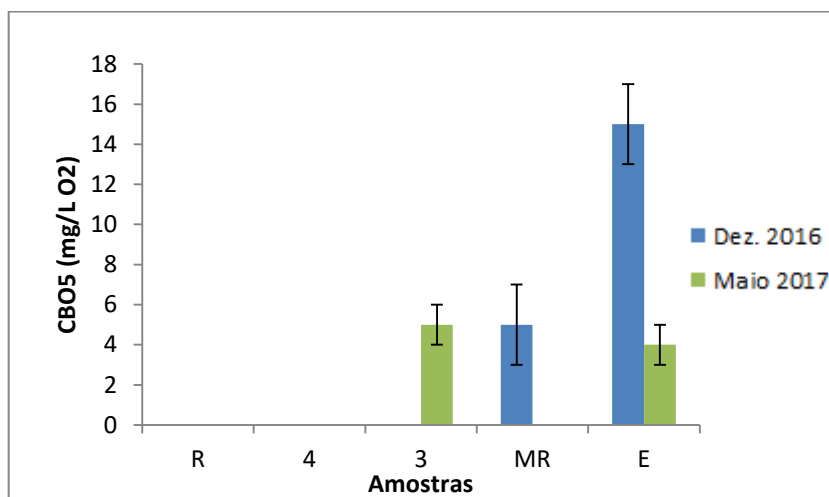
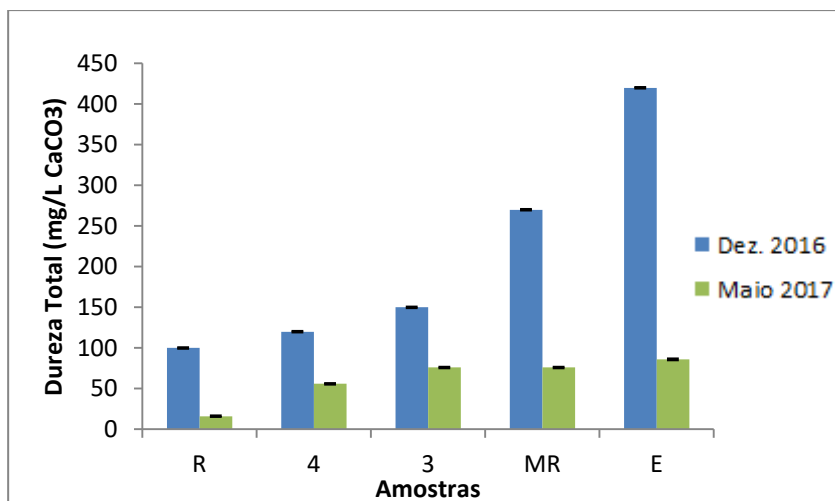


Figura 24 – Resultados obtidos para o parâmetro carência bioquímica de oxigénio.

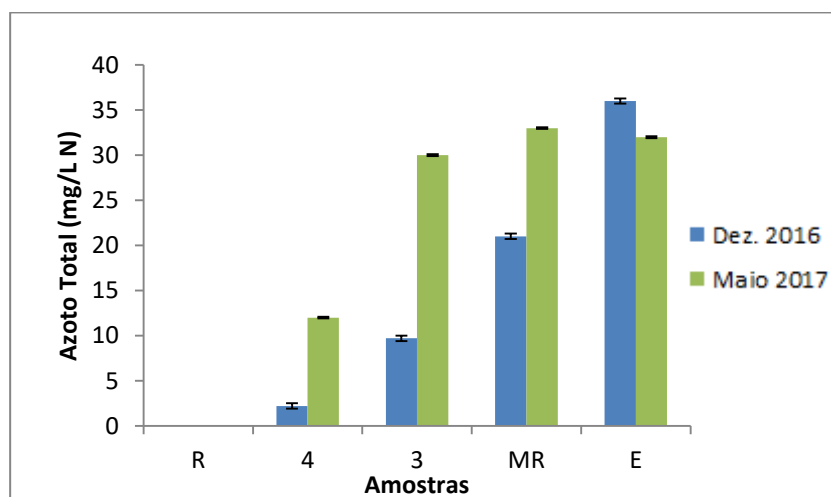
A comparação dos valores obtidos para a CBO<sub>5</sub> com os valores de CQO permite avaliar a biodegradabilidade das águas. Desta forma, os valores obtidos para a CQO são bastante superiores aos da CBO<sub>5</sub>, pois existe a oxidação de um maior número de compostos. Uma vez que a CBO<sub>5</sub> é apenas referente à matéria orgânica biodegradável, quanto mais próximo for este resultado da CQO, mais facilmente biodegradável será o efluente.

Os valores para a dureza total (Figura 25) registados para as amostras recolhidas no Rio Mondego são mais elevados em Dezembro do que em Maio. A amostra E, em ambos os meses, apresenta valores superiores às amostras de água superficial. Os resultados mostram que existe um gradiente perfeito em Dezembro e quase perfeito em Maio de R para E, o que indica que este parâmetro é muito influenciado pela descarga do efluente. Por outro lado, os resultados evidenciam que em Dezembro a ETAR descarregou mais compostos ricos em Cálcio e Magnésio do que em Maio.



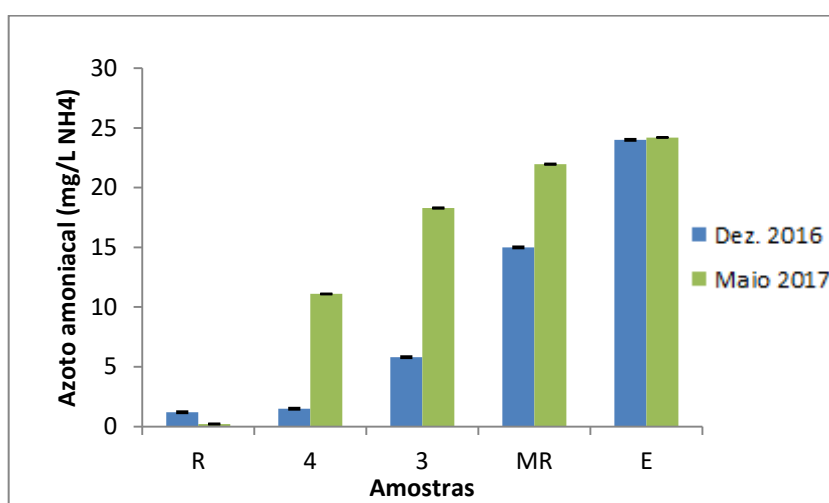
**Figura 25** – Resultados obtidos para o parâmetro dureza total.

Os resultados de azoto total (Figura 26) registados para as amostras recolhidas no Rio Mondego são mais elevados em Maio do que em Dezembro. A amostra E em Dezembro apresenta um resultado superior ao de Maio. Os resultados mostram que de um modo geral existe um gradiente de concentração de R para E, evidenciando o efeito da descarga do efluente na concentração deste parâmetro na qualidade de água do rio Mondego. A amostra R como se localiza a montante da descarga do efluente, não é afetada pelas elevadas concentrações de azoto total provenientes da descarga do efluente. De um modo geral a concentração de azoto total é superior em Maio relativamente a Dezembro. Os resultados obtidos para o efluente ultrapassam o VLE.



**Figura 26** – Resultados obtidos para o parâmetro azoto total.

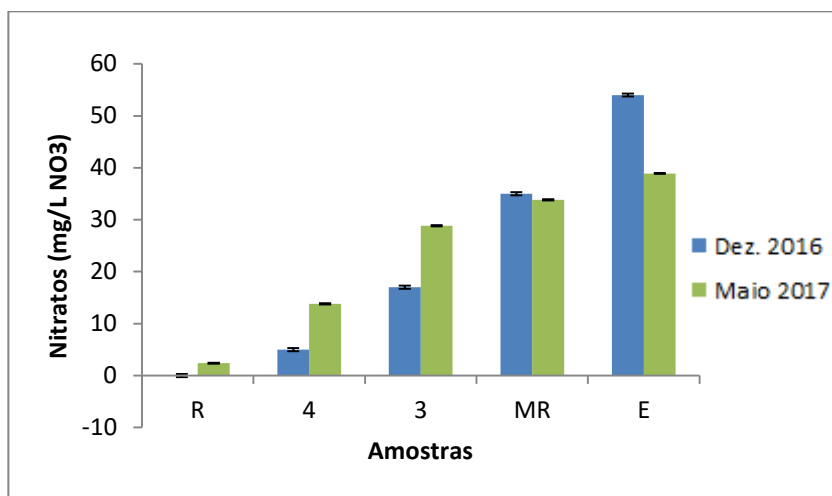
As concentrações de azoto amoniacal (Figura 27) registados para as amostras recolhidas no Rio Mondego são mais elevados em Maio do que em Dezembro. A amostra E em Dezembro apresenta um resultado semelhante ao de Maio. Os resultados mostram que de um modo geral existe um gradiente de concentração de R para E, evidenciando o efeito da descarga da ETAR do Choupal na concentração deste parâmetro no Rio Mondego. A amostra R como se localiza a montante da descarga do efluente, não é afetada pelas elevadas concentrações de azoto amoniacal provenientes da descarga do efluente. Os resultados obtidos para o efluente ultrapassam o VLE, tanto em Dezembro, como em Maio, e os resultados obtidos para as amostras recolhidas no rio Mondego ultrapassam o VMA.



**Figura 27** – Resultados obtidos para o parâmetro azoto amoniacal.

As concentrações de nitratos (Figura 28) registadas para as amostras recolhidas no Rio Mondego são mais elevadas em Maio do que em Dezembro, à exceção da amostra MR. A amostra E em Dezembro apresenta um resultado superior ao de Maio. Os resultados mostram que de um modo geral existe um gradiente de concentração de R para E, evidenciando o efeito da descarga do efluente na concentração deste parâmetro na qualidade de água do rio Mondego. A amostra R como se localiza a montante da descarga do efluente, não é afetada pelas elevadas concentrações de nitratos provenientes da descarga do efluente. O resultado obtido para o efluente em Dezembro ultrapassa o VLE, mas em Maio não. Os resultados obtidos para as amostras recolhidas a 600 metros, em ambos os meses, e a 300 metros, em

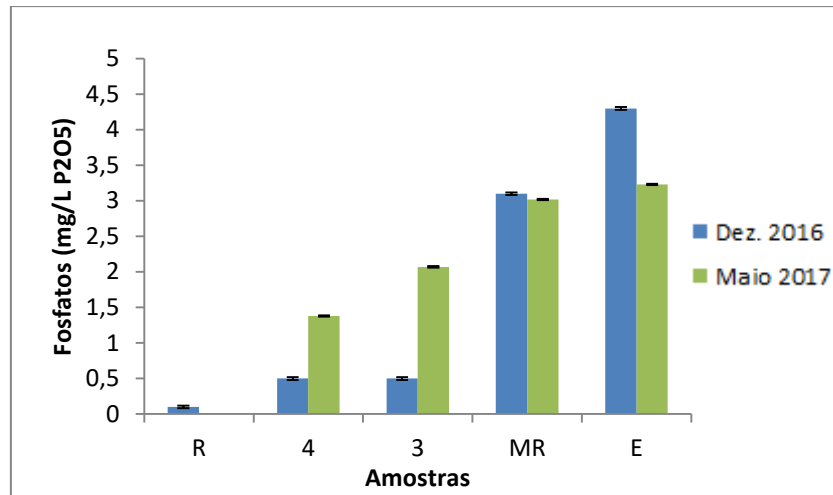
Dezembro, não ultrapassam o VMA. No entanto, as amostras MR, em ambos os meses, e 300 metros, em Maio, são superiores ao VMA.



**Figura 28** – Resultados obtidos para o parâmetro nitratos.

As concentrações de fósforo total registadas para as amostras recolhidas no Rio Mondego são inferiores ao limite de quantificação, 2,0 mg/L. A amostra E em Dezembro apresenta um resultado semelhante ao de Maio, não ultrapassando o VLE.

As concentrações de fosfatos (Figura 29) registadas para as amostras recolhidas no Rio Mondego são mais elevadas em Maio do que em Dezembro, à exceção da amostra MR. A amostra E em Dezembro apresenta um resultado superior ao de Maio. Os resultados mostram que de um modo geral existe um gradiente de concentração de R para E, evidenciando o efeito da descarga do efluente na concentração deste parâmetro na qualidade de água do rio Mondego. A amostra R como se localiza a montante da descarga do efluente, não é afetada pelas concentrações de fosfatos provenientes da descarga do efluente.

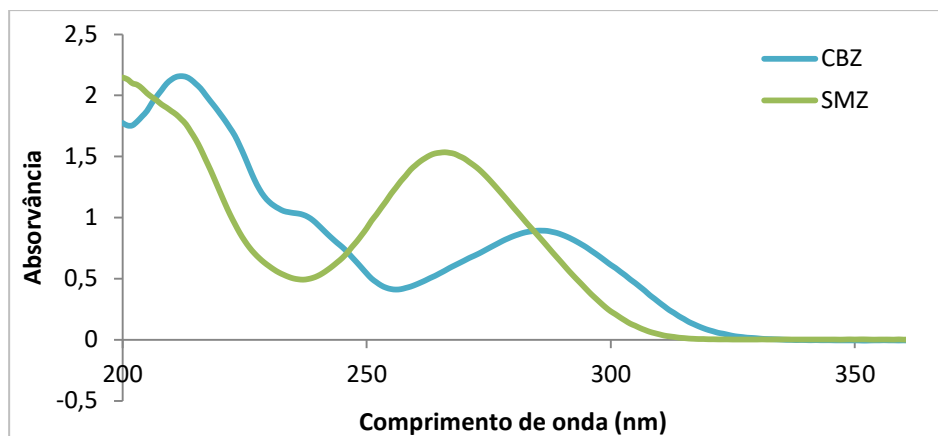


**Figura 29** – Resultados obtidos para o parâmetro fosfatos.

A representação gráfica de todos os parâmetros analisados (Figuras 17 a 29) permite verificar a existência de um gradiente de R para E. Analisando os resultados obtidos, de uma forma geral, observa-se a existência do seguinte gradiente dos parâmetros estudados: Referência → 600 metros → 300 metros → Meio Recetor → Efluente. Nos resultados obtidos em Maio de 2017, os parâmetros que apresentam este gradiente são: temperatura, pH, condutividade, SST, dureza total, fósforo total, azoto amoniacal, fosfatos e nitratos.

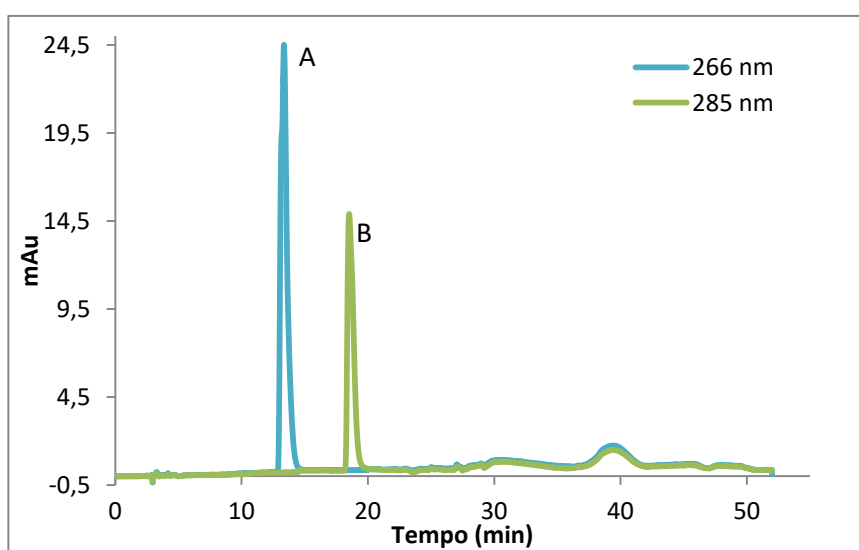
### 3.2 Determinação do sulfametoxazol e carbamazepina

Uma vez que se usa um detetor DAD, que permite a monitorização de vários comprimentos de onda, após a injeção e chegada dos compostos ao detetor, torna-se relevante identificar os comprimentos de onda máximos do SMZ e da CBZ. Na Figura 30 estão apresentados os espectros de absorção da CBZ e do SMZ.



**Figura 30-** Espectro de UV/Visível da carbamazepina e sulfametoxazol em metanol-água (25:75 v/v).

O máximo de absorção da banda de menor energia ocorre para comprimentos de onda iguais a 285 e 266 nm, para a CBZ e o SMZ, respectivamente. Após a identificação dos comprimentos de onda máximos de absorção da CBZ e SMZ foi injetada no HPLC-DAD uma solução com concentração 5,0  $\mu\text{M}$  de CBZ e outra de SMZ. A partir do cromatograma obtido, representado na Figura 31, verifica-se que o tempo de retenção para o SMZ é de 13,3 minutos e para a CBZ é de 18,5 minutos.



**Figura 31 -** Cromatograma da solução padrão contendo sulfametoxazol (A) e carbamazepina (B) com uma concentração de 5  $\mu\text{M}$  para cada um dos padrões. As características do método cromatográfico utilizado encontram-se descritas nas tabelas 2 e 3.

### 3.2.1 Validação do método analítico

Quando as condições de um método analítico são otimizadas ou existem alterações do mesmo, o seu desempenho deve ser avaliado com base em parâmetros definidos, que de forma geral mostram a qualidade, consistência e fiabilidade dos resultados obtidos pelo método. Assim, procedeu-se à validação do método analítico utilizado para este trabalho avaliando os seguintes parâmetros: gama de trabalho e linearidade (A), limites de deteção e de quantificação (B), precisão (C) e exatidão (D).

#### A) Gama de trabalho e linearidade

A gama de trabalho foi formada a partir de diluições da solução padrão de CBZ e SMZ de concentração 500  $\mu\text{M}$ , obtendo-se as seguintes concentrações: 0,03; 0,06; 0,12; 0,3; 0,6 e 5,0  $\mu\text{M}$ .

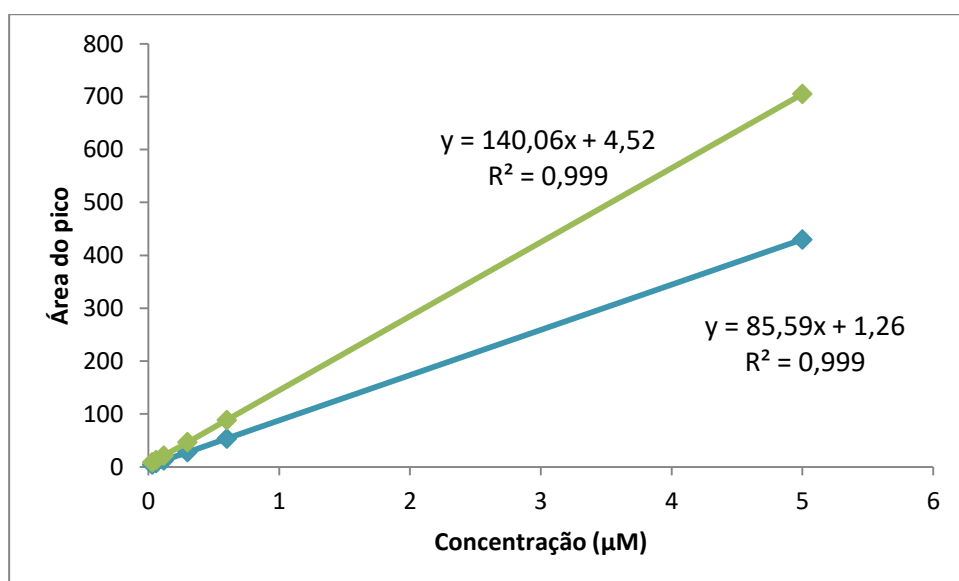
Antes de se proceder ao estudo da linearidade, avaliou-se a homogeneidade das variâncias para decidir qual o modelo de calibração mais adequado. Para isso, recorreu-se ao teste F e comparou-se o resultado obtido ( $F_{\text{exp}}$ ) com o valor teórico de F ( $F_{\text{crit}}$ ). Na Tabela 5 encontram-se resumidos os valores de  $F_{\text{exp}}$  obtidos para o SMZ e a CBZ, bem como o valor tabelado para o  $F_{\text{crit}}$ .

**Tabela 5** – Valores de  $F_{\text{exp}}$  para o sulfametoxazol (266 nm) e carbamazepina (285 nm).

Substância	0,03 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	$F_{\text{exp}}$	$F_{\text{crit}}$
	Variância ( $S_1^2$ )	Variância ( $S_2^2$ )		
Sulfametoxazol	$3,19 \times 10^{-6}$	$1,33 \times 10^{-3}$	416,96	
Carbamazepina	$7,73 \times 10^{-6}$	$2,07 \times 10^{-3}$	268,27	15,89

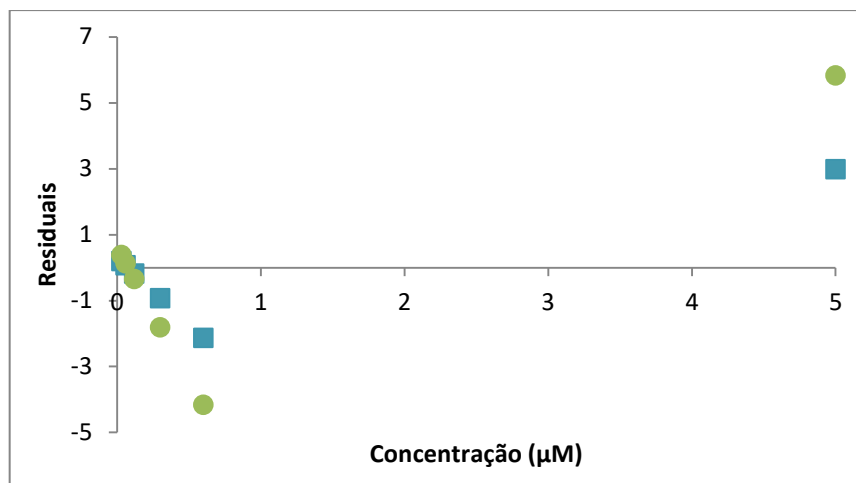
Os resultados obtidos mostram que para a função de calibração existe heterogeneidade da variância ( $F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$ ) e como não se pretende reduzir a gama de trabalho, é necessário introduzir um fator de ponderação que minimize os efeitos da contribuição dos calibradores de maior concentração. Os principais fatores de ponderação estudados foram:  $1/x$ ;  $1/x^2$ ;  $1/x^{1/2}$ ;  $1/y$ ;  $1/y^2$  e  $1/y^{1/2}$ .<sup>52</sup> Os resultados deste estudo encontram-se no Anexo B. Para ambos os padrões o melhor fator de ponderação é  $1/x$ .

Por fim, após a avaliação da homogeneidade da variância e a realização do estudo sobre o fator de ponderação mais adequado, foi avaliada a linearidade. Os critérios de avaliação da curva de calibração referentes à linearidade foram: análise dos gráficos dos valores residuais, considerando como *outliers* os valores que apresentem um desvio residual superior ao dobro do erro padrão e  $R^2$  superior a 0,995.<sup>48-50, 52</sup> A Figura 32 representa as curvas de calibração e o coeficiente de correlação obtidas, considerando o fator de ponderação  $1/x$ , para a CBZ e SMZ, e a Figura 33 representa a análise dos valores residuais nos diferentes pontos da curva de calibração para a CBZ e SMZ.



**Figura 32** – Curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação, obtidos considerando o fator de ponderação  $1/x$ , para a carbamazepina ( — ) a 285 nm e sulfametoxazol ( — ) a 266 nm.





**Figura 33** – Análise dos valores residuais de cada concentração da curva de calibração para a carbamazepina (□) a 285 nm e sulfametoxazol (●) a 266 nm.

Pela análise da Figura 32 é possível verificar que, para ambas as curvas, se obtiveram coeficientes de correlação superiores a 0,995. Relativamente aos valores de residuais, o dobro do erro padrão para a CBZ é 3,8 e para o SMZ é 7,4. Assim, é possível verificar que não existem *outliers*. Uma vez cumpridos os critérios de aceitação anteriormente referidos, é possível verificar que, considerando um fator de ponderação de  $1/x$ , o método é linear na gama de trabalho testada.

## B) Limites de deteção e de quantificação

Os limites de deteção e quantificação da CBZ e SMZ foram calculados com base nas equações apresentadas no capítulo 2.2.8.5 e os resultados estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6** - Resumo dos resultados obtidos no estudo dos limites de deteção e quantificação para o sulfametoxazol a 266 nm e carbamazepina a 285 nm.

Substância	LD (µM)	LQ (µM)
Sulfametoxazol	0,01	0,04
Carbamazepina	0,02	0,05

### C) Precisão

Após a aplicação do método obtiveram-se as áreas dos picos cromatográficos e os tempos de retenção para o SMZ e CBZ em cada replicado e para cada gama de concentração, calculando-se a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade para a concentração 0,03  $\mu$ M de sulfametoxazol a 266 nm e carbamazepina a 285 nm.

Substância	Áreas dos picos			Tempo de retenção		
	Média	s	CV(%)	Média	s	CV(%)
Sulfametoxazol	9,09	0,18	2,00	13,36	0,05	0,36
Carbamazepina	4,73	0,18	3,84	18,48	0,04	0,23

**Tabela 8** - Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade para a concentração 5  $\mu$ M de sulfametoxazol a 266 nm e carbamazepina a 285 nm.

Substância	Áreas dos picos			Tempo de retenção		
	Média	s	CV(%)	Média	s	CV(%)
Sulfametoxazol	711,81	4,41	0,62	13,37	0,03	0,20
Carbamazepina	434,73	4,44	1,02	18,51	0,02	0,11

Observando os resultados referentes à precisão verificam-se CV inferiores a 10% para as áreas dos picos cromatográficos e inferiores a 1% para o tempo de retenção. Verifica-se, portanto, que o SMZ e CBZ cumprem os critérios de aceitação.<sup>48-50</sup>

### D) Exatidão

Os resultados obtidos no estudo da exatidão estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9** - Resumo dos resultados obtidos no estudo da exatidão para a concentração 0,03  $\mu$ M de sulfametoxazol a 266 nm e carbamazepina a 285 nm.

<b>Substância</b>	<b>C<sub>Exp</sub></b>	<b>C<sub>Teor</sub></b>	<b>ER (%)</b>
<b>Sulfametoxazol</b>	0,033	0,030	8,68
<b>Carbamazepina</b>	0,032	0,030	7,55

**Tabela 10** - Resumo dos resultados obtidos no estudo da exatidão para a concentração 5  $\mu$ M de sulfametoxazol a 266 nm e carbamazepina a 285 nm.

<b>Substância</b>	<b>C<sub>Exp</sub></b>	<b>C<sub>Teor</sub></b>	<b>ER (%)</b>
<b>Sulfametoxazol</b>	5,050	5,000	1,00
<b>Carbamazepina</b>	5,056	5,000	1,13

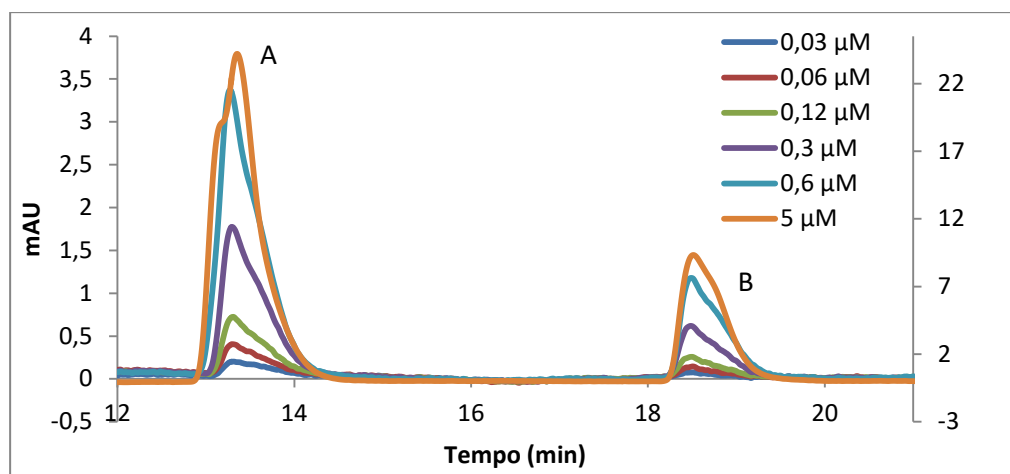
Para o método ser considerado exato, o valor obtido para o erro relativo deve ser inferior a 20%.<sup>48</sup> Observando os resultados verifica-se que o SMZ e CBZ cumprem os critérios de aceitação.

### **3.2.2 Testes de recuperação e de reutilização para a extração em fase sólida**

Com o objetivo de testar a eficiência do método de SPE, as soluções padrão contidas na gama de trabalho foram submetidas à extração em fase sólida e analisadas em HPLC-DAD, e foram comparadas com as mesmas soluções padrão analisadas diretamente no HPLC-DAD. Os valores de recuperação foram obtidos comparando as áreas dos picos cromatográficos das amostras sujeitas à extração com as amostras não submetidas à extração. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para a recuperação do método de SPE e a Figura 34 mostra os cromatogramas obtido após a SPE para as diferentes concentrações a 266nm.

**Tabela 11** – Recuperação do método de SPE para o sulfametoxazol (266 nm) e carbamazepina (285 nm).

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Recuperação (%)	
	Sulfametoxazol	Carbamazepina
0,03	91,9 $\pm$ 2,6	91,9 $\pm$ 3,7
0,06	91,6 $\pm$ 3,4	92,7 $\pm$ 1,7
0,12	93,1 $\pm$ 3,3	92,5 $\pm$ 3,5
0,3	81,8 $\pm$ 0,9	85,0 $\pm$ 2,5
0,6	80,7 $\pm$ 2,2	83,8 $\pm$ 1,6
5	82,4 $\pm$ 0,6	87,9 $\pm$ 0,8

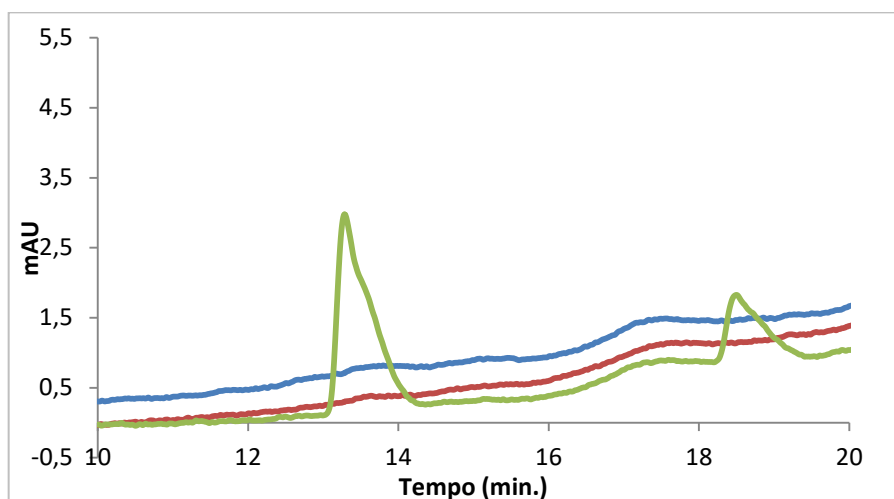


**Figura 34** – Cromatograma a 266 nm obtido após a extração em fase sólida para as diferentes concentrações, indicadas na figura, de sulfametoxazol (A) e carbamazepina (B), com representação gráfica da concentração 5  $\mu\text{M}$  no eixo secundário (lado direito).

Considerando que idealmente as percentagens de recuperação se devem situar entre 80-120%<sup>48-50</sup>, de uma maneira geral pode considerar-se que as recuperações obtidas são aceitáveis tanto para a CBZ, como para o SMZ. Também é possível verificar que para concentrações mais elevadas, os valores de recuperação são menores em comparação com concentrações mais baixas.

Com o objetivo de verificar se os cartuchos de SPE poderiam ser utilizados para mais do que uma extração, minimizando, assim, os custos, foram realizados alguns testes preliminares. Inicialmente, verificou-se se a limpeza aplicada ao cartucho era suficiente. Para isso,

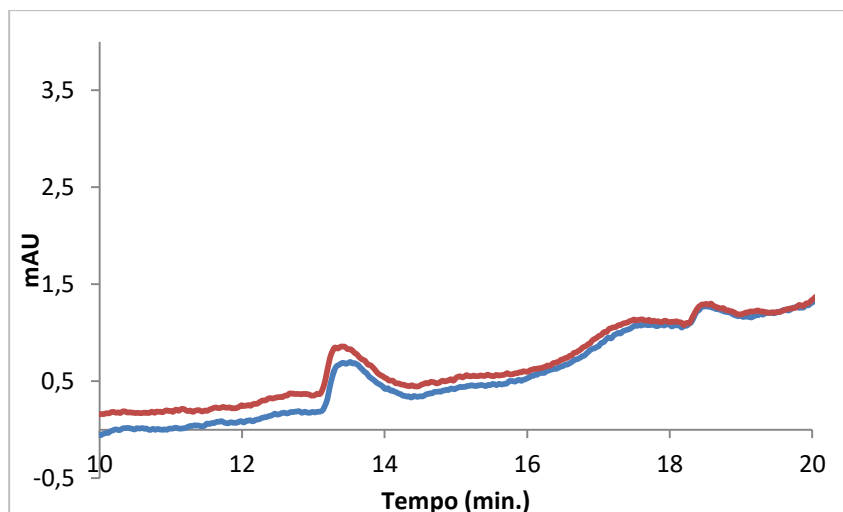
inicialmente, uma amostra contendo apenas água desionizada foi passada pelo cartucho e, após a extração de uma solução de CBZ e SMZ com concentração 0,6  $\mu\text{M}$ , voltou-se a passar uma amostra contendo apenas água desionizada. A Figura 35 representa os cromatogramas obtidos a 266 nm. Para a limpeza do cartucho de SPE passou-se aproximadamente 10 mL de metanol e 10 mL de água desionizada.



**Figura 35** - Cromatogramas a 266 nm obtidos para a extração de água desionizada realizada no início (—) e fim (—) da utilização do cartucho de SPE e de um padrão de concentração 0,6  $\mu\text{M}$  (—).

Comparando os cromatogramas obtidos no início da utilização do cartucho de SPE e no fim, o perfil de ambos é muito semelhante, pelo que se pode concluir que o método de lavagem utilizado é adequado.

O outro teste efetuado pretende avaliar se a capacidade de retenção de um cartucho se mantém após várias extrações. Desta forma, procedeu-se à extração de vários padrões com concentrações diferentes e no fim repetiu-se a extração de um dos padrões. Os cromatogramas obtidos a 266 nm estão representados na Figura 36.



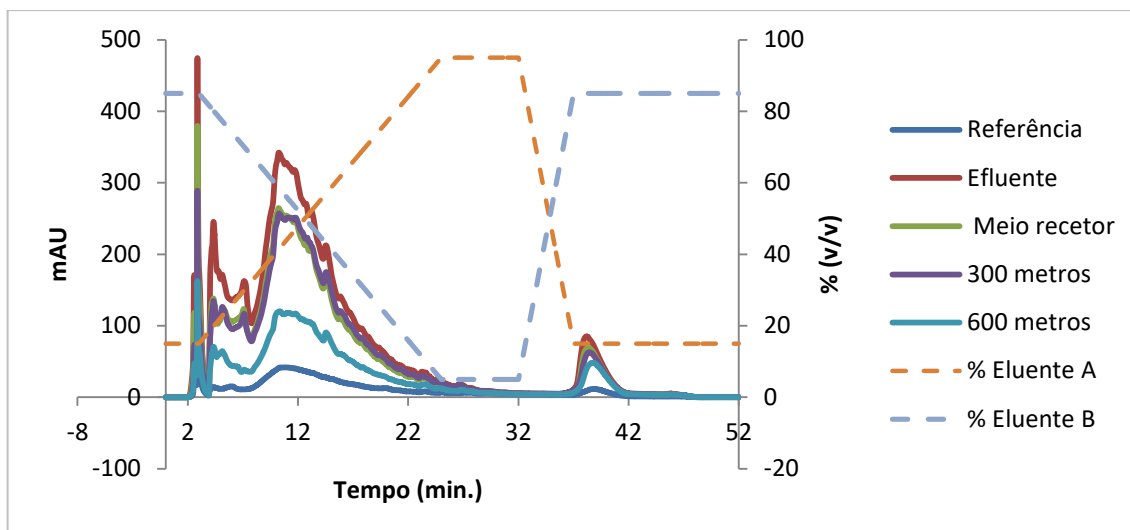
**Figura 36** - Cromatogramas a 266 nm obtidos para a extração de um padrão de concentração 0,10 µM com um cartucho de SPE novo (—) e após a sua utilização com amostras de várias concentrações (—).

Comparando os cromatogramas obtidos verifica-se que o perfil de ambos é muito semelhante, pelo que se pode concluir que cartucho de SPE mantém a sua capacidade de retenção após várias utilizações. Assim, pode concluir-se que um cartucho de SPE é reutilizável. Para cada réplica da curva de calibração foi utilizado um cartucho de SPE. Para cada uma das amostras foi no entanto utilizado um cartucho de SPE novo, uma vez que não foi avaliado o efeito da matriz da amostra no comportamento dos cartuchos SPE.

### 3.2.3 Análise das amostras do Rio Mondego e efluente

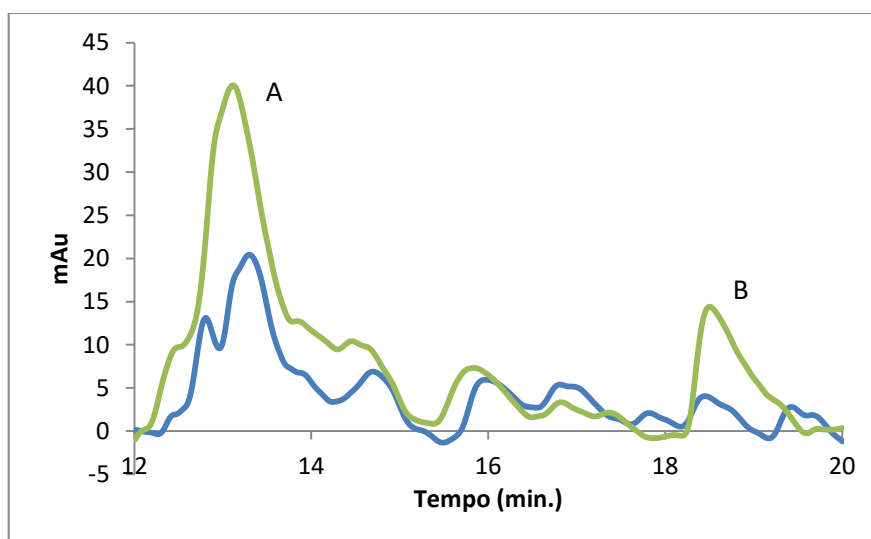
O método validado foi aplicado às amostras de água recolhidas no rio Mondego, com o objetivo de determinar a concentração de cada composto em cada ponto de amostragem. Apenas foram analisadas as amostras recolhidas em Maio de 2017, uma vez que só se conseguiram obter dados de citotoxicidade com estas amostras.

Na Figura 37 estão representados os cromatogramas a 266 nm obtidos para os diferentes pontos de amostragem.



**Figura 37** -- Cromatogramas a 266 nm obtidos para os diferentes pontos de amostragem. O perfil do gradiente utilizado para a eluição está também representado na figura no eixo secundário (lado direito).

Observa-se a presença de vários compostos que absorvem radiação aos 266 nm nas diferentes amostras. É evidente a existência de um gradiente, sendo a concentração destes compostos mais elevada no efluente e menor na referência com uma diminuição progressiva à medida que a amostra se afasta do ponto de descarga do efluente. Com o objetivo de avaliar a presença de SMZ e CBZ e fazer a atribuição dos picos respectivos, a amostra do meio recetor foi fortificada com uma solução de CBZ e SMZ de concentração 5,0  $\mu\text{M}$ . O resultado obtido está representado na Figura 38 (Anexo C contém as figuras sem a linha de base descontada).



**Figura 38** - Cromatograma a 266 nm obtido para a amostra meio recetor (—), e após a sua fortificação com 5  $\mu\text{M}$  de sulfametoxazol (A) e carbamazepina (B) (—).

Após a fortificação da amostra meio recetor é possível identificar os dois picos correspondente à CBZ e SMZ. Desta forma, procedeu-se à quantificação dos dois analitos, em todos os 500 mL de cada amostra, com base na respetiva curva de calibração (Tabela 12).

**Tabela 12** – Concentrações de sulfametoxazol e carbamazepina nas amostras.

Amostras	Concentração (µg/L)	
	Sulfametoxazol	Carbamazepina
Referência	ND *	ND *
Efluente	1,64	1,53
Meio Recetor	1,26	0,68
300 metros	0,45	0,58
600 metros	0,13	0,17

\*ND – Valor não determinado

Não foi observada a presença de nenhum dos dois analitos na amostra de referência até ao limite de deteção do método utilizado. No entanto, em todos os outros pontos de amostragem foi possível detetar e quantificar a CBZ e o SMZ. É visível um gradiente natural em ambas as substâncias, sendo a amostra de referência a menos tóxica e a amostra de efluente a mais tóxica, pois apresenta uma maior concentração.

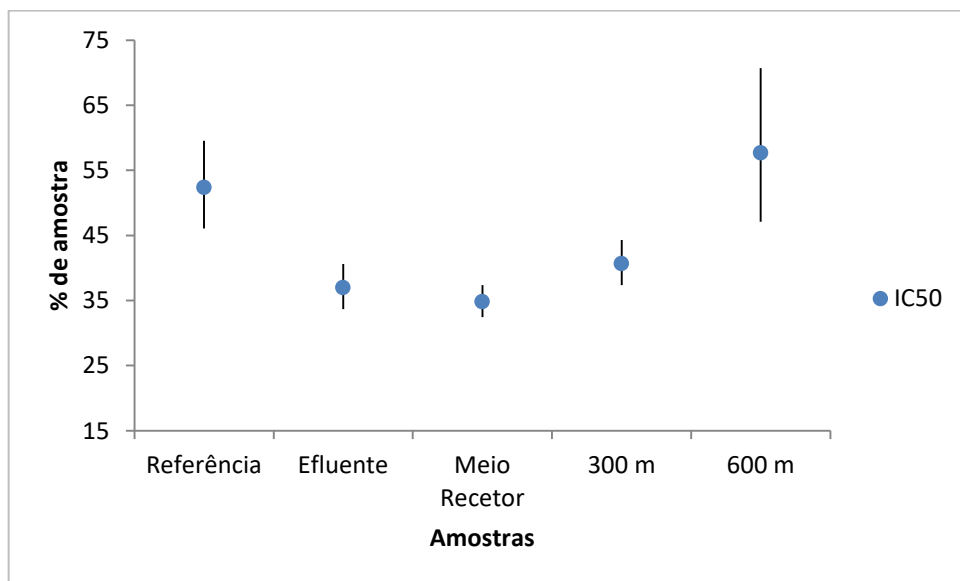
A CBZ e o SMZ são utilizados para funções biológicas específicas em medicina e a sua quantificação no ambiente (valor de exposição) permite determinar os potenciais efeitos adversos nos organismos aquáticos. Uma vez que a concentração máxima obtida para a CBZ e para o SMZ medida na água superficial do rio Mondego foi de 0,68 µg/L e 1,26 µg/L, respetivamente, e os PNECs são 31,6 µg/L e 0,146 µg/L (Younghee et al., 2007),<sup>54</sup> respetivamente, podemos concluir que o SMZ, neste rio, coloca risco para os organismos aquáticos e para o meio, uma vez que QR >1. De referir, no entanto, que a 600 m do local de descarga os valores das concentrações de ambos os analitos são já inferiores aos PNECs conhecidos.



### 3.3 Toxicidade ao nível da célula

Todos os ensaios foram aceites (validados), uma vez que o CV nunca excedeu os 20%, critério de aceitação definido para o ensaio. O desenho experimental escolhido para os ensaios feitos com as amostras recolhidas em Dezembro de 2016 não permitiu obter valores de  $IC_{50}$ , uma vez que não houve inibição da proliferação celular suficiente para o seu cálculo com as concentrações estudadas. Os ensaios foram repetidos com amostras recolhidas em Maio de 2017, aumentando-se tanto a concentração como o tempo de exposição. Os resultados aceites para o trabalho foram os obtidos com exposição de 72 horas e não foi considerado o resultado do poço com maior concentração uma vez que a cor do meio de cultura deste poço, em todos os ensaios, apresentava no final dos ensaios cor amarela, indicativo de variação de pH fora dos valores ótimos de crescimentos das células.

Para todas as amostras foram obtidos valores de  $IC_{50}$  e intervalos de confiança (IC) a 95% que estão representados na Figura 39.



**Figura 39** - Resultados dos  $IC_{50}$  e respetivos intervalos de confiança a 95% para cada amostra analisada.

Visualmente, pela análise do gráfico, pode verificar-se que para algumas das situações os intervalos de confiança se sobrepõem. Deste modo, realizou-se um teste estatístico de

hipóteses, analisando individualmente cada uma das seis réplicas de cada amostra. Na Tabela 13 encontram-se os resultados obtidos.

**Tabela 13** – Resultados do teste estatístico de hipóteses.

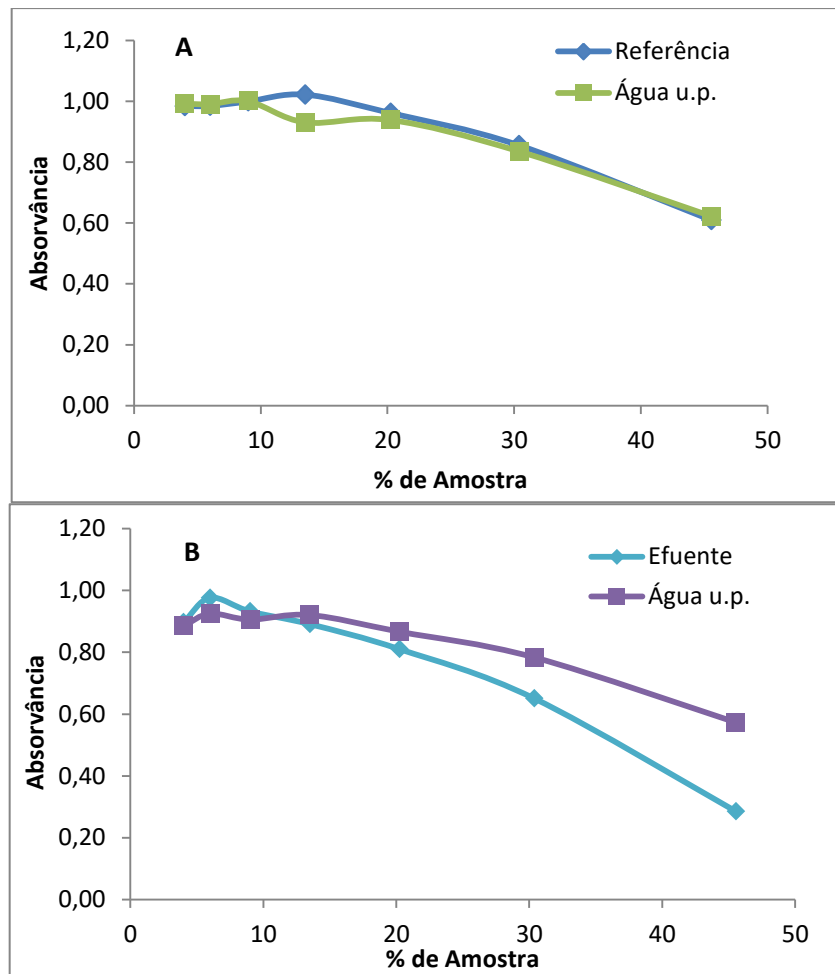
Amostras	Referência	Efluente	Meio recetor	300 m	600 m
Referência		≠	≠	≠	=
Efluente			=	=	≠
Meio recetor				=	≠
300 metros					≠
600 metros					

≠ - Amostras estatisticamente diferentes.

= - Amostras estatisticamente iguais.

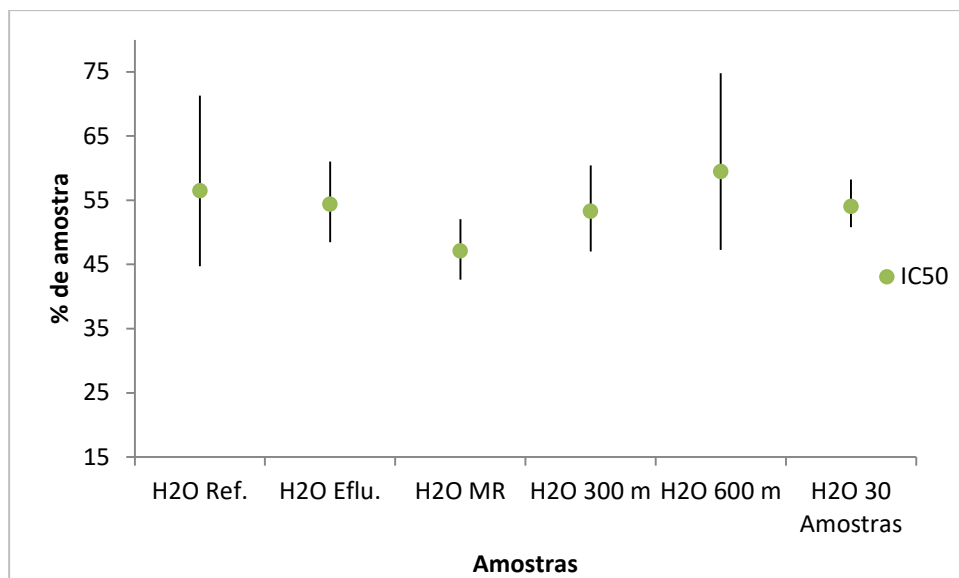
Pela análise dos resultados, podemos observar que as amostras de efluente, meio recetor e 300 metros são estatisticamente iguais entre si e estatisticamente diferentes da referência e 600 metros, que por sua vez também são estatisticamente iguais entre si. Deste modo, os resultados de toxicidade ao nível da célula só conseguem discriminar as amostras com maior contaminação (efluente, meio recetor e 300 metros) das menos contaminadas (referência e 600 metros).

Relativamente aos resultados de absorvâncias obtidos no ensaio com água u.p. em vez de amostra, estes mostram que só a matriz água presente em todas as amostras produz um efeito nas células muito próximo do das amostras (Figura 40).



**Figura 40** - Resultados obtidos nos ensaios com água ultrapura e amostra Referência (A) ou Efluente (B).

Os  $IC_{50}$  e limites de confiança a 95% para os controlos com água ultrapura realizados em cada placa correspondente a uma amostra e determinados no GraphPad Prism são apresentados na Figura 41, juntamente com o  $IC_{50}$  determinado conjuntamente para todos os controlos com água ultrapura (correspondente a 30 réplicas) para, assim, se verificar se existem diferenças. Visualmente os resultados indiciam não haver diferenças.



**Figura 41** - Resultados dos IC<sub>50</sub> e respectivos intervalos de confiança a 95% para o controlo de água ultrapura nas placas correspondentes às análises das diferentes amostras.

Realizou-se, ainda, um teste estatístico de hipóteses para saber se os resultados obtidos com o controlo de água u.p. são estatisticamente diferentes ou iguais aos resultados obtidos com as amostras. O resultado do teste permitiu concluir que os resultados obtidos com a água u.p. são estatisticamente iguais aos obtidos com as amostras R e 600 metros, e estatisticamente diferentes dos obtidos para o E, MR e 300 metros, o que mostra que as três amostras referidas apresentam um nível mais elevado de toxicidade, corroborado pelos resultados da caracterização físico-química das amostras.

# Capítulo 4

---

## Conclusão



## Capítulo 4

### Conclusão

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar se o gradiente químico obtido pela análise físico-química de cinco amostras e avaliado de acordo com vários parâmetros e segundo a legislação Portuguesa é captado ao nível da célula utilizando o ensaio de toxicidade SRB e a linha celular H9c2. Para a caracterização físico-química foram analisados vários parâmetros, alguns regulamentados para águas superficiais e residuais e ainda foi validado um método analítico de HPLC para a quantificação de CBZ e SMZ. Em relação aos parâmetros físico-químicos analisados, todos cumprem os valores limites exigidos por lei, à exceção do azoto total, para o efluente, e azoto amoniacal, para as amostras recolhidas no Rio Mondego e efluente, que apresentam valores acima dos permitidos por lei. Também o teor de nitratos no efluente, apenas em Dezembro, a 300 metros, apenas em Maio, e no meio receptor, em Maio e Dezembro, é superior ao valor estipulado por lei. A validação do método de HPLC incluiu o estudo de diversos parâmetros, nomeadamente, gama de trabalho e linearidade, limites de deteção e de quantificação, precisão e exatidão. Todos os parâmetros foram validados e foi possível a quantificação da CBZ e SMZ nas várias amostras. A caracterização físico-química das amostras analisadas mostrou para a maioria dos parâmetros o seguinte gradiente: Referência → 600 metros → 300 metros → Meio Recetor → Efluente.

A concentração de amostra necessária para inibir 50% da multiplicação celular ( $IC_{50}$ ) foi determinada para cada amostra e aplicou-se um teste estatístico de hipóteses para saber quais as amostras que eram estatisticamente iguais ou diferentes. Conclui-se que as amostras de efluente, meio recetor e 300 metros são estatisticamente iguais entre si e estatisticamente diferentes da referência e 600 metros, que, por sua vez, também são estatisticamente iguais entre si. Assim, podemos concluir que os resultados de toxicidade ao nível da célula só conseguem discriminar as amostras com maior evidência de contaminação (efluente, meio

recetor e 300 metros) das menos contaminadas (referência e 600 metros). Este facto pode ser devido ao método utilizado na preparação das diluições utilizadas nos ensaios, por adição direta sem ajuste dos constituintes do meio. Apesar de se apresentar um método muito simples para se usar em ensaios de rotina, com os resultados do presente trabalho foi possível concluir não ser adequado por não deixar evidenciar a toxicidade ao nível da célula de outros possíveis compostos presentes nas amostras. Deste modo, num futuro trabalho será necessário verificar se o efeito só da matriz água é anulado quando se ajusta os constituintes do meio, permitindo evidenciar a toxicidade potencialmente presente nas amostras. Com esta alteração será também possível utilizarem-se diluições superiores, evitando a utilização do modelo matemático obrigando o limite inferior a ser zero, o que conduz a uma maior confiança nos resultados obtidos para o  $IC_{50}$ .



---

# Bibliografia



# Bibliografia

1. G. Castillo Morales, *Ensayos toxicologicos y metodos de evaluacion de calidad de aguas*, 1st ed. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004.
2. D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton, and J. Cairns, *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd ed. CRC Press, 2002.
3. A. Arenzon, T. J. P. Neto, and W. Gerber, *Manual sobre Toxicidade em efluentes industriais*. 2011
4. B. Eklund, "Review of the use of *Ceramium tenuicorne* growth inhibition test for testing toxicity of substances, effluents, products sediment and soil," *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 195, pp. 88–97, 2016.
5. F. Valverde, F. J. Romero-Campero, R. León, M. G. Guerrero, and A. Serrano, "New challenges in microalgae biotechnology," *Eur. J. Protistol.*, vol. 55, pp. 95–101, 2016.
6. Animal Diversity Web "*Danio rerio*" [Online]. Available: [http://animaldiversity.org/accounts/Danio\\_rerio/pictures/](http://animaldiversity.org/accounts/Danio_rerio/pictures/) [Accessed: 22-Apr-2017].
7. C. R. Costa, P. Olivi, C. M. R. Botta, and E. L. G. Espindola, "A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação," *Quim. Nova*, vol. 31, no. 7, pp. 1820–1830, 2008.
8. D. D. P. Magalhães and S. Ferrão, "A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos," *Oecologia Aust.*, vol. 12, no. 3, pp. 355–381, 2008.
9. J. Oliveira *et al.*, *Projecto AQUARIPORT: Programa Nacional de Monitorização de Recursos Piscícolas e de Avaliação da Qualidade Ecológica de Rios.*, 2007.
10. J. Wixon, "Danio Rerio, the Zebrafish," *Yeast*, vol. 17, no. 3, pp. 225–231, 2000.
11. C. Lawrence, "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review," *Aquaculture*, vol. 269, no. 1–4, pp. 1–20, 2007.
12. Directiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. Jornal Oficial da União Europeia.
13. Comissão Europeia, "*Sétimo relatório de dados estatísticos sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia COM(2013) 859 final*", 2013.
14. Direção Geral de Alimentação e veterinária "Animais para fins experimentais – Dados estatísticos anuais" [Online]. Available: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=1149097&cboui=1149097> [Accessed: 5-Apr-2017].

15. J. Lenčo *et al.*, "Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model," *Exp. Cell Res.*, vol. 339, no. 2, pp. 174–186, 2015.
16. N. I. Kramer, J. L. M. Hermens, and K. Schirmer, "The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data," *Toxicol. Vitr.*, vol. 23, no. 7, pp. 1372–1379, 2009.
17. A. Castaño *et al.*, "The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47.," *Altern. to Lab. Anim. ATLA*, vol. 31, no. 3, p. 317, 2003.
18. E. T. Rodrigues, M. Pardal, V. Laizé, M. L. Cancela, P. J. Oliveira, and T. L. Serafim, "Cardiomyocyte H9c2 cells present a valuable alternative to fish lethal testing for azoxystrobin," *Environ. Pollut.*, vol. 206, pp. 619–626, 2015.
19. P. Houghton, R. Fang, I. Techatanawat, G. Steventon, P. J. Hylands, and C. C. Lee, "The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity," *Methods*, vol. 42, no. 4, pp. 377–387, 2007.
20. Administração da Região Hidrográfica do Centro, I.P., "*Plano de gestão das bacias hidrográficas do Vouga, Mondego e Lis*", Ministério da agricultura, mar, ambiente e ordenamento do território", 2011.
21. S. M. F. Leonardo, "*Caracterização do Digestor Anaeróbio de Lamas Biológicas da ETAR do Choupal, em Coimbra*", Dissertação de Mestrado em Processos Químicos e Biológicos: Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2012.
22. C. S. F. L. Mendes, "*Valorização Energética de Biogás por pilha de combustível*", Dissertação de Mestrado em Engenharia e Gestão do Ambiente: Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, 2009.
23. A. C. M. Quinteiro, "*Análise da eficiência relativa de remoção dos leitos percoladores da ETAR do Choupal*", Dissertação de Mestrado em Processos Químicos e Biológicos: Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2012.
24. D. Daneluz and D. Tessaro, "Padrão físico-químico e microbiológico da água de nascentes e poços rasos de propriedades rurais da região sudoeste do Paraná," *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*, vol. 82, pp. 1–5, 2015.
25. Z.-G. Ji, *Hydrodynamics and Water Quality: Modeling Rivers, Lakes, and Estuaries*, 2nd ed. Wiley, 2008.
26. M. E. Neto, W. O. Silva, F. C. Rameiro, E. S. Nascimento, and A. D. S. Alves, "Análises Físicas , Químicas E Microbiológicas Das Águas Do Balneário Veneza Na Bacia

- Hidrográfica Do Médio Itapecuru , Ma,” *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).*, vol. 79, no. 3, pp. 397–403, 2012
27. A. C. Twort, D. D. Ratnayaka, and M. J. Brandt, *Water Supply*, 5th ed. Butterworth-Heinemann, 2000.
  28. T. Harter, L. Rollins, and U. C. D. A. N. Resources, *Watersheds, Groundwater and Drinking Water: A Practical Guide*. University of California Agriculture and Natural Resources, 2008
  29. P. Viana, “Substâncias Prioritárias e Compostos Emergentes nas Águas Superficiais”, Agência Portuguesa do Ambiente, 2016.
  30. F. G. F. Oliveira *et al.*, “Determinação simplificada de carbamazepina, fenitoína e lamotrigina em plasma e monitorização terapêutica por HPLC/PDA,” *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.*, vol. 34, no. 4, pp. 519–526, 2013.
  31. INFARMED, “Pesquisa do medicamento.” [Online]. Available: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento>. [Accessed: 23-Apr-2017].
  32. G. A. Cordeiro, P. Peralta-Zamora, N. Nagata, and R. Pontarollo, “Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada,” *Quim. Nova*, vol. 31, no. 2, pp. 254–260, 2008.
  33. M. Gros, M. Petrovic, and D. Barceló, “Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters,” *Talanta*, vol. 70, no. 4, pp. 678–690, 2006.
  34. M. C. Dodd and C. H. Huang, “Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: Kinetics, mechanisms, and pathways,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 21, pp. 5607–5615, 2004.
  35. S. A. S. Melo, A. G. Trovó, I. R. Bautitz, and R. F. P. Nogueira, “Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados,” *Quim. Nova*, vol. 32, no. 1, pp. 188–197, 2009.
  36. D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed. Cengage Learning, 2002.
  37. The Lindle Group “Analytical Methods, High performance liquid chromatograph” [Online]. Available: [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html). [Accessed: 29-Apr-2017].
  38. M. C. McMaster, *HPLC A Practical User 's Guide*, 2nd ed. Wiley, 2007.
  39. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. Wiley, 2011.
  40. R. B. Chust, “Introdução à Cromatografia de Líquidos,” *Bol. Soc. Port. Química*, pp. 43–54,

1990

41. W. Barrionuevo and F. Laças, "Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water.," *Quim. Nova*, vol. 24, no. 2, pp. 172–175, 2001.
42. I. Jardim, "Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas," *Sci. Chromatogr.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–25, 2010.
43. V. F. Samanidou, E. A. Christodoulou, and I. N. Papadoyannis, "Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction," *J. Sep. Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 555–565, 2005.
44. F. Berrueta, LA and Gallo, B and Vicente, "A review of solid phase extraction: basic principles and new developments," *Chromatographia*, vol. 40, no. 7-8, pp. 474–483, 1995.
45. Sigma-Aldrich, "Guide to Solid Phase Extraction - bulletin 910," 1998.
46. John Morris Scientific "Solid Phase Extraction" [Online]. Available: <http://www.johnmorris.com.au/Solid-Phase-Extraction-Automated/ASPEC-C18-50mg-1ml.aspx?pd=181238&CategoryID=1302> [Accessed: 29-Apr-2017].
47. L. Huber, "Validation of Analytical Methods," *Agil. Technol.*, 2010.
48. S. Scientific Working Group for Forensic Toxicology, "Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," pp. 1–52, 2013.
49. RELACRE, Guia Relacre 13, *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Portugal, 2000.
50. International Conference on Harmonisation (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1995
51. A. P. H. A., *Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, 2012.
52. A. M. Almeida, M. M. Castel-Branco, and A. C. Falcão, "Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 774, no. 2, pp. 215–222, 2002.
53. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, *Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais - Rios e Albufeiras*. 2009.
54. Y. Kim, K. Choi, J. Jung, S. Park, P. G. Kim, and J. Park, "Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea," *Environ. Int.*, vol. 33, no. 3, pp. 370–375, 2007.

---

# Anexos





# Anexos

## Anexo A – Recipientes para colheita de águas residuais e superficiais

Tabela A1 – Recipientes recomendados para a recolha das amostras.

Parâmetros	Recipiente	
	Águas residuais	Águas superficiais
<b>Azoto Amoniacal</b>	PET ou Vidro	PET ou Vidro
<b>Azoto Total</b>	PET ou Vidro	PET ou Vidro
<b>Nitratos</b>	PET ou Vidro	PET ou Vidro
<b>Fósforo Total</b>	PET ou Vidro	PET ou Vidro
<b>Fosfatos</b>	PET ou Vidro	PET ou Vidro
<b>Carência Bioquímica de Oxigénio</b>	Vidro	Vidro
<b>Carência Química de Oxigénio</b>	Vidro	Vidro
<b>Sólidos Suspensos Totais</b>	PET	PET



## Anexo B – Estudo dos fatores de ponderação para o sulfametoxazol e carbamazepina

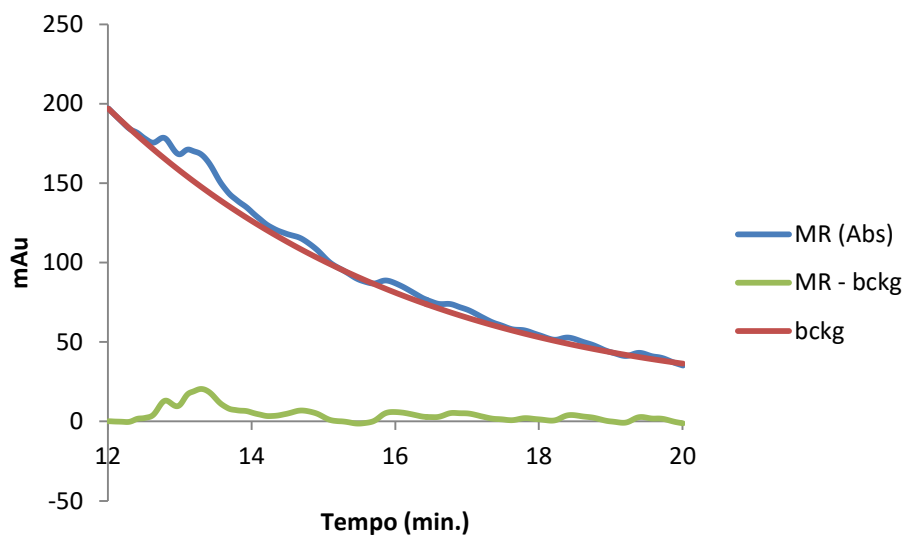
Tabela B1 – Estudo dos fatores de ponderação para o sulfametoxazol.

Sulfametoxazol					
Dia		1	2	3	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	$w = 1/x$	20,77	21,05	37,27	26,36
	$w = 1/x^2$	15,76	13,51	26,78	18,69
	$w = 1/x^{1/2}$	31,81	40,30	46,01	39,37
	$w = 1/y$	24,41	27,40	38,29	30,03
	$w = 1/y^2$	15,72	13,88	28,21	19,27
	$w = 1/y^{1/2}$	36,81	47,32	51,35	45,16
Dia		1	2	3	Média $R^2$
$R^2$	$w = 1/x$	0,99963	0,99922	0,99934	0,99940
	$w = 1/x^2$	0,99848	0,99846	0,99515	0,99736
	$w = 1/x^{1/2}$	0,99988	0,99970	0,99984	0,99981
	$w = 1/y$	0,99965	0,99920	0,99948	0,99944
	$w = 1/y^2$	0,99881	0,99821	0,99690	0,99797
	$w = 1/y^{1/2}$	0,99989	0,99970	0,99986	0,99982
Normalização		$\Sigma$ res	(1- $R^2$ )	Soma	
Fatores	$w = 1/x$	-0,32	-0,41	<b>-0,74</b>	
	$w = 1/x^2$	-1,04	1,54	0,50	
	$w = 1/x^{1/2}$	0,89	-0,81	0,08	
	$w = 1/y$	0,02	-0,46	-0,44	
	$w = 1/y^2$	-0,98	0,96	-0,03	
	$w = 1/y^{1/2}$	1,43	-0,82	0,62	

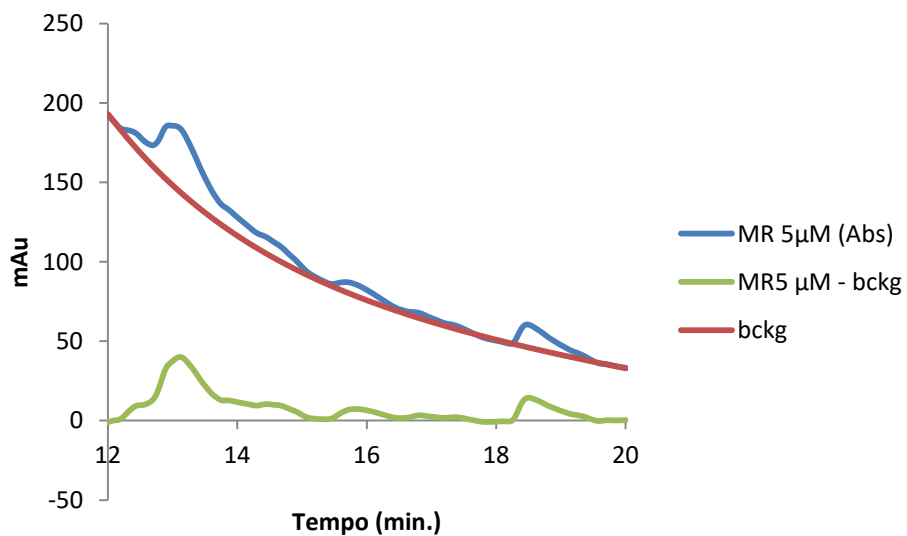
**Tabela B2** – Estudo dos fatores de ponderação para a carbamazepina.

<b>Carbamazepina</b>						
<b>Dia</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média <math>\Sigma</math> res (%)</b>	
<b><math>\Sigma</math> res (%)</b>	$w = 1/x$	19,58	23,06	19,48	20,71	
	$w = 1/x^2$	14,78	15,91	11,28	13,99	
	$w = 1/x^{1/2}$	29,32	35,77	36,15	33,75	
	$w = 1/y$	22,44	25,52	24,01	23,99	
	$w = 1/y^2$	15,62	16,56	11,32	14,50	
	$w = 1/y^{1/2}$	31,98	40,84	40,72	37,84	
<b>Dia</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média <math>R^2</math></b>	
<b><math>R^2</math></b>	$w = 1/x$	0,99961	0,99956	0,99954	0,9996	
	$w = 1/x^2$	0,99857	0,99813	0,99905	0,9986	
	$w = 1/x^{1/2}$	0,99986	0,99988	0,99985	0,9999	
	$w = 1/y$	0,99961	0,99959	0,99955	0,9996	
	$w = 1/y^2$	0,99856	0,99832	0,99897	0,9986	
	$w = 1/y^{1/2}$	0,99986	0,99989	0,99985	0,9999	
<b>Normalização</b>		<b><math>\Sigma</math> res</b>	<b>(1-<math>R^2</math>)</b>	<b>Soma</b>		
<b>Fatores</b>	$w = 1/x$	-0,35	-0,38	<b>-0,72</b>		
	$w = 1/x^2$	-1,03	1,29	0,26		
	$w = 1/x^{1/2}$	0,97	-0,87	0,10		
	$w = 1/y$	-0,01	-0,40	-0,42		
	$w = 1/y^2$	-0,98	1,23	0,26		
	$w = 1/y^{1/2}$	1,39	-0,87	0,51		

## Anexo C – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



**Figura C1** - Cromatograma a 266 nm obtido para a amostra meio recetor (MR) com indicação da linha de base (bckg).



**Figura C2** - Cromatograma a 266 nm obtido para a amostra meio recetor (MR) fortificada com 5 µM de carbamazepina e sulfametoxazol, com indicação da linha de base (bckg).