

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da
Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região
Marinha e Costeira Adjacente**

A3MHS1 – Material Suplementar 1

Anexo 3 Marinho - Hidrogeoquímica

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/Fest-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

SUMÁRIO

1	METODOLOGIA.....	2
1.1	MALHA AMOSTRAL.....	2
1.2	PROCEDIMENTOS DE COLETA EM CAMPO.....	4
1.2.1	<i>Matriz coluna d'água.....</i>	4
1.2.2	<i>Matriz sedimento superficial.....</i>	7
1.3	PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE EM LABORATÓRIO.....	8
1.3.1	<i>Matriz coluna d'água.....</i>	8
1.3.2	<i>Matriz sedimento superficial.....</i>	27
1.4	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO.....	43
1.5	CÁLCULOS DO INDICADOR DE EUTROFIZAÇÃO COSTEIRA (ICEP).....	46
1.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
2	REFERÊNCIAS	48

1 METODOLOGIA

1.1 MALHA AMOSTRAL

No contexto do monitoramento marinho desenvolvido pelo subprojeto da Hidrogeoquímica (Anexo 3), a malha amostral regular foi composta por 41 estações, em que foram realizadas campanhas de amostragem em periodicidades mensal, trimestral e semestral. As coletas de frequência mensal incluíram as estações distribuídas na Foz do Rio Doce (siglas SD, SDS e SDN), a frequência trimestral abrangeu as estações dos setores Costa das Algas, Foz do Rio Doce e Setor Norte (siglas CA; SD, SDS e SDN; DEG, BS, BN, CB e ITA), enquanto as campanhas semestrais incluíram a malha amostral completa, contemplando os setores Costa das Algas, Foz do Rio Doce, Setor Norte e Setor Abrolhos (siglas CA; SD, SDS e SDN; DEG, BS, BN, CB e ITA; MUC e ABR) (Figura 1). Nessas estações, foram realizadas coletas de amostras de água e sedimento superficial para as análises de nutrientes, metais e compostos orgânicos.

Além das estações regulares, foram definidos pontos prioritários em que foram avaliados parâmetros adicionais, dentre eles as análises de compostos orgânicos na água, metais lábeis (DGT) na água, análise isotópica e especiação de metais e fósforo no sedimento (siglas destacadas em amarelo; Figura 1). A relação dos parâmetros monitorados nas matrizes coluna d'água e sedimento superficial para as estações regulares e prioritárias está apresentada na Tabela 1. Com relação às mudanças da malha amostral em comparação ao Ano 1, foi realizada a realocação dos extintos pontos prioritários do Setor Sul (VIX 01 e GUA 01) e ABR 02 para os novos pontos SDN 29, BS 01 e MUC 01.

Figura 1: Malha amostral do subprojeto Hidrogeoquímica (Anexo 3). Siglas destacadas em amarelo representam os pontos prioritários.

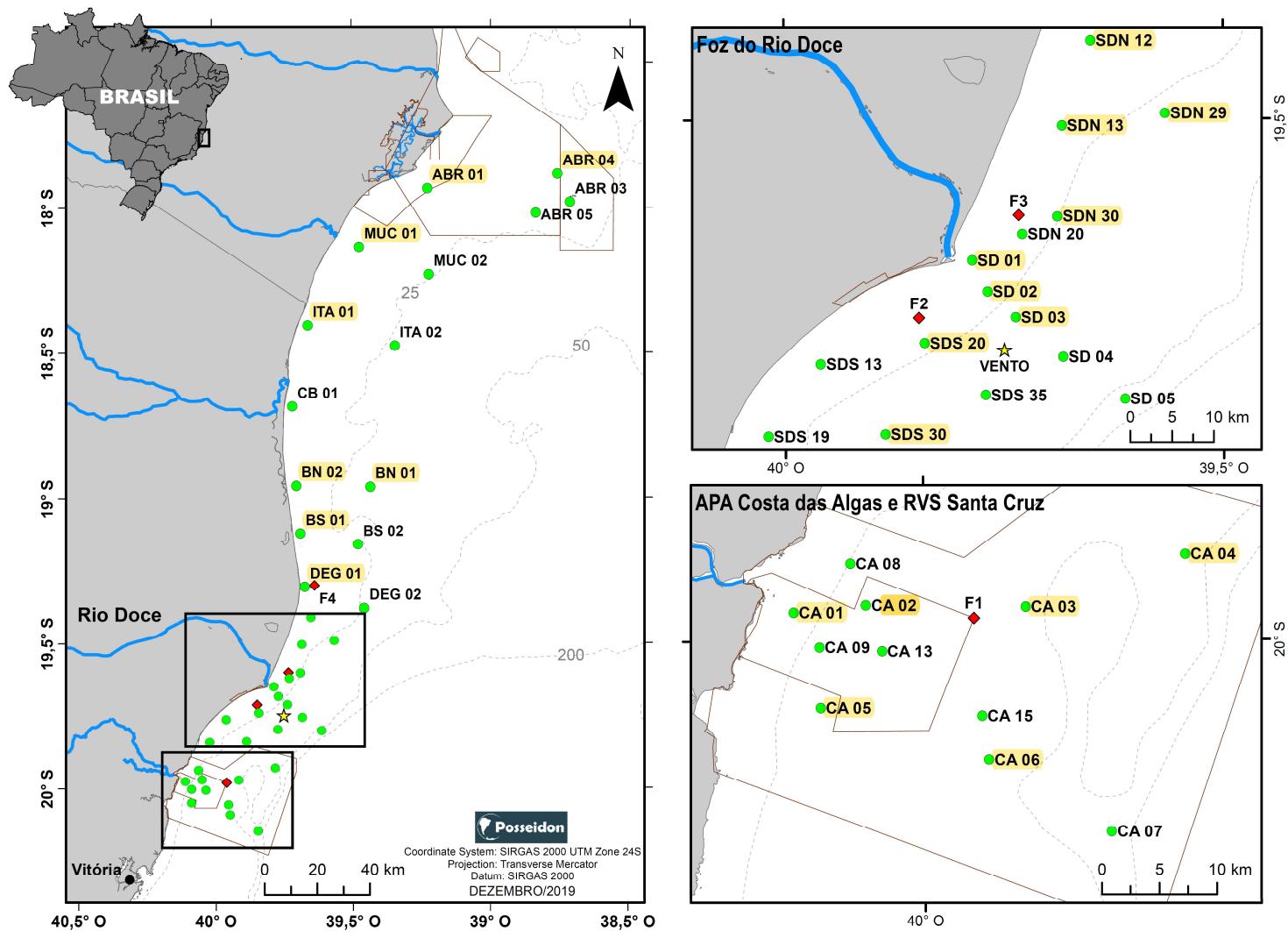


Tabela 1: Relação dos parâmetros monitorados pelo subprojeto da Hidrogeoquímica nas estações regulares e prioritárias.

MATRIZ COLUNA D'ÁGUA	
Estações regulares	<ul style="list-style-type: none"> Nutrientes (NT, PT, N-amoniaco, Si, ortofosfato, nitrito, nitrato) Compostos orgânicos (Matéria orgânica dissolvida) Metais (água total, dissolvida e particulada) Elementos Terras Raras (particulado)
Estações prioritárias	<ul style="list-style-type: none"> Nutrientes (NT, PT, N-amoniaco, Si, ortofosfato, nitrito, nitrato) Compostos orgânicos (hidrocarbonetos alifáticos, HPAs, esteróis, ácidos graxos, PCBs, pesticidas, contaminantes emergentes, fenóis, amins e matéria orgânica dissolvida) Metais (água total, dissolvida e particulada) Elementos Terras Raras (particulado) Isótopos estáveis (particulado)
MATRIZ SEDIMENTO SUPERFICIAL	
Estações regulares	<ul style="list-style-type: none"> Metais e metalóide Elementos Terras Raras Compostos orgânicos (hidrocarbonetos alifáticos, HPAs, esteróis, ácidos graxos, PCBs, pesticidas, contaminantes emergentes, fenóis e amins) Análise Elemental (C, N, S)
Estações Prioritárias	<ul style="list-style-type: none"> Metais e metalóide Elementos Terras Raras Compostos orgânicos (hidrocarbonetos alifáticos, HPAs, esteróis, ácidos graxos, PCBs, pesticidas, contaminantes emergentes, fenóis e amins) Análise Elemental (C, N, S) Especiação de metais Especiação de fósforo Isótopos estáveis (C, N)

1.2 PROCEDIMENTOS DE COLETA EM CAMPO

1.2.1 Matriz coluna d'água

➤ Procedimentos gerais para a coleta de amostras de água

A coleta das amostras de água ao longo da coluna d'água foi realizada com o auxílio de garrafas coletoras, não metálicas e ativadas por mensageiro, com a denominação de superfície (0 a 15 cm) e fundo (cerca de 50 cm acima do fundo). As amostras foram transferidas para os frascos de armazenamento (previamente descontaminadas) com o mínimo de perturbação possível e auxílio de

mangueiras de silicone. Durante todo o procedimento de coleta, luvas sem talco (nitrila) foram utilizadas para evitar contaminação das amostras.

a) Nutrientes

As amostragens para análise dos nutrientes dissolvidos na coluna d'água foram realizadas mensalmente para a determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, nitrogênio total, fosfato, fósforo total e silício.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de nutrientes

Foram utilizados frascos de polietileno, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita, e tampa de rosca. Para determinação dos nutrientes dissolvidos foram coletados 1000 ml de água. O processo de limpeza e descontaminação dos frascos para nutrientes foi realizado a partir de solução 1:1 de ácido clorídrico P.A., água desmineralizada e água ultrapura.

➤ Preservação e conservação das amostras para nutrientes a bordo

Para a preservação das amostras de nutrientes dissolvidos a bordo, as garrafas contendo as amostras após a coleta foram congeladas antes de seguirem para o laboratório. As mesmas foram analisadas até, no máximo 2 dias após a coleta para nitrogênio amoniacal e 5 dias para os demais nutrientes dissolvidos.

b) Metais

As coletas de água para análise dos metais na coluna d'água foram realizadas mensalmente, e contemplaram análises de metais totais, metais dissolvidos, mercúrio total e mercúrio dissolvido, além dos metais e mercúrio associados ao material particulado.

Metais totais podem ser definidos pelo teor total dos metais presentes na amostra de água, representando a fração solúvel somada à fração particulada. Os metais dissolvidos podem ser definidos pelo teor de metais presentes na amostra de água previamente filtrada em membranas de 0,45 µm, não contemplando, assim, a fração particulada.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de metais

Foram utilizados frascos de polipropileno, todos de primeiro uso, descontaminados, de boca estreita e tampa de rosca. Os frascos foram descontaminados com solução 1:1 de ácido nítrico P.A. e enxaguados com água desmineralizada e água ultrapura. Cada parâmetro foi coletado em frascos separados, seguindo as seguintes proporções:

- 1000 ml de amostras para determinação de metais associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;
- 1000 ml de amostras para determinação de mercúrio associado ao material particulado em suspensão e fração dissolvida;

- 500 ml de amostra para determinação de metais totais;
- 500 ml para determinação de metais dissolvidos.
- 500 ml para determinação de mercúrio total;
- 500 ml para determinação de mercúrio dissolvido.

➤ Preservação e conservação das amostras para metais a bordo

As amostras para metais totais foram preservadas pela adição de gotas de solução de ácido nítrico *suprapur* até pH < 2 e, em seguida, refrigeradas a 4°C até o momento da análise. As amostras para metais dissolvidos foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade, antes de serem acidificadas (mesmo procedimento acima). O material usado para filtração foi descontaminado conforme procedimento anteriormente descrito.

c) Compostos orgânicos

As coletas das amostras de água para análise dos compostos orgânicos foram realizadas mensalmente e contemplaram os seguintes parâmetros: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), biomarcadores lipídicos, ácidos graxos, pesticidas, PCBs, contaminantes emergentes, fenóis, aminas e matéria orgânica dissolvida.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de compostos orgânicos

Foram utilizados frascos de vidro âmbar de 1 e 4 litros, descontaminados, de boca estreita, com batoque de vedação e tampa de rosca. Os frascos foram descontaminados com água ultrapura, acetona grau ultrapuro e diclorometano grau ultrapuro. Cada parâmetro foi coletado em frascos separados e identificados, seguindo as seguintes proporções:

- 8000 mL de amostras para determinação de hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros biomarcadores lipídicos; e determinação de pesticidas e PCBs;
- 4000 mL de amostras para determinação de compostos emergentes.
- 1000 mL de amostras para a determinação de fenóis.
- 1000 mL de amostras para a determinação de aminas.

➤ Preservação e conservação das amostras para orgânicos a bordo

As amostras para parâmetros orgânicos foram colocadas em geladeira ou isopor com gelo e mantidas a 4 °C (não congeladas) imediatamente após a coleta. Estas foram posteriormente estocadas a 4 °C no escuro e extraídas até 7 dias após a coleta.

d) Isótopos estáveis (C, N) no material particulado

Os procedimentos de coletas seguiram o mesmo descrito na sessão de nutrientes dissolvidos, sendo as amostras de água armazenadas em frascos de polipropileno previamente descontaminados com solução 1:1 de ácido clorídrico P.A., água desmineralizada e água ultrapura.

➤ Preservação e conservação das amostras para isótopos (particulado)

As amostras foram mantidas resfriadas em temperaturas aproximadamente de 4 °C até a chegada em laboratório. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade (previamente secas e pesadas) e os filtros mantidos congelados até o momento da análise.

1.2.2 Matriz sedimento superficial

➤ Procedimentos gerais para a coleta de amostras de sedimento superficial

A coleta das amostras de sedimento foi realizada utilizando-se amostrador do tipo busca fundo (Van Veen). Toda a manipulação do material de coleta e amostras foi realizada mediante a utilização de luvas sem talco (nitrila).

a) Nutrientes

Para determinação de especiação de fósforo no sedimento, as sub-amostras de sedimento foram coletadas do material dragado com o auxílio de espátulas de polietileno, acondicionadas em potes plásticos e refrigeradas para posterior determinação em laboratório.

b) Metais

As coletas de sedimento superficial para análises de metais parciais e mercúrio foram realizadas mensalmente.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de metais

Foram utilizados potes de polietileno, todos de primeiro uso, previamente descontaminados novos com solução 1:1 de ácido nítrico P.A., água desmineralizada e água ultrapura.

➤ Preservação e conservação das amostras para metais a bordo

O material para análise foi retirado da parte central do sedimento dragado, no intervalo máximo de até 5 cm abaixo da camada mais externa com o auxílio de espátula de plástico descontaminada. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em potes de plástico (polietileno) descontaminados, congeladas e mantidas em freezer até o momento de análise.

➤ Elementos terras raras

Foi utilizado parte de sedimento liofilizado, obtido através da coleta de sedimentos para metais parciais, segundo especificações apresentadas anteriormente.

c) Compostos orgânicos

O sedimento superficial foi coletado mensalmente para análise dos compostos orgânicos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), biomarcadores lipídicos, ácidos graxos, pesticidas, PCBs, contaminantes emergentes, fenóis e aminas.

➤ Recipientes para armazenamento das amostras de compostos orgânicos

As amostras de sedimento para análise de compostos orgânicos foram acondicionadas em recipientes de alumínio e estocadas em freezers até a desmobilização e envio para o laboratório. Todo o material utilizado durante a coleta (recipientes de alumínio e espátulas de inox) foi previamente descontaminado através de calcinação em mufla a 450°C por 6 h e posterior rinsagem com cloreto de metileno grau ultrapuro.

➤ Preservação e conservação das amostras para orgânicos a bordo

O sedimento para as análises de compostos orgânicos foi retirado da porção superficial do material dragado, utilizando espátulas de aço inox e armazenadas nos recipientes de alumínio descontaminados. As amostras foram preservadas sob refrigeração a 4 °C até seu pré-processamento. Em laboratório, as amostras foram liofilizadas, armazenadas em potes de alumínio (calcinado) e alíquotas (cerca de 10g de amostra seca) reservadas para posterior análise e determinação de hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos, esteróis, ácidos graxos, fenóis, aminas, pesticidas e PCBs.

d) Elementar (C, N e S) e Isótopos estáveis (C e N)

Amostras de 100 g de sedimento foram coletadas em potes plásticos previamente lavados com água ultrapura. Essas amostras foram transportadas em *cooler* com gelo reciclável para o laboratório, secas em estufa a 50 °C e acondicionadas em tubos Falcon. Antes da análise, as amostras foram transferidas em cápsulas de estanho e fechadas.

1.3 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE EM LABORATÓRIO

1.3.1 Matriz coluna d'água

a) Nutrientes

As análises de nutrientes dissolvidos e N e P totais foram realizadas através do Autoanalyzer (SEAL Analytical) AA3 de fluxo de segmentação contínua. A amostra de água do mar entra no fluxo dentro de um sistema Manifold no analisador onde passa por uma série de reações, que ao final, produz um composto colorido. Este composto absorve a luz em um comprimento de onda específico. Um feixe monocromático de luz passa pela amostra e a absorbância é medida. O espectrômetro de UV é

calibrado por uma série de padrões conhecidos e curvas padrões são produzidas. A intensidade da cor produzida por uma amostra é proporcional à concentração do analito presente.

Para a análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos, as amostras de água foram filtradas em membranas de 0,45 µm de porosidade, enquanto os elementos na fração total foram analisados a partir da amostra de água bruta, sem filtração. Todo o material utilizado durante as análises foi lavado com o uso de Extran 5 % e descontaminado com ácido clorídrico 10 % e água ultrapura.

➤ Nitrato e nitrito

Baseado nos métodos descritos por Armstrong et al (1967) e Grasshoff (1983), o procedimento utilizado para a análise de nitrato e nitrito fundamenta-se na dosagem dos íons nitritos (reação de Griess) obtidos por redução quantitativa (maior de 90 %) dos íons nitratos presentes na amostra. Logo, foram medidas a soma das concentrações dos íons nitritos e nitratos. O complexo colorido foi lido em um comprimento de onda de 540 nm. A concentração em nitrato foi deduzida subtraindo-se o nitrito original da amostra da concentração de nitrito total dosado (somatório destes NO₂ com o NO₃ reduzido). A redução do nitrato foi efetuada pela passagem da amostra por uma coluna redutora preenchida por grãos de cádmio tratados com solução cúprica (cádmio envelopado com cobre). A eficiência desta redução foi determinada através da execução de duas soluções equimolares através da coluna, uma contendo somente nitrato e outra contendo somente nitrito. O percentual de nitrato convertido a nitrito resultou no rendimento da eficiência da coluna, assim um fator foi utilizado para calcular a concentração de nitrato.

Após a redução, o reagente de cor contendo sulfalinamida e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (o qual se complexa com o nitrito) foi adicionado para formar uma solução roseada. O fluxo foi então passado com uma flow cell (célula de fluxo) de 10 mm e a absorbância de 540 nm.

O mesmo método foi empregado para análise de nitrito, exceto que não foi necessário o uso da coluna de cádmio. A concentração de nitrato foi calculada em um “canal virtual” pela seguinte equação, utilizando a eficiência da coluna, NIT e NO₂:

$$NO_3 = \frac{\left(NIT * \frac{A * \text{Recuperação} + B}{A + B} \right) - NO_2}{\text{Recuperação}}$$

NO₃ = Nitrato (na amostra)

NO₂ = Nitrito (na amostra)

NIT = Nitrogênio inorgânico total (NO₃ + NO₂) na amostra

A= NO₃ concentração no calibrante misto

B= NO₂ concentração no calibrante misto

Recuperação = eficiência da coluna (expresso em decimal).

Os reagentes utilizados nesse procedimento foram:

- Reagente de cor: reagente misto contendo sulfalinamida, ácido fosfórico e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina;
- Cloreto de amônio.

Foram utilizados 7 pontos para as curvas de calibração, variando de 0,05 a 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrito e de 0,05 a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrato, enquanto o LD para estes compostos foi de 0,01 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

➤ Ortofosfato

A análise de ortofosfato foi realizada segundo o método de Murphy e Riley (1962), modificado. Uma solução ácida de molibdato de amônio foi adicionada à amostra filtrada para produzir ácido fosfomolibdico que é na sequência reduzido a azul ácido seguido da adição de ácido ascórbico. A intensidade da cor está diretamente relacionada a concentração de fosfato dissolvido na amostra. O produto da reação foi passado por uma célula de fluxo (flow cell) de 10 mm e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 880 nm.

Os reagentes utilizados nesse procedimento foram:

- Tartarato de Antimônio e Potássio,
- Molibdato de amônio,
- Ácido ascórbico.

Foram utilizados 7 pontos para as curvas de calibração, variando de 0,05 a 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para ortofosfato, enquanto o LD para este composto foi de 0,01 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

➤ Silicato

O silicato foi analisado utilizando o método modificado de Grasshoff et al. (1983). Uma solução acidificada de molibdato de amônio foi adicionada à amostra filtrada para produzir ácido sílico-molibdico, o qual então foi reduzido ao azul ácido sílico-molibdoso seguido da adição de ácido ascórbico. A quantidade de cor azul produzida é proporcional à quantidade de silicato dissolvido reativo na amostra. Ácido oxálico foi adicionado para inibir a interferência de PO_4 . A amostra foi passada em uma célula de fluxo (flow cell) de 10 mm e a leitura realizada em absorbância de 820 nm.

Os reagentes utilizados nesse procedimento foram:

- Molibdato de amônio,
- Ácido oxálico,
- Ácido ascórbico.

Foram utilizados 7 pontos para as curvas de calibração, variando de 0,05 a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para silicato, enquanto o LD para este composto foi de 0,01 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

➤ Nitrogênio amoniacal

Para a análise de nitrogênio amoniacal foi utilizado o método de reações de Berthelot, onde um complexo colorido azul esverdeado é formado e medido ao comprimento de onda de 660 nm. Um reagente complexante foi utilizado para prevenir a precipitação de hidróxido cálcio e magnésio. Nitroprussiato de sódio foi utilizado para aumentar a sensibilidade. Reagentes alternativos podem ser utilizados na reação com salicilato ou fenato. No LabGAM utilizou-se o salicilato.

Os reagentes utilizados nesse procedimento foram:

- Complexante: reagente misto contendo EDTA, citrato de sódio, nitroprussiato de sódio e Brij,
- Ácido dicloro cianúrico: ácido Dicloroisocianurico e hidróxido de sódio;
- Salicilato de sódio.

Foram utilizados 7 pontos para as curvas de calibração, variando de 0,05 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrogênio amoniacal, enquanto o LD para este composto foi de 0,01 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

➤ Nitrogênio e fósforo totais

Análises de nutrientes totais foram realizadas por prévia digestão com persulfato de potássio de acordo com Valderrama (1981) e analisadas por fluxo contínuo ("Continuous Flow Analysis" - CFA), conforme métodos para nitrato e ortofosfato descritos anteriormente.

A digestão das amostras foi realizada em frascos de borosilicato, utilizando solução de digestão mista (ácido bórico, persulfato de potássio e hidróxido de sódio). As amostras foram levadas à autoclave e digeridas por 2 h a 115 °C.

Foram utilizados 6 pontos para as curvas de calibração, variando de 0,1 a 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrito e fosfato, 0,1 a 20,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrato, enquanto o LD para estes compostos foi de 0,01 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrito e 0,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para nitrato e fosfato.

➤ Cálculos

Os dados foram reportados em micro mols por litro ($\mu\text{mol.L}^{-1}$). Os principais cálculos de concentração no AA3 são executados através da interface do software AACE. Os cálculos seguem os princípios do espectrômetro, onde:

$$[X] \text{ micro mols/litro} = (\text{Absorbância-branco}) \times F1 \text{ (Fator resposta)}$$

Os valores foram corrigidos por um valor base (drift) estimado no início, ao final dos padrões e ao longo da corrida, bem como pela água ultra pura, a recuperação da eficiência da coluna de cádmio (no caso do nitrato) e a posição relativa das amostras na corrida.

b) Metais

➤ Limpeza do material

Todo o material utilizado nas análises de metais foi descontaminado em banho ácido de HNO_3 10 % por 12 horas. Após esse período, as frascarias e vidrarias foram lavadas com água ultrapura por três

vezes, a fim de remover os resíduos de ácido e deixados para secar para posterior armazenamento em local adequado. Os tubos de Teflon utilizados no procedimento de extração de metais totais, particulado, parciais e totais no sedimento foram deixados de molho em solução Extran 5 % por, no mínimo, 30 minutos. Os tubos foram, então, higienizados na parte interior com esponja própria e o Extran removido com água ultrapura. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de HNO_3 65 % nos tubos, os quais foram submetidos ao microondas (rampa de 200 °C por 10 minutos e mantidos a 200 °C por mais 10 minutos) e enxaguados como descrito para a lavagem convencional.

➤ Preparação das amostras

Em laboratório, cerca de 1 L das amostras de água foram filtradas em membrana de acetato de celulose de porosidade 0,45 μm (previamente secas e pesadas), sendo o material retido na membrana e a água filtrada separados para análises dos metais para as frações particulada e dissolvida, respectivamente. Cerca de 500 mL da amostra sem filtração foi separada para análise de metais totais. As alíquotas correspondentes às análises de metais totais e dissolvidos foram acidificadas com HNO_3 65 % ultrapuro ($\text{pH} < 2$) e armazenadas para posterior extração e análise. As membranas com o material particulado retido foram congeladas e liofilizadas para posterior pesagem e averiguação da quantidade do material particulado, sendo assim armazenadas a vácuo em dessecadores até a extração e análise.

➤ Metais totais na água

Para a extração dos metais totais nas amostras de água foi utilizado o método EPA 3015A (U.S. EPA, 2007a). Nesse procedimento, uma alíquota de 45 mL da amostra homogeneizada foi transferida para os tubos de Teflon, com posterior adição de 5 mL de ácido nítrico (HNO_3 65 %) destilado (Sub-boiling) em cada amostra. As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), com o uso de uma elevação de temperatura até 170 °C em aproximadamente 10 min, permanecendo nesta temperatura por outros 10 min. Após o período de digestão e resfriamento dos tubos, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado. Posteriormente, os extratos foram diluídos (1:5) com HNO_3 5 % e acrescidos da solução multi-elementar (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando padrão multielementar (ICP multi-element standard solution XXI for MS, CentiPUR® (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany).

➤ Metais no material particulado em suspensão (MPS)

Para a extração dos elementos no MPS retido nas membranas, foi utilizada a digestão parcial de acordo com o método EPA 3051A (U.S. EPA, 2007b). Nesse procedimento, os filtros foram adicionados nos tubos de Teflon para digestão e extraídos com o uso de 10 mL de ácido (HNO_3 65 %) destilado (Sub-boiling). As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), seguindo o respectivo protocolo: 1ª rampa de temperatura 25 °C a 175 °C em 5:30 min. e a 2ª rampa

de 25 °C a 175 °C em 4:30 min., ambas em potência de 1600 W. Após o período de digestão e resfriamento dos tubos, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado. Posteriormente, os extratos foram diluídos (1:10) com HNO₃ 5 % e acrescidos da solução multi-elementar (10 µg mL⁻¹; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a 300 µg g⁻¹ utilizando padrão multielementar (ICP multi-element standard solution XXI for MS, CentiPUR® (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany).

➤ Elementos Terras Raras no material particulado em suspensão (MPS)

Para a extração dos elementos Terras Raras no MPS retido nas membranas, foi utilizada a digestão total de acordo com o método EPA 3052 (U.S. EPA, 1996c). Nesse procedimento, os filtros foram adicionados nos tubos de Teflon para digestão e extraídos com o uso de 9 mL de ácido (HNO₃ 65 %) destilado (Sub-boiling) e 3 mL de ácido fluorídrico (HF). As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), utilizando a rampa de temperatura descrita no método EPA 3052 (U.S. EPA, 1996c). Após essa etapa, foram adicionados 30 mL de ácido bórico (H₃BO₃) a 4% em cada amostra e os extratos foram novamente levados para digestão em forno microondas. Posteriormente, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado e diluídos (1:10) com HNO₃ 5 % e acrescidos da solução multi-elementar (10 µg mL⁻¹; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a 300 µg g⁻¹ utilizando padrão multielementar (SpecSol, G21V – ICP 100 mg L⁻¹).

➤ Metais dissolvidos

As amostras filtradas e previamente acidificadas a pH < 2 foram neutralizadas a pH próximo a 7,0 com o uso de solução NaOH 1 M. com adição de HNO₃ destilado (sub-boiling) e armazenada até análise. Em preparação para análise, a amostra acidificada será neutralizada com o uso de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração de 1 molar (1M). As amostras foram então, pré-concentradas através da passagem em resina catiônica Chelex® 100 – forma Na (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany). Os extratos de metais retidos na coluna foram eluídos com solução HNO₃ 10 %. Entre uma amostra e outra, foi realizada a lavagem e reativação da coluna através de HNO₃ 10 % e NaOH 1 M. Posteriormente, 4,95 mL do extrato foram transferidos para os vials de análise e acrescidos da solução multi-elementar (10 µg mL⁻¹; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a 300 µg L⁻¹ utilizando

padrão multielementar (ICP multi-element standard solution XXI for MS, CentiPUR® (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany).

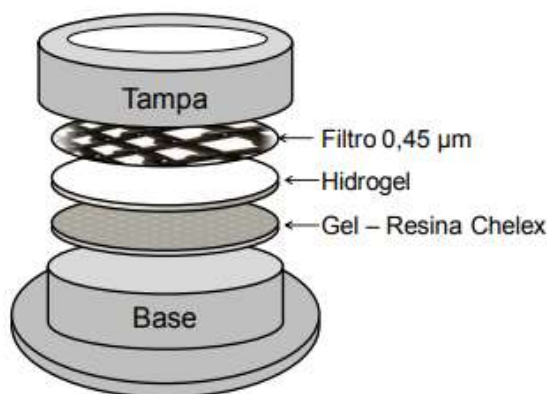
➤ Especificação de metais dissolvidos em dispositivos DGT

Com o objetivo de avaliar a concentração lábil das espécies metálicas presentes na fração dissolvida, foi aplicada a técnica de amostragem passiva baseada em difusão em filmes finos por gradiente de concentração, DGT (do inglês, *Diffusive gradients in thin-film*), desenvolvida por Davison e Zhang (1994). Essa estratégia permite quantificar os elementos em sua forma livre e com complexos inorgânicos e orgânicos menores, o quais são frequentemente associados à sua biodisponibilidade e toxicidade (Davison et al., 2016). Os valores de concentração de complexos maiores e estáveis, metais ligados a substâncias húmicas, coloides e material particulado não são contempladas pela técnica (dos Anjos et al., 2017).

Dessa maneira, os dispositivos DGT permitem a separação das espécies lábeis no local de amostragem, a partir do emprego de um hidrogel que age como uma camada difusiva, controlando a transferência de massa dos analitos por um gradiente de concentração para uma fase ligante sortiva, onde serão acumulados. A teoria na qual o DGT se baseia tem com base as características difusionais das espécies metálicas e de semimetais em um hidrogel chamado fase difusiva e nas propriedades sortivas de uma resina, denominada de fase ligante, imobilizada em hidrogel.

Os sistemas DGT utilizados no presente estudo foram compostos por uma tampa e base (pistão) em plástico ABS, por uma membrana filtrante em PTFE de 0,45 μm de porosidade, uma fase difusiva representada por um filme com 0,08 mm de espessura de matriz porosa de hidrogel de agarose 1,5% (m/v) e uma fase adsortiva contendo resina de troca iônica (Chelex-100) em concentração 40% (m/v) imobilizada em agarose (0,05 mm), segundo esquema apresentado na Figura 2.

Figura 2: Esquema representativo do dispositivo DGT, composto por uma tampa e base (pistão) em plástico ABS, membrana de filtração em PTFE (0,45 μm), fase difusiva composta por hidrogel de agarose (0,08 mm) e fase ligante contendo resina Chelex-100 imobilizada em hidrogel de agarose (0,05 mm). Adaptado de dos Anjos (2010).



Para a realização das medidas, os dispositivos foram montados em laboratório e aplicados em amostras aquosas (4 L), onde permaneceram por um período de 24 h de exposição. Em seguida, os

dispositivos foram recolhidos, desmontados e a fase ligante foi submetida a extração com 10,00 mL de solução aquosa de HNO_3 de alta pureza em concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, sendo após realizada a determinação das espécies por espectrometria emissão ótica em plasma indutivamente acoplado, ICP OES (Thermo, iCAP 6000). Os cálculos das concentrações finais levaram em consideração o coeficiente de difusão de cada elemento avaliado, conforme a primeira Lei de difusão de Fick (Davison et al., 2016). Para isso foram utilizadas a Equação 1 e Equação 2. A Equação 1 refere-se ao cálculo da massa acumulada (M) na fase ligante,

$$M = \frac{C_e(V^{fl} + V_e)}{f_e} \quad \text{Equação 1}$$

onde, C_e representa a concentração determinada por ICP OES, V^{fl} o volume da fase ligante, V_e o volume de ácido empregado na eluição e f_e o fator de eluição referente a fração do metal ligado e liberado. Na sequência a concentração lábil (C_{DGT}) é calculada com base na Equação 2,

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta_g}{DA_p t} \quad \text{Equação 2}$$

onde, Δ_g corresponde a espessura da fase difusiva, D ao coeficiente de difusão para cada analito baseado na composição da fase difusiva, A_p , área da janela de exposição da tampa do dispositivo e t o tempo de exposição.

c) Compostos Orgânicos

➤ Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas nas etapas referentes ao tratamento das amostras para compostos orgânicos foram submetidas ao procedimento de limpeza, através de banho em detergente Extran (5 %) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguadas com água corrente, água ultrapura, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450°C por um período de 2 horas. Essa última etapa foi realizada somente para as vidrarias não calibradas e mufláveis. Todo o material não muflável, foi lavado com solventes com alto grau de pureza (n-hexano e diclorometano - DCM) antes do seu uso. Vidrarias com material aderido à parede (tais como vials e balões de fundo chato) foram sonicadas em aparelho de ultrassom por, no mínimo, 30 minutos, com solução de Extran 5 % e acetona HPLC em seu interior, para ajudar na remoção de resíduos orgânicos provenientes das amostras. Todo o material foi protegido com papel alumínio previamente calcinado para armazenamento.

➤ Extração de Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Marcadores Lipídicos (esteróis e ácidos graxos), fenóis e aminas em amostras de água

O processo de extração orgânica em amostras de água foi realizado a partir da extração líquido-líquido em funil de separação, segundo o método EPA 3510C (U.S. EPA, 1996a). Cada amostra foi transferida para um funil de separação, em foram adicionados 60 mL de diclorometano grau HPLC.

Posteriormente, foram adicionados à amostra as soluções contendo padrões de recuperação de acordo com as análises a serem feitas, que irão garantir a eficácia do procedimento de extração, segundo a relação abaixo:

- Amostras para determinação de hidrocarbonetos, HPAs e marcadores lipídicos: 50 μL da solução padrão das parafinas deuteradas n-C20d, n-C24d e n-C30d ($100\mu\text{g mL}^{-1}$), 20 μL da solução padrão de p-terfenil ($5,0\mu\text{g mL}^{-1}$) e 50 μL da solução de androstanol ($100\mu\text{g mL}^{-1}$);
- Amostras para determinação de fenóis: 50 μL da solução padrão de dibromofenol ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$);
- Amostras para determinação de aminas: 50 μL de solução padrão de Trifenilamina + 1-etil-p-toluidina + 1-4-clorofenil-1,2-fenilenodiamina ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$).
- Amostras para determinação de pesticidas e PCBs: 100 μL de uma mistura de padrões subrogados para a determinação de compostos organoclorados (PCB 103 (C-103N) e PCB 198 (C-198N), AccuStandard, USA).
- Amostras de espuma: 50 μL da solução padrão das parafinas deuteradas n-C20d, n-C24d e n-C30d ($100\mu\text{g mL}^{-1}$), 20 μL da solução padrão de p-terfenil ($5,0\mu\text{g mL}^{-1}$) e 50 μL da solução padrão de dibromofenol ($100\mu\text{g mL}^{-1}$).

O funil foi agitado por três minutos e a amostra decantada por 5 minutos. Após a decantação, a fase orgânica (fase inferior) foi passada por um funil analítico contendo fibra de vidro e sulfato de sódio previamente calcinados, e recolhida em balão de fundo chato. A fase aquosa foi mantida no funil de separação para subsequente repetição da extração por mais duas vezes. O extrato bruto (fase orgânica total recolhida no final das três repetições) contido no balão foi evaporado até aproximadamente 1 mL em rotaevaporador (banho-maria com temperatura entre 30 e 40 °C) e o volume final foi transferido para um vial de 1,5 mL, utilizando uma pipeta de Pasteur de vidro calcinada. O volume contido no vial foi totalmente seco sob fluxo de nitrogênio. Antes do fracionamento, os analitos de interesse foram ressuspensos com os seguintes solventes, de acordo com os analitos de interesse:

- Amostras para análise de hidrocarbonetos, HPAs e marcadores lipídicos: 1 mL de hexano grau HPLC;
- Amostras de fenóis: não foram ressuspensas, passaram para o procedimento de silanização.
- Amostras de aminas: 1 mL de Acetato de Etila grau HPLC;
- Amostras de espuma: 1 mL de Acetato de Etila grau HPLC.

➤ Etapa de fracionamento (*Clean up*)

O fracionamento foi realizado a partir do método otimizado com pipeta de Pasteur de vidro de ponta curta calcinada, que foi utilizada como microcoluna cromatográfica. Para reter a fase sólida, foi adicionado um chumaço de lã de vidro descontaminado na ponta da microcoluna, a fim de evitar a

passagem dos adsorventes. Em seguida, foi adicionada à microcoluna cerca de 1 g de sílica desativada (ativada a 120 °C/12 h e desativada com 5 % de água milli-Q) e cerca de 0,5 g de alumina ativada. Após a montagem da microcoluna, adicionou-se 2 mL de hexano grau HPLC na coluna para lavar os adsorventes e a fibra de vidro. O extrato foi transferido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro calcinada, lavando o balão repetidas vezes com o solvente apropriado para cada eluição. Os solventes utilizados nas 4 eluições foram:

- F1: 5 mL de hexano grau HPLC, para remoção da fração contendo os hidrocarbonetos alifáticos;
- F2: 5 mL de uma mistura 1:1 de hexano e diclorometano (grau HPLC), para remoção dos HPA's;
- F3: 5 mL de acetato de etila grau HPLC, para a remoção dos esteróis;
- F4: 5 mL de metanol grau HPLC, para a remoção dos ácidos graxos.

Cada fração foi recolhida separadamente em vial de vidro calcinado de 8 mL com a parte interna da tampa protegida por papel alumínio e evaporada a 1 mL sob fluxo de N₂. As frações F1 e F2 foram ressuspendidas e transferidas para vials de 1,5 mL utilizando no total 1 mL de hexano e armazenadas em congelador até a análise. A fração F3 foi armazenada em congelador até a etapa de silanização, enquanto a F4 foi ressuspendida e transferida para um tubo de ensaio de vidro utilizando cerca de 1 mL de tolueno grau HPLC e armazenada em congelador até a etapa de metilação.

➤ Etapa de derivatização (silanização) de fenóis e esteróis (F3)

Foram adicionados 50 µL do agente BSTFA:TMCS (99:1) a cada vial previamente seco sob fluxo de N₂. Essa solução foi aquecida a 60 °C em estufa por 1 hora, para formar os derivados trimetilsilanos (TMS) dos analitos, secas sob fluxo de N₂, adicionado 1 mL de hexano e armazenada em congelador até a análise.

➤ Etapa de metilação de ácidos graxos (F4)

A cada extrato da fração F4 adicionou-se 2 mL de solução de cloreto de acetila e metanol (1: 10), os quais foram mantidos em estufa por 12 h a 60 °C. Posteriormente, adicionou-se à amostra 1 mL de diclorometano grau HPLC e 1 mL de solução 10 % de KCl para extração da fase orgânica. A mistura foi submetida à agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugada por 2 minutos a 2000 RPM para obter uma melhor divisão entre as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica (inferior) foi retirada e submetida à passagem em uma microcoluna de vidro (pipeta de Pasteur de vidro calcinada) contendo sulfato de sódio anidro PA calcinado, recolhendo-se o eluato final após três processos de extração em vial de 8 mL. O eluato foi seco sob fluxo de N₂, ressuspendido e transferido para vial de 1,5 mL com 1 mL de hexano grau HPLC.

➤ Quantificação de hidrocarbonetos, HPAs e marcadores lipídicos

Antes da análise, foi adicionado padrão interno deuterado de alcanos (n-C16d) e HPAs (6 HPAs deuterados) nas respectivas frações. Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, esteróis e ácidos presentes nas frações F3 e F4, foi utilizado o alfa-colestano como padrão interno e androstanol como surrogates ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A quantificação e identificação dos compostos foi realizada através de um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c (GC/MS EPA 8270; U.S. EPA, 2007), ambos equipados com auto amostradores CTC Combi Pal, injetor Split/splitless e coluna capilar DB-5MS ($30 \text{ m} \times 0,250 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP foi preparada a partir de um mix padrão de alcanos (n-C8 – C40) na faixa de concentração de $0,5$ a $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ com padronização interna (n-C16d – $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A programação de temperatura foi configurada com a temperatura inicial de 60°C por 1 min, então $6^\circ\text{C} / \text{min}$ até 300°C por 30 min. Para as determinações utilizando-se GC-MS, as condições foram as mesmas citadas, com o acréscimo dos parâmetros de temperaturas do injetor, interface, fonte de íons e quadrupolo: 300°C ; 300°C , 200°C e 150°C , respectivamente. A quantificação dos HPAs também foi realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de 5 a 1000 ng mL^{-1} utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) na concentração de 100 ng mL^{-1} . Os íons utilizados para a quantificação 16 HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, estão descritos na Tabela 7. Os HPAs foram determinados através do monitoramento full scan (m/z 50-550) e do monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo as seguintes características: temperatura inicial de 40°C por 2 min, com taxas de aquecimento de $25^\circ\text{C} / \text{min}$ até 100°C , $5^\circ\text{C} / \text{min}$ até 230°C , $2^\circ\text{C} / \text{min}$ até 270°C mantidos por 5 min e $5^\circ\text{C} / \text{min}$ até a temperatura final de 300°C . Para a determinação dos biomarcadores lipídicos foram utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. As curvas analíticas para esteróis e ácidos variaram de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram preparados a partir de um material certificado de referência contendo 37 ácidos graxos saturados e insaturados (FAME mix / TraceCERT CRM47885 – SUPELCO). Para a quantificação de esteróis e terpenóides foram utilizados os padrões certificados de dihidrocolesterol, colesterol, estigmastanol, 5a-colestan-3-ona, 5-alfa-colestano, coprostanol, 3beta-taraxerol, campesterol, lanosterol, 3beta-hidróxi-5alfa-androstano, b-sitosterol, e estigmasterol. Os demais compostos identificados foram determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes as classes a serem avaliadas. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação com injeção de soluções contendo padrões autênticos e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento.

Tabela 2: Íons de quantificação dos 16 HPAs e padrões internos.

PADRÃO	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (M/Z)	PADRÃO INTERNO	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (M/Z)
Naftaleno	128	Naftaleno-d8	136
Acenaftileno	152	Acenafteno-d10	162, 164
Acenafteno	152, 154	Acenafteno-d10	162, 164
Fluoreno	165, 166	Acenafteno-d10	162, 164
Fenantreno	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno	202	Fenantreno-d10	188
Pireno	202	Criseno-d12	236, 240
Benzo(a)antraceno	228	Criseno-d12	236, 240
Criseno	228	Criseno-d12	236, 240
Benzo(b)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(k)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(a)pireno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276, 278	Perileno-d12	260, 264
Dibenzo(a,h)antraceno	278, 279	Perileno-d12	260, 264
Benzo(g,h,i)perileno	276, 277	Perileno-d12	260, 264
p-Terfenil-d14	240, 244	Criseno-d12	236, 240

➤ Quantificação de fenóis

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada mediante curvas de calibração construídas com padrões analíticos na faixa de concentração que foram divididas dentro da faixa de 0,125 a 1000 μL^{-1} de uma solução mix de fenóis (aquilados, nitro e clorofenóis). Para amostras mais concentradas, curvas analíticas foram construídas em níveis superiores de concentração, na ordem de mg L^{-1} , ou utilizou-se o método de diluição como alternativa para quantificação. Parâmetros de mérito foram determinados tais como, faixa linear, coeficientes de correlação, precisão e limites de detecção e quantificação de maneira a avaliar o desempenho do método proposto para a determinação de compostos fenólicos em água. Coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99 para cada analito foram utilizados como critério de qualidade. Frascos contendo apenas água ultrapura e reagentes derivatizantes foram submetidos a extração e análise como controle e critério de qualidade e rastreabilidade dos processos analíticos. Também foi avaliada diariamente a precisão da curva analítica através de *cross check*, injeção de padrões em diferentes concentrações como carta controle. A quantificação e identificação dos compostos foi realizada através de um cromatógrafo a gás acoplado com detector por ionização em chama (FID) acoplados em série, equipado com injetor split/splitless, (GC-FID, método EPA 5021A; U.S. EPA, 2014).

➤ Condições instrumentais do GC-FID

Os parâmetros experimentais utilizados para as análises no GC-FID foram os seguintes: coluna DB-5MS 30 m \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura de filme, programa de temperatura

(70 °C durante 5 minutos, aquecimento até 120°C / 8°C min⁻¹, até 135 °C / 2 °C min⁻¹ e finalmente até 280 °C / 8 °C min⁻¹). Hélio foi utilizado como gás de arraste com a vazão de 2,0 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 270 °C com purga de septo constante e programado para retornar a modo split após 3 minutos do início da corrida sob a vazão de 50 mL min⁻¹. O detector FID foi programado a 280 °C.

➤ Quantificação de aminas

A determinação quantitativa das aminas foi realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático (GC/MS EPA 8270; U.S. EPA, 2007). A injeção foi realizada no modo *splitless*, (ativação em 40 s em 280 °C), utilizando o Hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 90 °C (1 min) a 120 °C a 10 °C min⁻¹ e, em seguida, a 320°C a 6°C min⁻¹, mantendo a temperatura final durante 15 min. As colunas analíticas utilizadas foram: DB-5 de 30m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 mm (J & W Scientific). O GC-MSD foi operado no modo eV EI, full scan (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente. Para a quantificação de aminas foram utilizados padrões de alta pureza dos seguintes compostos: N-Etil-p-toluidina; Trifenilamina; 6-cloro-3-metil-1-[2-piridinil]-1H-i e N-(4-clorofenil)-1,2-fenil-enediamina

➤ Condições instrumentais do cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS)

- Coluna cromatográfica capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno com fase de 5 % fenil / 95%metil siloxano e 0,25 µm de espessura do filme;
- Gás carreador: hélio
- Temperatura da fonte: 200 °C
- Impacto eletrônico: 70 eV
- Temperatura da Interface: 280 °C
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Volume de injeção: 3 µL
- Programação temperatura: temperatura inicial de 50 °C por 2 minuto, 35 °C min⁻¹ até 100 °C, 10 °C min⁻¹ até 310 °C e isotérmico por 10 minutos.

➤ Compostos organoclorados (OCs)

A metodologia para a extração das amostras de água foi baseada no protocolo EPA 3510C (U.S. EPA, 1996a). A etapa de extração das amostras de água foi realizada no Laboratório de Geoquímica Ambiental (LabGAm), da Universidade Federal do Espírito Santo. Aproximadamente 8 L de água foram extraídos em funil de separação líquido-líquido, adicionando-se 60 mL de diclorometano (DCM) a cada 2 L de amostra, seguido por homogeneização por 3 min e posterior decantação. Esse processo foi

repedido 3 vezes. Nesta etapa também foi adicionado 1 mL da mistura de padrões subrogados (PCB 103, 0,025 ng μL^{-1} , e PCB 198, 0,025 ng μL^{-1} ; C-103N e C-198N da *AccuStandard*, New Haven, CT, USA). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica concentrada no rotavapor rotativo a vácuo até 1 mL, aproximadamente. Por fim, o extrato foi transferido para um *vial* e seco em Nitrogênio para o transporte das amostras até o Laboratório de Geoquímica e Poluição Marinha (LaGPoM), do Centro de Estudos do Mar, da Universidade Federal do Paraná.

No LaGPoM, as amostras foram ressuspensas com 1 mL de uma mistura de DCM e *n*-hexano (3:7, v:v) e foi realizada a etapa de purificação por cromatografia de adsorção em coluna. As colunas foram preparadas com sulfato de sódio e 3,2 g de alumina 5 % desativada com água Milli-Q® (extraída 5 vezes com *n*-hexano, para assegurar a ausência de possíveis interferentes orgânicos). A eluição foi realizada com 20 mL da mistura de DCM e *n*-hexano (3:7, v:v). Em seguida, os extratos foram novamente concentrados em rotavapor e transferidos para ampolas de vidro. Por fim, foram adicionados 100 μL de uma solução de tetracloro-*m*-xileno (TCMX, 0,25 ng μL^{-1} ; M-8082-SS-10X, da *AccuStandard*, New Haven, CT, USA). O volume final foi ajustado resultando em um extrato de 250 μL .

Para a determinação dos OCs, 2 μL dos extratos purificados foram injetados em um cromatógrafo a gás *Agilent GC 7890 A* acoplado a um espectrômetro de massa (*Agilent 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector*), no modo SIM (*System Ion Monitoring*), equipado com coluna capilar *Agilent 19091J-433*, com 30 m de comprimento, 250 μm de diâmetro interno e fase estacionária de 5 % fenil-metil-siloxano com 0,25 μm de espessura do filme. O gás de arraste foi o Hélio (grau de pureza 99,995%). A rampa de aquecimento utilizada na separação dos compostos teve início em 75 °C, permanecendo por 3 min, quando começou a subir a uma taxa de 15 °C min^{-1} até atingir 150 °C, depois aumentou até 260 °C a uma taxa de 2 °C min^{-1} e então subiu até 300 °C a uma taxa de 20 °C min^{-1} , mantendo-se estável nessa temperatura por 10 min, totalizando 75 min.

➤ Quantificação e controle analítico dos organoclorados (OCs)

Os OCs bifenílicos policlorados (PCBs) e pesticidas organoclorados (POCs) analisados são os descritos na Resolução Conama 357/05 para água salina. A quantificação foi realizada a partir da integração das áreas dos picos de fragmentos de íons específicos (m/z) utilizando o sistema de aquisição de dados *Agilent Enhanced Chemstation* (G1701 CA). Os OCs foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e m/z específicos com os resultados obtidos do padrão subrogado (PCB 103 e PCB 198) de cada amostra e da curva de calibração (5, 10, 25, 50 e 75 pg μL^{-1} , $r^2 > 0,995$) das misturas de padrão externos (PCBs: C-WNN e C-WCFS; POCs: AE-00010, da *AccuStandard*, USA).

Branco de campo foram analisados a fim de detectar interferentes e/ou contaminantes durante os procedimentos de coleta, extração e purificação. Na detecção de interferentes, os mesmos foram descontados dos valores registrados nas amostras. Além dos brancos de campo, brancos laboratoriais (1 mL da mistura de DCM e *n*-hexano (3:7, v:v)) foram analisados a cada grupo de 12 amostras de água, a fim de identificar a presença de contaminantes durante o procedimento laboratorial do LaGPoM. Estes não indicaram interferências externas que justificasse a adoção de medidas corretivas nos

procedimentos adotados no LaGPoM. Para estimar perdas ou ganhos de massa dos compostos analisados durante o procedimento analítico, o cálculo da recuperação dos padrões subrogados PCB 103 e PCB 198 foi feita a partir da relação das suas quantidades obtidas com a quantidade adicionada de padrão interno TCMX. As recuperações médias dos padrões subrogados nas amostras foram $42 \pm 10\%$ (PCB 103), $48 \pm 13\%$ (PCB 198) e $40 \pm 6\%$ (PCB 103), $46 \pm 7\%$ (PCB 198), no ano 1 e no ano de transição, respectivamente, consideradas aceitáveis para validação do método analítico. O limite de detecção (DL) instrumental adotado foi de $0,062 \text{ ng L}^{-1}$, calculado a partir da menor concentração detectável ($\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$), multiplicada pelo volume final do extrato ($250 \mu\text{L}$), e dividida pelo volume de água (8 L) extraído.

➤ Contaminantes Emergentes

Todos os solventes utilizados (metanol, clorofórmio, acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, acetona e hexano) possuem pureza adequada (grau HPLC) para a determinação de concentrações em nível traço de compostos orgânicos. Os compostos de interesse investigados nesse trabalho foram estriol (E3), 17- β -estradiol (E2), estrona (E1), ibuprofeno (IBU), 4-octilfenol (OCT), 4-nonilfenol (NON), triclosan (TCL), bisfenol-A (BPA), diclofenaco (DIC), coprostanol (COP) e estigmastanol (ETG). Além destes, foi utilizado como padrão interno deuterado o composto bisfenol-A-D16. Todos apresentam pureza superior a 95% e foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções-estoque e trabalho foram preparadas diluindo em metanol os padrões sólidos. Os valores das concentrações individuais são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração das soluções estoque e trabalho preparadas individualmente em metanol.

Analitos	Estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Trabalho ($\mu\text{g/mL}$)
Estriol	120	1,20
17- β - Estradiol	120	1,20
Estrona	90	0,90
Ibuprofeno	100	1,00
Octilfenol	100	1,00
Nonilfenol	110	1,10
Triclosan	130	1,30
Bisfenol A	130	1,30
Diclofenaco	110	1,10
Coprostanol	100	1,00
Atrazina deuterada	100	1,00
Estigmastanol	110	1,10

O derivatizante N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetiltriclorosilano (BSTFA/TMCS 99:1) também foi adquirido da Sigma-Aldrich.

- Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) modelo TQ8040 da marca Shimadzu. As injeções no GC foram feitas com o auxílio de um amostrador automático modelo AOC-5000 Plus e o volume injetado foi de 1,0 µL.

A temperatura de aquecimento do forno do GC iniciou em 100° C e o mesmo foi aquecido numa razão de 8° C/min até atingir 300° C e assim permaneceu por 10 min. Com esse programa de aquecimento a corrida cromatográfica teve uma duração de 35 min para cada amostra injetada.

O injetor foi operado a 300° C no modo splitless e a coluna cromatográfica era uma DB-5ms (Agilent) com as seguintes características: 30 m de comprimento, 0,25 mm de espessura e revestida com um filme de 0,25 µm de espessura contendo 5% fenil e 95% dimetil-polisiloxano. Como gás de arraste foi empregado hélio com 99,999% de pureza e vazão de 1,0 mL/min.

O espectrômetro de massas possui um analisador de massas que é do tipo triplo quadrupolo e foi operado no modo FFAST, do inglês *Fast Automated Scan/SIM Type*, ou seja, a análise das massas foi realizada simultaneamente nos modos de aquisição scan (varredura completa) e SIM (monitoramento seletivo de íons) após a ionização por impacto de elétrons. A linha de transferência e a fonte de íons permaneceram com temperaturas constantes a 300° C e 250° C, respectivamente.

- Derivatização dos contaminantes emergentes

A derivatização dos compostos de interesse se deu a partir da adição de 1,0 mL de solução trabalho na concentração de 1,0 µg/mL em um vial de 2,0 mL. Evaporou-se todo o metanol (solvente em que foram preparados os compostos-alvo) em um concentrador rotativo a vácuo (RVC 2-18 CD, Christ) a 60° C por aproximadamente 20 min. Após a secagem total do solvente adicionou-se 20 µL do derivatizante N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetiltriclorosilano (BSTFA/TMCS 99:1). Em seguida, o vial foi vedado e a reação de derivatização foi realizada em forno micro-ondas doméstico, na potência de 840 W, durante 5 min (MACHADO, 2015). Ao finalizar essa etapa, o volume foi completado para 1,0 mL com hexano e injetado no GC-MS.

- Armazenamento e preparo das amostras aquosas

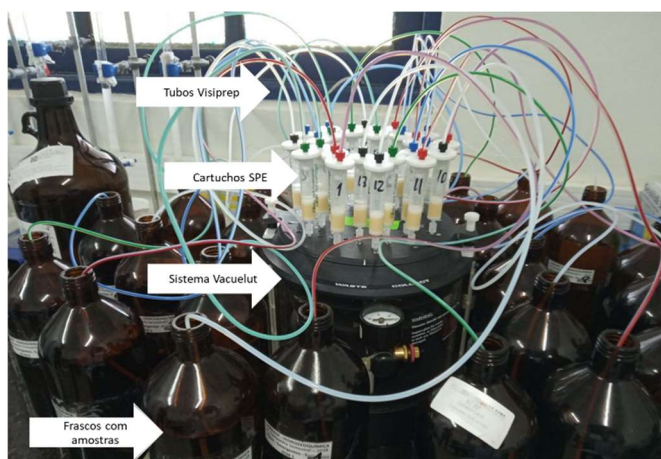
Para cada ponto de amostragem foi coletado individualmente 1 L de água superficial e de fundo empregando frascos em vidro âmbar previamente descontaminados. Os frascos foram totalmente preenchidos com água, selados com papel alumínio calcinado, tampados e mantidos sob refrigeração (4° C) até a realização do procedimento de extração. É importante salientar que às amostras não foram acidificadas ou adicionado qualquer tipo de conservante.

Uma vez no laboratório, as amostras aquosas foram filtradas à vácuo em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μm . Para isso, foi empregado um sistema de filtração Nalgene em polisulfona com capacidade de 0,25 L acoplado a uma bomba de vácuo isenta de óleo.

- Extração dos contaminantes emergentes

Após a filtração das amostras, a extração dos contaminantes emergentes foi realizada em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB (Hydrophilic/Lipophilic-Balance) da empresa Waters contendo 500 mg de fase sorvente e 6 mL de capacidade. Esse tipo de cartucho possui como fase sólida um sorvente misto, contendo um polímero lipofílico (divinilbenzeno) combinado com um polímero hidrofílico (n-vinilpirrolidina). Em seguida, os cartuchos foram conectados a um sistema de processamento manifold denominado Vacuelut que consiste em uma câmara de vidro resistente ao vácuo e um conjunto de peças e conexões em teflon (PTFE), que por sua vez foram conectados aos frascos com as amostras e aos cartuchos de SPE (Figura 3).

Figura 3: Extração dos analitos através dos cartuchos de SPE.



O sistema foi conectado aos frascos com as amostras por meio de tubos Visiprep em PTFE a fim de permitir a passagem contínua de todo o volume de amostra pelo cartucho de SPE. Esse sistema permitiu trabalhar de maneira contínua e limpa, uma vez que todos os tubos e conexões utilizados são constituídos por materiais com baixa capacidade sorvente dos compostos orgânicos minimizando assim problemas de contaminação e efeito de memória (MACHADO, 2015).

Montado todo o aparato, o procedimento de extração seguiu os seguintes passos: primeiramente, a fase estacionária dos cartuchos foi condicionada com duas alíquotas de 3,0 mL de metanol, seguida por duas alíquotas de 3,0 mL de água ultrapura (Milli-Q). Após essa etapa, o volume total das amostras foi eluído através do cartucho sob vazão controlada de 6 mL/min. É importante ressaltar que imediatamente após a etapa de condicionamento dos cartuchos de SPE, iniciou-se a extração dos analitos a fim de que a fase sorvente permanecesse úmida durante todo o procedimento de extração e se evitasse a formação de caminhos preferenciais. Após o término da extração, os cartuchos ainda

úmidos foram embalados com papel alumínio e mantidos sob refrigeração (4° C), até a eluição e determinação cromatográfica.

- Eluição dos analitos contidos nos cartuchos de SPE

A eluição dos analitos também foi realizada com o auxílio do sistema Vacuelut através da adição de duas alíquotas de 2,5 mL de metanol, seguida de uma alíquota de 2,0 mL de acetonitrila. Os eluatos foram recolhidos em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL e levados a um evaporador rotativo à vácuo para completa secagem do solvente no concentrador rotativo a vácuo (MACHADO et al., 2016; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010).

- Derivatização dos contaminantes emergentes

Após a secagem do solvente, foram adicionados aos tubos de ensaio 20 µL de agente derivatizante BSTFA. Em seguida, todos os tubos foram tampados e submetidos a aquecimento em forno micro-ondas doméstico por 5 min em 840 W de potência. Aos tubos foi adicionado 1,0 mL de hexano e o volume transferido para um *vial* de 2 mL de capacidade providos de tampa com septo, para posterior determinação por GC-MS (MACHADO, 2015).

- Curvas analíticas dos contaminantes emergentes

As curvas analíticas foram construídas a partir da diluição da solução trabalho contendo a mistura dos compostos de interesse, em sete níveis de concentração: 5, 10, 20, 40, 80, 120 e 160 ng/mL (n=3). A concentração do padrão interno, atrazina deuterada, foi mantida constante a 100 ng/mL para todos os níveis das curvas analíticas. O preparo e a injeção das soluções se deram no mesmo dia. A regressão linear das curvas analíticas foi obtida a partir do cálculo da razão entre a área do pico do composto (AA) pela área do pico do padrão interno (API).

➤ Carbono orgânico dissolvido (COD)

As análises de carbono orgânico dissolvido (COD) foram realizadas nas amostras de água após o processo de filtração em membranas de 0,45 µm. Para tal, as amostras foram submetidas à combustão e posterior quantificação através do equipamento TOC-L SHIMADZU, no módulo TOCL-TNM. Esse módulo utiliza a oxidação por combustão catalítica em temperaturas próximas a 720 °C. O sistema possui um detector de infravermelho não dispersível (NDIR). O gás carreador utilizado foi o ar artificial 4.7 (99,997%).

O equipamento é capaz de analisar amostras aquosas com relação aos teores de carbono total (TC), carbono inorgânico (IC), carbono orgânico total (TOC) e carbono orgânico não purgável (NPOC) em concentrações na faixa de 4,0 µg/L a 30.000 mg/L. No caso das análises realizadas no âmbito do PMBA/Fest-RRDM, foram reportados os resultados de TOC, os quais foram obtidos a partir das diferenças entre as concentrações de TC e IC. As soluções padrões estoque utilizadas foram de 1000

mg C/L preparadas com biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) para as determinações de TC e com NaHCO_3 e Na_2CO_3 para as determinações de IC.

d) Isótopos estáveis (C, N) no material particulado

Os filtros contendo o material particulado foram cortados em círculos de 9 mm de diâmetro e descarboxatados em atmosfera de HCl fumegante PA dentro de um dessecador por 16 horas. As amostras permaneceram à 60 °C em estufa de secagem por 8 horas e os filtros contendo cerca de 5 mg de material particulado foram encapsulados em cápsulas de estanho para posterior injeção no EA-EMRI.

As determinações da $\delta^{13}\text{C}$ do carbono orgânico total (COT) e $\delta^{15}\text{N}$ do nitrogênio total (NT) foram realizadas através do analisador elementar Flash EA acoplado ao espectrômetro de massas de razão isotópica Delta V Plus, da marca Thermo. Foram introduzidos dois pulsos do gás de referência (N_2) com intensidade de 7000 mV no início de cada corrida e dois pulsos do gás de referência (CO_2) com intensidade de 14000 mV no final da corrida. Os gases de referência foram previamente calibrados a partir do valor médio obtido após 10 determinações do padrão certificado IAEA USGS40. Os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ e o $\delta^{13}\text{C}$ são expressos em per mil (‰), calculados de acordo com o valor do segundo pulso do seu respectivo gás de referência. Os valores são reportados como a média de duas injeções.

As condições instrumentais para a determinação dos isótopos de carbono e nitrogênio podem ser consultadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições do AE-EMRI para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

INSTRUMENTO	ESPECIFICAÇÕES
	Analizador Elementar (EA) – Modelo Flash EA, série 1112.
Equipamentos	Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica – Modelo Delta V Plus. Fabricante: Thermo Scientific. Estação de dados: Isodat 3.0
Forno de Combustão	Preenchido com óxido de cobalto, cobre metálico e óxido de cromo
Gases e Fluxos	
Referência (CO_2 e N_2)	150 mL min ⁻¹
Carreador (He)	110 mL min ⁻¹
Oxidação (O_2)	200 mL min ⁻¹
Temperatura	
Forno de combustão	1020 °C

O limite de detecção e de quantificação das análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ estão relacionados a amplitude do sinal produzido pelo analito, que foi estimado em ≥ 500 mV (LD). Para garantir a qualidade analítica dos resultados, o padrão certificado IAEA USGS40 foi injetado a cada 6 injeções (ou 3 amostras), sendo aceito um desvio menor que ± 0.5 ‰.

1.3.2 Matriz sedimento superficial

a) Nutrientes

- Especificação de fósforo (incluindo orto-fosfato em água intersticial)

O método utilizado para a especificação do fósforo baseia-se nos procedimentos descrito por Anschutz e Deborde (2016), que consiste em uma extração sequencial para a mensuração de fósforo ligado a diferentes frações. Para tanto, foram realizadas as etapas de extração utilizando reagentes com graus de intensidade crescente, a fim de liberar o fósforo associado as frações descritas na Tabela 5.

Todo o material utilizado no processo de análise foi descontaminado a partir de banho em ácido clorídrico 5% por 24 h e água ultra pura. Antes do procedimento, as amostras de sedimento foram liofilizadas até a completa remoção da umidade para posterior maceração e pesagem. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS AJAX-6100PC, em comprimento de onda de 885 λ para todas as leituras e curvas de acordo com a metodologia de Murphy e Riley (1962) para reação colorimétrica.

Tabela 5: Descrição das frações, matrizes, tipo de extração, extratante utilizado, tempo de reação e pH estimado para cada umas das frações analisadas.

FRAÇÃO EXTRAÍDA	MATRIZ	EXTRATOR (TEMPO)	REAÇÃO QUÍMICA	PH
HPO ₄ intersticial	Água intersticial	-	-	<i>in situ</i>
F1: P-trocável (fracamente adsorvido)	Sedimentos	Solução tampão: NaHCO ₃ + H ₂ O (24 h)	Desorção sem atividade bacteriana em água artificial	~7-8
F2: P-ligada ao ferro (III) amorfo	Sedimentos	Ascorbato (20 g/L) (24h)	Redução de óxidos de ferro(III) amorfo e dissociação do P.	8
F3: P-ligado ao ferro (III) cristalino	Sedimentos	Ditionito citrato bicarbonato - CDB (4 h)	Dissociação de óxido de Fe(III) redutível e P associado.	7
F4: P-ligado à hidroxiapatita autigênica	Sedimentos	NH ₄ Cl (2M) (16 h)	Dissociação da hidroxiapatita e P associado	7
F5: P-ligado à apatita carbonática autigênica	Sedimentos	Acetato de Sódio (16 h)	Dissociação da apática carbonática e P associado	4
F6: P-ligado à apatita detrital e carbonato	Sedimentos	HCl (1M) (16 h)	Dissociação ácida de carbonatos e apatita	2.5
F7: P-orgânico		H ₂ SO ₄ (18M) (16 h)	Dissociação ácida da matéria orgânica	~0

A fração correspondente à água intersticial foi coletada *in situ* através do método apropriado com o intuito de manter a integridade da amostra e garantir que a alíquota que está sendo extraída seja verdadeiramente a água que se armazena entre os poros dos sedimentos.

Já as frações 1 e 2 dos sedimentos foram realizadas separadamente, não fazem parte do processo sequencial, mas são frações iniciais do montante total que vai contemplar o fósforo total.

Os reagentes colorimétricos utilizados foram:

- R1 – Molibdato de Amônio $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O})$;
- R2 – H_2SO_4 2,5mol L⁻¹
- R3 – Antimônio tartarato de potássio
- R4 – Ácido Ascórbico

Os procedimentos realizados para cada fração estão descritos a seguir. Para cada fração, além das amostras 3 brancos da solução extratante passaram pelo processo completo.

- **HPO₄ intersticial:** A água intersticial foi removida do sedimento através da centrifugação com o uso de tubos de polipropileno de 50 mL (tipo FALCON). O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm. As amostras foram diluídas com água ultrapura (1: 10) e a leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3+R4.
- **Fração F1 P-trocável:** Cerca de 50 mg de amostra macerada e homogeneizada foi pesada em tubos Falcon (50 mL), seguindo da adição de 50 mL da água tampão ($\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Essa solução foi mantida em agitação por 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 RPM. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10) e a leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3+R4.
- **Fração F2 P-ligado ao ferro (III) amorfo:** Cerca de 100 mg da amostra macerada e homogeneizada foi pesada em tubos de 15 mL, seguindo da adição de 10 mL da solução de ascorbato. Essa solução foi mantida em agitação por 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 RPM. Posteriormente, as amostras foram diluídas em solução HCl 0,2 M (1:10) e a leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3 e R4.
- **Fração F3 P-ligado ao ferro (III) cristalino:** Cerca de 100 mg da amostra macerada e homogeneizada foi pesada em tubos de 15 mL. Posteriormente, foram adicionados em cada amostra 0,5625 g de diotinito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 10 mL da solução de CDB (solução de citrato de sódio e bicarbonato de sódio areada por 15min com N_2) e cada amostra foi borbulhada com N_2 individualmente por 5 segundos. Os tubos foram fechados e agitados em vórtex para soltar os sólidos aderidos à parede do tubo. A mistura foi mantida em agitação por 4 h e, posteriormente, centrifugada por 15 min a 4000 RPM. As amostras foram diluídas em solução HCl 0,2 M (1:10) e mantidas em descanso por 24h, para a degradação do ditonito. Após este período, a leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3 e R4. O restante do extrato foi descartado cuidadosamente dos tubos e adicionou-se 10 ml de MgCl_2 para lavar as amostras. Os tubos

fechados foram passados no vórtex e centrifugados. O cloreto de magnésio foi cuidadosamente descartado para dar andamento às etapas seguintes.

- **Fração F4 P-ligado à hidroxiapatita autigênica:** 10 mL da solução de NH_4Cl (2M) foram adicionados nas amostras e mantidas em agitação por 16h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 RPM e diluídas em solução HCl 0,2 M (1:10). A leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3 e R4. O restante do extrato foi descartado cuidadosamente dos tubos e adicionou-se 10 ml de MgCl_2 para lavar as amostras. Os tubos fechados foram passados no vórtex e centrifugados. O cloreto de magnésio foi cuidadosamente descartado para dar andamento às etapas seguintes.
- **Fração F5 P-ligado à apatita carbonática autigênica:** 10 mL da solução de acetato de sódio (1M) foram adicionados às amostras e mantidas sob agitação por 16h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 RPM e diluídas em solução HCl 0,2 M (1:10). A leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3 e R4. O restante do extrato foi descartado cuidadosamente dos tubos e adicionou-se 10 ml de MgCl_2 para lavar as amostras. Os tubos fechados foram passados no vórtex e centrifugados. O cloreto de magnésio foi cuidadosamente descartado para dar andamento às etapas seguintes.
- **Fração F6 P-ligado à apatita detrital e carbonato:** 10 mL da solução HCl (1M) foram adicionados às amostras e nos tubos destinados aos brancos e mantidos sob agitação por 16h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 RPM e diluídas em água ultrapura (1:10). A leitura foi realizada 5 minutos após a adição de R1+R2+R3 e R4. O restante do extrato foi descartado cuidadosamente dos tubos e adicionou-se 10 ml de água ultrapura para lavar as amostras. Os tubos fechados foram passados no vórtex e centrifugados. A água foi cuidadosamente descartada para dar andamento às etapas seguintes.
- **Fração F7 P-orgânico:** Após lavada as amostras de acordo com o indicado no procedimento anterior, foi utilizado o vórtex para soltar as amostras da parede dos tubos e, em seguida, adicionou-se 2,5 ml de H_2SO_4 concentrado nas amostras. Após resfriados, os tubos foram mantidos em agitação por 16 h. Outros tubos de 15 mL contendo 7,5 mL de água ultra pura resfriada foram preparados, seguindo a mesma nomenclatura. Finalizadas as 16h, o conteúdo dos tubos com ácido e amostras foi transferido para os tubos com água ultrapura resfriada. Em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4000 RPM e diluídas em água ultrapura (1:50). A leitura foi realizada 3 horas após a adição de R1+R3 e R4.

b) Metais

➤ Metais no sedimento – extração parcial

Para análise de metais no sedimento foi utilizada a extração parcial segundo método EPA 3051A (U.S. EPA, 2007a). Nesse procedimento, 0,25 g de sedimento previamente liofilizado, macerado (gral e pistilo de ágata) e homogeneizado foram adicionados nos tubos Teflon para extração, sendo adicionados 10

mL de HNO_3 65 % destilado (Sub-boiling). As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), seguindo o respectivo protocolo: 1ª rampa de temperatura 25°C a 175°C em 5:30min. e a 2ª rampa de 25°C a 175°C em 4:30min., ambas em potência de 1600 W. Após o período de digestão e resfriamento dos tubos, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado. Posteriormente, os extratos foram diluídos (1:30) com HNO_3 5 % e acrescidos da solução multi-elementar ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ utilizando padrão multielementar (ICP multi-element standard solution XXI for MS, CentiPUR® (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany).

➤ Elementos Terras Raras no sedimento – extração total

Para a extração dos elementos Terras Raras no sedimento, foi utilizada a digestão total de acordo com o método EPA 3052 (U.S. EPA, 1996c). Nesse procedimento, 0,25 g de sedimento previamente liofilizado, macerado (gral e pistilo de ágata) e homogeneizado foram adicionados nos tubos de Teflon para digestão e extraídos com o uso de 9 mL de ácido (HNO_3 65 %) destilado (Sub-boiling) e 3 mL de ácido fluorídrico (HF). As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), utilizando a rampa de temperatura descrita no método EPA 3052 (U.S. EPA, 1996c). Após essa etapa, foram adicionados 30 mL de ácido bórico (H_3BO_3) a 4% em cada amostra e os extratos foram novamente levados para digestão em forno microondas. Posteriormente, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado e diluídos (1:10) com HNO_3 5 % e acrescidos da solução multi-elementar ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ utilizando padrão multielementar (SpecSol, G21V – ICP 100 mg L^{-1}).

➤ Extração sequencial de metais no sedimento

A análise de metais nas diferentes frações presentes nos sedimentos foi realizada através da extração sequencial proposta por Tessier et al. (1979) (Tabela 6). Este método propõe a quantificação de metais presentes em 5 frações distintas obtidas pela eluição sequencial de uma mesma amostra sedimentar. Os metais nos diferentes extratos obtidos foram quantificados em ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998).

Tabela 6: Frações, etapas de extração e componentes obtidas pelo método de extração sequencial proposto por Tessier et. al. (1979).

FRAÇÕES	ETAPAS DE EXTRAÇÃO	COMPONENTES SEDIMENTARES EXTRAÍDOS
F1 - Trocável	MgCl_2 1 M, pH 7, 1 h	Íons trocáveis
F2 – Adsorvida/	NaOAc 1 M, pH 5 (HOAc), 5 h	Íons adsorvidos, carbonatos

FRAÇÕES	ETAPAS DE EXTRAÇÃO	COMPONENTES SEDIMENTARES EXTRAÍDOS
Carbonática		
F3 - Redutível	NH ₂ OHHCl 0,04 M, em HOAc 25% (v/v), 6 h, 96°C	Óxidos de ferro e manganês
F4 - Sulfídica/ Orgânica	H ₂ O ₂ 30%, pH 2 (HNO ₃), 5 h, 85°C NH ₄ OAc 3,2 M, em HNO ₃ 20% (v/v), 0,5 h	Sulfetos/ Orgânicos
F5 - Residual	HF – HNO ₃ – H ₂ O ₂	Metais ligados em minerais litogênicos

A abertura das amostras foi realizada com o uso de aproximadamente 1 g de sedimento previamente seco (liofilizado) e homogeneizado (macerado em grau e pistilo de ágata) seguindo as seguintes etapas descritas por Tessier (1979):

- **F1 – Trocável:** O sedimento foi extraído a temperatura ambiente por 1 h com a adição de 8 mL da solução de cloreto de magnésio (MgCl₂ 1M; pH 7,0) com agitação contínua em agitador magnético. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos, filtrado em filtro qualitativo e o sedimento remanescente foi armazenado em geladeira para as etapas seguintes.
- **F2 – Adsorvida/Carbonática:** O resíduo da F1 foi extraído a temperatura ambiente com 8 mL de NaOAc 1M, pH ajustado a 5,0 com o uso de ácido acético (HOAc) com agitação contínua em agitador magnético por um período de 5h. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos e filtrado em filtro qualitativo. O sedimento remanescente foi lavado com 10 mL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 1M, centrifugado novamente a 3000 RPM por 15 minutos e separado para as etapas seguintes.
- **F3 – Redutível (Ligados a óxidos de Fe-Mn):** O resíduo da F2 foi extraído com adição 20 mL de NH₂OH·HCl 0,04 M (solução preparada em ácido acético - HOAc 25% (v/v)). A mistura foi condicionada em temperatura a 96 ± 3°C por 6 horas utilizando Banho Maria e agitada ocasionalmente ao longo desse período. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos e filtrado em filtro qualitativo. O sedimento remanescente foi lavado com 10 mL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 1M, centrifugado novamente a 3000 RPM por 15 minutos e separado para as etapas seguintes.
- **F4 – Sulfídica/ orgânica:** O resíduo da F3 foi extraído com a adição de 3 mL de ácido nítrico (HNO₃) 0,02 M e 5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%, com o pH ajustado para 2 com HNO₃. A mistura foi aquecida em banho maria a 85 ± 2 °C por 2 h com agitação ocasional. Após esse período, foram adicionados 3 mL de peróxido de hidrogênio (30 %; pH ajustado a 2,0 com HNO₃) e a mistura foi novamente aquecida a 85 ± 2 °C por 3 h com agitação intermitente. Após o resfriamento, foram adicionados 5 mL de acetato de amônio (3,2 M; NH₄OAc) (solução preparada em HNO₃ 20% (v/v)) e a amostra foi diluída a 20 mL com água

ultrapura e continuamente agitada por 30 minutos. O extrato foi centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos e filtrado em filtro qualitativo e o sedimento remanescente foi mantido em geladeira para a realização da última etapas.

- **F5 – Residual:** O sedimento residual da F4 foi liofilizado e macerado (em grau e pistilo de ágata). 250 mg desse material foi adicionado nos tubos Teflon para extração, sendo adicionados 8 mL de água-régia 3: 1 (v/v) de ácido clorídrico: ácido nítrico em cada amostra. As amostras foram digeridas por meio do forno microondas (CEM, MARS X-PRESS6), segundo o método EPA 3051A (U.S. EPA, 2007a). Após o período de digestão e resfriamento dos tubos, os extratos foram filtrados com filtros quantitativos para a remoção de qualquer material particulado.

Para quantificação, os extratos resultantes de cada fração foram diluídos (1:30) com HNO₃ 5 % e acrescidos da solução multi-elementar (10 µg mL⁻¹; Internal Standard Mix - Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Y; ©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para a correção de possíveis flutuações do sinal analítico. A quantificação dos elementos foi realizada por ICP-MS 7500 cx (©Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de acordo com o método EPA 6020A (U.S. EPA, 1998). A curva de calibração variou de 0,5 a 300 µg g⁻¹ utilizando padrão multielementar (ICP multi-element standard solution XXI for MS, CentiPUR® (©Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany).

c) Compostos orgânicos

➤ Limpeza de Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas nas etapas referentes ao tratamento das amostras para compostos orgânicos foram submetidas ao procedimento de limpeza, através de banho em detergente Extran (5 %) por pelo menos 24 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada com água corrente, água ultrapura, acetona e por fim calcinadas em mufla à 450 °C por um período de 2 horas. Essa última etapa foi realizada somente para as vidrarias não calibradas e mufláveis. Todo o material não muflável, foi lavado com solventes com alto grau de pureza (n-hexano e diclorometano - DCM) antes do seu uso. Vidrarias com material aderido à parede (tais como vials e balões de fundo chato) foram sonicadas em aparelho de ultrassom por, no mínimo, 30 minutos, com solução de Extran 5 % e Acetona HPLC em seu interior, para ajudar na remoção de resíduos orgânicos e pigmentos provenientes das amostras. Todo o material foi protegido com papel alumínio previamente calcinado para armazenamento.

- Extração de Hidrocarbonetos, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Marcadores Lipídicos (esteróis e ácidos graxos), fenóis e aminas em amostras de sedimento
 - Processamento das amostras

As amostras de sedimento recebidas após as campanhas de coleta foram armazenadas em freezer até os procedimentos laboratoriais para análise. As amostras foram liofilizadas e posteriormente homogeneizadas por maceração com auxílio de grau e pistilo de ágata. As metodologias utilizadas para a extração e determinação de hidrocarbonetos, HPAs e biomarcadores lipídicos foram baseadas nos

protocolos EPA 3540C (U.S. EPA, 1996b), EPA 8270D (U.S. EPA, 2007). Aproximadamente 10 g de sedimento liofilizado macerado e 2 g de cobre ativado para a remoção de enxofre molecular foram adicionados em cartuchos de celulose. A fim de verificar a eficiência de extração foram as seguintes soluções padrão à amostra:

- 20 μL de solução padrão de p-terfenil ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$);
- 50 μL de solução padrão das parafinas deuteradas n-C20d, n-C24d e n-C30d ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$);
- 50 μL de solução padrão de dibromofenol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).
- 50 μL de solução padrão de androstanol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).
- 50 μL de solução padrão de Trifenilamina + 1-etil-p-toluidina + 1-4-clorofenil-1,2-fenilenodiamina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

As amostras foram extraídas no equipamento de Soxhlet automático utilizando 90 mL de uma solução 9:1 de diclorometano e metanol (grau HPLC), por 4 horas cada ciclo. O extrato bruto foi transferido para um balão de fundo chato, utilizando pipeta de Pasteur de vidro calcinada, lavando o béquer 3 vezes com solução 9:1 de diclorometano e metanol (grau HPLC). Posteriormente, o extrato bruto sofreu processo de evaporação até aproximadamente 1 mL em rotaevaporador (banho-maria com temperatura entre 30 e 40 °C), o qual foi transferido para um vial de 1,5 mL, utilizando uma pipeta de Pasteur de vidro calcinada, lavando 3 vezes o balão utilizado com solução 9:1 de diclorometano e metanol (grau HPLC). O volume contido no vial foi totalmente seco sob fluxo de nitrogênio. Os analitos de interesse foram ressuspensos adicionando 1 mL de hexano grau HPLC para a etapa de fracionamento. Os extratos para as determinações de aminas não são submetidos ao processo de fracionamento.

➤ Etapa de fracionamento (*Clean up*)

O fracionamento foi realizado a partir do método otimizado com pipeta de Pasteur de vidro, ponta curta calcinada, que foi utilizada como microcoluna cromatográfica. Para reter a fase sólida foi adicionado um chumaço de lã de vidro descontaminada na ponta da microcoluna, a fim de evitar a passagem dos adsorventes. Em seguida, foi adicionada à microcoluna cerca de 1 g de sílica desativada (ativada a 120 °C/12 h e desativada com 5 % de água milli-Q) e cerca de 0,5 g de alumina ativada. Após a montagem da microcoluna, adicionou-se 2 mL de hexano grau HPLC na coluna para lavar os adsorventes e a fibra de vidro. O extrato ressuspensionado foi transferido com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro calcinada, lavando o balão repetidas vezes com o solvente apropriado para cada eluição. Os solventes utilizados nas 4 eluições foram:

- F1: 5 mL de hexano grau HPLC, para eluição da fração contendo os hidrocarbonetos alifáticos;
- F2: 5 mL de uma mistura 1:1 de hexano e diclorometano (grau HPLC), para eluição dos HPA's;
- F3: 5 mL de acetato de etila grau HPLC, para a eluição dos esteróis;

- F4: 5 mL de metanol grau HPLC, para a eluição dos ácidos graxos.

Cada fração foi recolhida separadamente em vial de vidro calcinado de 8 mL com a parte interna da tampa protegida por papel alumínio e evaporada a 1 mL sob fluxo de N₂. As frações F1 e F2 foram ressuspendidas e transferidas para vials de 1,5 mL utilizando no total 1 mL de hexano e armazenadas em congelador até a análise. A fração F3 foi armazenada em congelador até a etapa de silanização, enquanto a F4 foi ressuspendida e transferida para um tubo de ensaio de vidro utilizando cerca de 1 mL de tolueno grau HPLC e armazenada em congelador até a etapa de metilação.

➤ Etapa de derivatização (silanização) de fenóis e esteróis (F3)

Foram adicionados 50 µL do agente BSTFA:TMCS (99:1) a cada vial previamente seco sob fluxo de N₂. Essa solução foi aquecida a 60 °C em estufa por 1 hora, para formar os derivados trimetilsilanos (TMS) dos analitos, secas sob fluxo de N₂ e adicionado 1 mL de hexano e armazenada em congelador até a análise.

➤ Etapa de metilação de ácidos graxos (F4)

A cada extrato da fração F4 adicionou-se 2 mL de solução de cloreto de acetila e metanol (1: 10), os quais foram mantidos em estufa por 12 h a 60 °C. Posteriormente, adicionou-se à amostra 1 mL de diclorometano grau HPLC e 1 mL de solução 10 % de KCl para extração da fase orgânica. A mistura foi submetida à agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugada por 2 minutos a 2000 RPM para obter uma melhor divisão entre as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica (inferior) foi retirada e submetida à passagem em uma microcoluna de vidro (pipeta Pasteur de vidro calcinada) contendo sulfato de sódio anidro PA calcinado, recolhendo-se o eluato final após três processos de extração em vial de 8 mL. O eluato foi seco sob fluxo de N₂, ressuspendido e transferido para vial de 1,5 mL com 1 mL de hexano grau HPLC.

➤ Quantificação de hidrocarbonetos, HPAs e marcadores lipídicos

Antes da análise, foi adicionado padrão interno deuterado de alcanos (n-C16d) e HPA (6 HPA deuterados) nas respectivas frações. Para a quantificação de biomarcadores como terpanos, esteróis e ácidos presentes nas frações F3 e F4, foi utilizado o alfa-colestano como padrão interno e androstanol como surrogates (5 µg mL⁻¹).

A quantificação e identificação dos compostos foi realizada através de um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama e por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas 5975c (GC/MS EPA 8270; U.S. EPA, 2007), ambos equipados com auto amostradores CTC Combi Pal, injetor Split/splitless e coluna capilar DB-5MS (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm). A curva analítica para a determinação de alcanos e HTP foi preparada a partir de um mix padrão de alcanos (n-C8 – C40) na faixa de concentração de 0,5 a 50,0 µg mL⁻¹ com padronização interna (n-C16d – 5 µg mL⁻¹). A programação de temperatura foi configurada com a temperatura inicial de 60 °C por 1 min, então 6 °C / min até 300 °C por 30 min. Para as determinações utilizando-se GC-MS, as condições foram as mesmas citadas, com o acréscimo dos parâmetros de temperaturas do injetor, interface, fonte de íons

e quadrupolo: 300 °C; 300 °C, 200 °C e 150 °C, respectivamente. A quantificação dos HPAs também foi realizada por curva analítica via padronização interna. As curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de 5 a 1000 ng mL⁻¹ utilizando como padrão interno uma solução contendo 5 HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12) na concentração de 100 ng mL⁻¹. Os íons utilizados para a quantificação 16 HPA prioritários, assim como dos seus respectivos padrões internos, estão descritos na Tabela 7. Os HPAs foram determinados através do monitoramento full scan (m/z 50-550) e do monitoramento de íons selecionados (SIM), seguindo as seguintes características: temperatura inicial de 40 °C por 2 min, com taxas de aquecimento de 25 °C / min até 100 °C, 5° C / min até 230 °C, 2 °C / min até 270 °C mantidos por 5 min e 5 °C / min até a temperatura final de 300 °C. Para a determinação dos biomarcadores lipídicos foram utilizadas curvas analíticas com padrões autênticos para esteróis e ácidos graxos. As curvas analíticas para esteróis e ácidos variaram de 0,5 µg mL⁻¹ a 20 µg mL⁻¹. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram preparados a partir de uma mistura contendo 37 ácidos graxos saturados e insaturados. Para a quantificação de esteróis e terpenóides foram utilizados os padrões de dihidrocolesterol, colesterol, estigmastanol, 5a-colestan-3-ona, 5-alfa-colestano, coprostanol, 3beta-taraxerol, campesterol, lanosterol, 3beta-hidróxi-5alfa-androstano, b-sitosterol, e estigmasterol. Os demais compostos identificados foram determinados em função do padrão interno adicionado, devido a inexistência de padrões comerciais referentes as classes a serem avaliadas. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação com injeção de soluções contendo padrões autênticos e consulta à biblioteca de espectros de massas NIST do equipamento.

Tabela 7: Íons de quantificação dos 16 HPAs e padrões internos.

PADRÃO	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (M/Z)	PADRÃO INTERNO	ÍONS DE QUANTIFICAÇÃO (M/Z)
Naftaleno	128	Naftaleno-d8	136
Acenaftileno	152	Acenafteno-d10	162, 164
Acenafteno	152, 154	Acenafteno-d10	162, 164
Fluoreno	165, 166	Acenafteno-d10	162, 164
Fenantreno	178	Fenantreno-d10	188
Antraceno	178	Fenantreno-d10	188
Fluoranteno	202	Fenantreno-d10	188
Pireno	202	Criseno-d12	236, 240
Benzo(a)antraceno	228	Criseno-d12	236, 240
Criseno	228	Criseno-d12	236, 240
Benzo(b)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(k)fluoranteno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Benzo(a)pireno	252, 253	Perileno-d12	260, 264
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276, 278	Perileno-d12	260, 264
Dibenzo(a,h)antraceno	278, 279	Perileno-d12	260, 264
Benzo(g,h,i)perileno	276, 277	Perileno-d12	260, 264
p-Terfenil-d14	240, 244	Criseno-d12	236, 240

➤ Quantificação de fenóis

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada mediante curvas de calibração construídas com padrões analíticos na faixa de concentração que foram divididas dentro da faixa de 0,125 a 1000 μL^{-1} de uma solução mix de fenóis (aquilados, nitro e clorofenóis). Para amostras mais concentradas, curvas analíticas foram construídas em níveis superiores de concentração, na ordem de mg L^{-1} , ou utilizou-se o método de diluição como alternativa para quantificação. Parâmetros de mérito foram determinados tais como, faixa linear, coeficientes de correlação, precisão e limites de detecção e quantificação de maneira a avaliar o desempenho do método proposto para a determinação de compostos fenólicos em água. Coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99 para cada analito foram utilizados como critério de qualidade. Frascos contendo apenas água ultrapura e reagentes derivatizantes foram submetidos a extração e análise como controle e critério de qualidade e rastreabilidade dos processos analíticos. Também foi avaliada diariamente a precisão da curva analítica através de cross check, injeção de padrões em diferentes concentrações como carta controle. A quantificação e identificação dos compostos foi realizada através de um cromatógrafo a gás acoplado com detector por ionização em chama (FID) acoplados em série, equipado com injetor split/splitless, e lâmpada de criptônio de 10,6 eV (GC-FID, método EPA 5021A; U.S. EPA, 2014).

➤ Condições instrumentais do GC-FID

Os parâmetros experimentais utilizados para as análises no GC-FID foram os seguintes: coluna DB-5MS 30 m \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura de filme, programa de temperatura (70 °C durante 5 minutos, aquecimento até 120°C / 8°C min^{-1} , até 135 °C / 2 °C min^{-1} e finalmente até 280 °C / 8 °C min^{-1}). Hélio foi utilizado como gás de arraste com a vazão de 2,0 mL min^{-1} . O injetor foi mantido a 270 °C com purga de septo constante e programado para retornar a modo split após 3 minutos do início da corrida sob a vazão de 50 mL min^{-1} . O detector FID foi programado a 280 °C.

➤ Quantificação de aminas

A determinação quantitativa das aminas foi realizada por cromatografia em fase gasosa equipado com um espectrômetro de massas e amostrador automático (GC/MS EPA 8270; U.S. EPA, 2007). A injeção foi realizada no modo *splitless*, (ativação em 40 s em 280 °C), utilizando o Hélio como gás de arraste (1 mL min^{-1}). A temperatura do forno foi programada de 90 °C (1 min) a 120 °C a 10 °C min^{-1} e, em seguida, a 320°C a 6°C min^{-1} , mantendo a temperatura final durante 15 min. As colunas analíticas utilizadas foram: DB-5 de 30m, ID 0,25 mm e espessura de filme 0,25 μm (J & W Scientific). O GC-MSD foi operado no modo eV EI, full scan (40-550 uma), temperaturas de fonte de íons e de linha de transferência de íons de 220 e 280°C, respectivamente. Para a quantificação de aminas foram utilizados padrões de alta pureza dos seguintes compostos: N-Etil-p-toluidina; Trifenilamina; 6-cloro-3-metil-1-[2-piridinil]-1H-i e N-(4-clorofenil)-1,2-fenil-enediamina.

➤ Condições instrumentais do cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS)

- Coluna cromatográfica capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno com fase de 5 % fenil / 95%metil siloxano e 0,25 μm de espessura do filme;

- Gás carreador: hélio
- Temperatura da fonte: 200 °C
- Impacto eletrônico: 70 eV
- Temperatura da Interface: 280 °C
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Modo de injeção: split, razão do split 1/10
- Volume de injeção: 1 µL
- Programação temperatura: temperatura inicial de 50 °C por 2 minuto, 35 °C min⁻¹ até 100 °C, 10 °C min⁻¹ até 310 °C e isotérmico por 10 minutos.

➤ Contaminantes Emergentes

Todos os solventes utilizados (metanol, clorofórmio, acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, acetona e hexano) possuem pureza adequada (grau HPLC) para a determinação de concentrações em nível traço de compostos orgânicos. Os compostos de interesse investigados nesse trabalho foram estriol (E3), 17-β-estradiol (E2), estrona (E1), ibuprofeno (IBU), 4-octilfenol (OCT), 4-nonilfenol (NON), triclosan (TCL), bisfenol-A (BPA), diclofenaco (DIC), coprostanol (COP) e estigmastanol (ETG). Além destes, foi utilizado como padrão interno deuterado o composto bisfenol-A-D16. Todos apresentam pureza superior a 95% e foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções-estoque e trabalho foram preparadas diluindo em metanol os padrões sólidos. Os valores das concentrações individuais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Concentração das soluções estoque e trabalho preparadas individualmente em metanol.

Analitos	Estoque (µg/mL)	Trabalho (µg/mL)
Estriol	120	1,20
17-β- Estradiol	120	1,20
Estrona	90	0,90
Ibuprofeno	100	1,00
Octilfenol	100	1,00
Nonilfenol	110	1,10
Triclosan	130	1,30
Bisfenol A	130	1,30
Diclofenaco	110	1,10
Coprostanol	100	1,00
Atrazina deuterada	100	1,00
Estigmastanol	110	1,10

O derivatizante N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetiltriclorosilano (BSTFA/TMCS 99:1) também foi adquirido da Sigma-Aldrich.

- Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) modelo TQ8040 da marca Shimadzu. As injeções no GC foram feitas com o auxílio de um amostrador automático modelo AOC-5000 Plus e o volume injetado foi de 1,0 µL.

A temperatura de aquecimento do forno do GC iniciou em 100° C e o mesmo foi aquecido numa razão de 8° C/min até atingir 300° C e assim permaneceu por 10 min. Com esse programa de aquecimento a corrida cromatográfica teve uma duração de 35 min para cada amostra injetada.

O injetor foi operado a 300° C no modo splitless e a coluna cromatográfica era uma DB-5ms (Agilent) com as seguintes características: 30 m de comprimento, 0,25 mm de espessura e revestida com um filme de 0,25 µm de espessura contendo 5% fenil e 95% dimetil-polisiloxano. Como gás de arraste foi empregado hélio com 99,999% de pureza e vazão de 1,0 mL/min.

O espectrômetro de massas possui um analisador de massas que é do tipo triplo quadrupolo e foi operado no modo FFAST, do inglês *Fast Automated Scan/SIM Type*, ou seja, a análise das massas foi realizada simultaneamente nos modos de aquisição scan (varredura completa) e SIM (monitoramento seletivo de íons) após a ionização por impacto de elétrons. A linha de transferência e a fonte de íons permaneceram com temperaturas constantes a 300° C e 250° C, respectivamente.

- Derivatização dos contaminantes emergentes

A derivatização dos compostos de interesse se deu a partir da adição de 1,0 mL de solução trabalho na concentração de 1,0 µg/mL em um vial de 2,0 mL. Evaporou-se todo o metanol (solvente em que foram preparados os compostos-alvo) em um concentrador rotativo a vácuo (RVC 2-18 CD, Christ) a 60° C por aproximadamente 20 min. Após a secagem total do solvente adicionou-se 20 µL do derivatizante N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetiltriclorosilano (BSTFA/TMCS 99:1). Em seguida, o vial foi vedado e a reação de derivatização foi realizada em forno micro-ondas doméstico, na potência de 840 W, durante 5 min (MACHADO, 2015). Ao finalizar essa etapa, o volume foi completado para 1,0 mL com hexano e injetado no GC-MS.

- Armazenamento e preparo das amostras aquosas

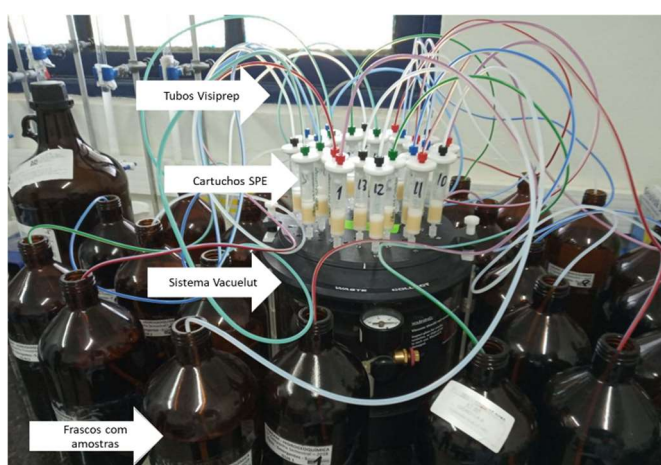
Para cada ponto de amostragem foi coletado individualmente 1 L de água superficial e de fundo empregando frascos em vidro âmbar previamente descontaminados. Os frascos foram totalmente preenchidos com água, selados com papel alumínio calcinado, tampados e mantidos sob refrigeração (4° C) até a realização do procedimento de extração. É importante salientar que às amostras não foram acidificadas ou adicionado qualquer tipo de conservante.

Uma vez no laboratório, as amostras aquosas foram filtradas à vácuo em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm. Para isso, foi empregado um sistema de filtração Nalgene em polisulfona com capacidade de 0,25 L acoplado a uma bomba de vácuo isenta de óleo.

- Extração dos contaminantes emergentes

Após a filtração das amostras, a extração dos contaminantes emergentes foi realizada em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB (Hydrophilic/Lipophilic-Balance) da empresa Waters contendo 500 mg de fase sorvente e 6 mL de capacidade. Esse tipo de cartucho possui como fase sólida um sorvente misto, contendo um polímero lipofílico (divinilbenzeno) combinado com um polímero hidrofílico (n-vinilpirrolidina). Em seguida, os cartuchos foram conectados a um sistema de processamento manifold denominado Vacuelut que consiste em uma câmara de vidro resistente ao vácuo e um conjunto de peças e conexões em teflon (PTFE), que por sua vez foram conectados aos frascos com as amostras e aos cartuchos de SPE (Figura 4).

Figura 4: Extração dos analitos através dos cartuchos de SPE.



O sistema foi conectado aos frascos com as amostras por meio de tubos Visiprep em PTFE a fim de permitir a passagem contínua de todo o volume de amostra pelo cartucho de SPE. Esse sistema permitiu trabalhar de maneira contínua e limpa, uma vez que todos os tubos e conexões utilizados são constituídos por materiais com baixa capacidade sorvente dos compostos orgânicos minimizando assim problemas de contaminação e efeito de memória (MACHADO, 2015).

Montado todo o aparato, o procedimento de extração seguiu os seguintes passos: primeiramente, a fase estacionária dos cartuchos foi condicionada com duas alíquotas de 3,0 mL de metanol, seguida por duas alíquotas de 3,0 mL de água ultrapura (Milli-Q). Após essa etapa, o volume total das amostra foi eluído através do cartucho sob vazão controlada de 6 mL/min. É importante ressaltar que imediatamente após a etapa de condicionamento dos cartuchos de SPE, iniciou-se a extração dos analitos a fim de que a fase sorvente permanecesse úmida durante todo o procedimento de extração e se evitasse a formação de caminhos preferenciais. Após o término da extração, os cartuchos ainda úmidos foram embalados com papel alumínio e mantidos sob refrigeração (4° C), até a eluição e determinação cromatográfica.

- Eluição dos analitos contidos nos cartuchos de SPE

A eluição dos analitos também foi realizada com o auxílio do sistema Vacuelut através da adição de duas alíquotas de 2,5 mL de metanol, seguida de uma alíquota de 2,0 mL de acetonitrila. Os eluatos foram recolhidos em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL e levados a um evaporador rotativo

à vácuo para completa secagem do solvente no concentrador rotativo a vácuo (MACHADO et al., 2016; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010).

- Derivatização dos contaminantes emergentes

Após a secagem do solvente, foram adicionados aos tubos de ensaio 20 μL de agente derivatizante BSTFA. Em seguida, todos os tubos foram tampados e submetidos a aquecimento em forno micro-ondas doméstico por 5 min em 840 W de potência. Aos tubos foi adicionado 1,0 mL de hexano e o volume transferido para um *vial* de 2 mL de capacidade providos de tampa com septo, para posterior determinação por GC-MS (MACHADO, 2015).

- Curvas analíticas dos contaminantes emergentes

As curvas analíticas foram construídas a partir da diluição da solução trabalho contendo a mistura dos compostos de interesse, em sete níveis de concentração: 5, 10, 20, 40, 80, 120 e 160 ng/mL ($n=3$). A concentração do padrão interno, atrazina deuterada, foi mantida constante a 100 ng/mL para todos os níveis das curvas analíticas. O preparo e a injeção das soluções se deram no mesmo dia. A regressão linear das curvas analíticas foi obtida a partir do cálculo da razão entre a área do pico do composto (AA) pela área do pico do padrão interno (API).

➤ Compostos organoclorados (OCs)

A determinação dos compostos organoclorados (OCs) foi realizada no Laboratório de Geoquímica Orgânica e Poluição Marinha (LaGPoM), do Centro de Estudos do Mar, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A descrição detalhada do método analítico utilizado está em Souza et al. (2018) e foi adaptado de UNEP (1992).

Cerca de 20 g de cada amostra de sedimento foi separada para a extração e alocada entre duas pequenas camadas de sulfato de sódio, dentro de cartuchos de vidro específicos para extração em Soxhlet, a qual ocorreu durante 8 horas. Os compostos orgânicos foram extraídos com 80 mL de uma mistura de DCM e *n*-hexano (1:1, v:v). Além disso, em cada frasco de extração foi adicionado cobre ativado, para remover o enxofre elementar e 100 μL de uma mistura de padrões subrogados (PCB 103, 0,25 ng μL^{-1} , e PCB 198, 0,25 ng μL^{-1} ; C-103N e C-198N da *AccuStandard*, New Haven, CT, USA).

Após a etapa de extração em Soxhlet, as amostras foram concentradas em rotavapor a vácuo até 2 mL, e em seguida, foi realizada a etapa de purificação por cromatografia de adsorção em coluna. As colunas de adsorção foram preparadas com sulfato de sódio e 3,2 g de alumina 5% desativada com água Milli-Q® (extraída 5 vezes com *n*-hexano, para assegurar a ausência de possíveis interferentes orgânicos). A eluição foi realizada com 20 mL da mistura de DCM e *n*-hexano (3:7, v:v). Em seguida, os extratos foram novamente concentrados em rotavapor e transferidos para ampolas de vidro. Por fim, foram adicionados 100 μL de uma solução de tetracloro-*m*-xileno (TCMX, 0,25 ng μL^{-1} ; M-8082-SS-10X, da *AccuStandard*, New Haven, CT, USA). O volume final foi ajustado com *n*-hexano, resultando em um extrato de 250 μL .

Para a determinação dos OCs, 2 μL dos extratos purificados foram injetados em um cromatógrafo a gás *Agilent GC 7890 A* acoplado a um espectrômetro de massa (*Agilent 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector*), no modo SIM (*System Ion Monitoring*), equipado com coluna capilar *Agilent 19091J-433*, com 30 m de comprimento, 250 μm de diâmetro interno e fase estacionária de 5 % fenil-metil-siloxano com 0,25 μm de espessura do filme. O gás de arraste foi o Hélio (grau de pureza 99,995%). Foram registrados apenas os picos relacionados aos dois principais fragmentos (m/z) característicos de cada um dos compostos analisados. A rampa de aquecimento utilizada na separação dos compostos teve início em 75 °C, permanecendo por 3 min, quando começou a subir a uma taxa de 15 °C min^{-1} até atingir 150 °C, depois aumentou até 260 °C a uma taxa de 2 °C min^{-1} e então subiu até 300 °C a uma taxa de 20 °C min^{-1} , mantendo-se estável nessa temperatura por 10 min, totalizando 75 min.

➤ Quantificação e controle analítico dos organoclorados (OCs)

Os OCs bifenilas policloradas (PCBs) e pesticidas organoclorados (POCs) analisados são os descritos na Resolução Conama 454/12 para sedimentos de áreas marinhas. A quantificação foi realizada a partir da integração das áreas dos picos de fragmentos de íons específicos (m/z) utilizando o sistema de aquisição de dados *Agilent Enhanced Chemstation (G1701 CA)*. Os OCs foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e m/z específicos com os resultados obtidos do padrão subrogado (PCB 103 e PCB 198) de cada amostra e da curva de calibração (5, 10, 25, 50 e 75 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, $r^2 > 0,995$) das misturas de padrão externos (PCBs: C-WNN e C-WCFS; POCs: AE-00010, da *AccuStandard*, USA).

A fim de identificar a presença de contaminantes durante o procedimento laboratorial, os brancos de extração foram analisados a cada grupo de 11 amostras de sedimentos, e não indicaram interferências externas que justificasse a adoção de medidas corretivas nos procedimentos adotados no LaGPoM. Para estimar perdas ou ganhos de massa dos compostos analisados durante o procedimento analítico, o cálculo da recuperação dos padrões subrogados PCB 103 e PCB 198 foi feito a partir da relação das suas quantidades obtidas com a quantidade adicionada de padrão interno TCMX. As recuperações médias para as amostras foram de $106 \pm 13\%$ (PCB 103), $124 \pm 17\%$ (PCB 198) e $95 \pm 6\%$ (PCB 103), $89 \pm 9\%$ (PCB 198), no ano 1 e no ano de transição, respectivamente, consideradas aceitáveis para validação do método analítico. O limite de detecção (DL) instrumental adotado foi de 0,025 ng g^{-1} , calculado a partir da menor concentração (0,002 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), multiplicada pelo volume final do extrato (250 μL), e massa de sedimento extraída (20,0 g).

A eficiência do método foi verificada através da análise de amostras de intercomparação (IAEA-383) preparado pela Marine Environmental Laboratory of International Atomic Energy Agency (MEL/IAEA). De acordo com o critério de aceitação, a metodologia foi considerada confiável, visto que 80 % dos compostos analisados estiveram dentro da faixa apresentada no certificado, acrescido de $\pm 35\%$.

d) Análise Elementar (C, N, S)

A caracterização da matéria orgânica foi realizada através de análises sobre a composição de seus elementos majoritários, a predominância isotópica entre eles e as moléculas que formam. As análises

da composição elementar (C, N, S) nos sedimentos deste estudo foram realizadas em amostras de sedimento.

As amostras de sedimento a serem analisadas foram liofilizadas e maceradas em gral e pistilo de ágata antes da descarbonatação. Para a análise da composição elementar da matéria orgânica foi realizada a descarbonatação, através da adição de HCl 1M diretamente nas amostras dentro dos tubos de centrifugação (Tipo FALCON). Este procedimento foi repetido por duas vezes sendo as amostras lavadas, centrifugadas e liofilizadas.

A determinação dos teores de C, N e S foi realizada com aproximadamente 10 mg de amostra dos sedimentos utilizando o analisador elementar CHNO EA3000, EUROVECTOR. As amostras foram pesadas em cápsulas de estanho em balança analítica de precisão (0,001 mg) e posteriormente inseridas no equipamento para quantificação. Os testes de exatidão para carbono total e carbono orgânico foram realizados com padrão certificado de sulfanilamida.

➤ Quantificação em Analisador Elementar CHNS

A análise elementar de C, N e S nas amostras de sedimento foi realizada por meio da técnica de Oxidação Catalítica em Alta Temperatura (em inglês, High Temperature Catalytic Oxidation – HTCO), com o aparelho CHNO EA3000, EUROVECTOR. Para as análises, foi realizada uma curva de calibração por meio de padrão de sulfanilamida com massa elementar conhecida, com 6 concentrações entre 0,5 mg a 1,5 mg. O padrão foi pesado nas cápsulas de estanho e analisado antes das amostras, que somente foram analisadas caso a curva padrão apresentasse uma boa regressão ($r^2 > 0,99$). Para controle da qualidade analítica e replicabilidade, foram ainda analisados brancos e amostras em triplicata. Após a inserção das cápsulas de estanho no auto-amostrador, os resultados foram verificados por software no computador e posteriormente tratados em relação a massa obtida para cada elemento e validados pelo coeficiente de variação ($< 10\%$).

e) Isótopos (C, N)

Em cápsulas de prata, foram pesados cerca de 6 (± 1) mg de sedimento previamente liofilizado e macerado. As cápsulas foram posicionadas em barquinhas de cerâmica sobre uma placa aquecedora à 100 °C. Com pipeta Pasteur, foi adicionada 1 gota de HCl (1 mol L^{-1}) diretamente nas amostras dentro da cápsula. O procedimento foi repetido a cada 20 minutos até que não fosse mais observada liberação de CO_2 . As amostras permaneceram à 100 °C em estufa de secagem por 12 horas para posterior injeção no analisador elementar Flash EA acoplado ao espectrômetro de massas de razão isotópica Delta V Plus (EA-EMRI).

As determinações da $\delta^{13}\text{C}$ do carbono orgânico total (COT) e $\delta^{15}\text{N}$ do nitrogênio total (NT) foram realizadas através do analisador elementar Flash EA acoplado ao espectrômetro de massas de razão isotópica Delta V Plus, da marca Thermo. Foram introduzidos dois pulsos do gás de referência (N_2) com intensidade de 7000 mV no início de cada corrida e dois pulsos do gás de referência (CO_2) com intensidade de 14000 mV no final da corrida. Os gases de referência foram previamente calibrados a

partir do valor médio obtido após 10 determinações do padrão certificado IAEA USGS40. Os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ e o $\delta^{13}\text{C}$ são expressos em per mil (‰), calculados de acordo com o valor do segundo pulso do seu respectivo gás de referência. Os valores são reportados como a média de duas injeções.

As condições instrumentais para a determinação dos isótopos de carbono e nitrogênio podem ser consultadas na Tabela 9.

Tabela 9: Condições do AE-EMRI para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

INSTRUMENTO	ESPECIFICAÇÕES
Equipamentos	Analizador Elementar (EA) – Modelo Flash EA, série 1112. Espectrômetro de Massas de Razão Isotópica – Modelo Delta V Plus. Fabricante: Thermo Scientific. Estação de dados: Isodat 3.0
Forno de Combustão	Preenchido com óxido de cobalto, cobre metálico e óxido de cromo
Gases e Fluxos	
Referência (CO_2 e N_2)	150 mL min ⁻¹
Carreador (He)	110 mL min ⁻¹
Oxidação (O_2)	200 mL min ⁻¹
Temperatura	
Forno de combustão	1020 °C

O limite de detecção e de quantificação das análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ estão relacionados a amplitude do sinal produzido pelo analito, que foi estimado em ≥ 500 mV (LD). Para garantir a qualidade analítica dos resultados, o padrão certificado IAEA USGS40 foi injetado a cada 6 injeções (ou 3 amostras), sendo aceito um desvio menor que ± 0.5 ‰.

1.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO

Os métodos utilizados para a avaliação da qualidade da água e do sedimento foram baseados na comparação dos resultados obtidos durante o PMBA/Fest-RRDM com os limites estabelecidos pela legislação pertinente, considerando os parâmetros que apresentam tais valores norteadores. Quando disponíveis, também foram utilizados como critérios relacionados à qualidade, a comparação dos atuais resultados com dados pretéritos publicados para as condições antes do Rompimento da Barragem. Os valores de referência utilizados para cada parâmetro e seus critérios correspondentes (legislação ou dados pretéritos), estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade da água e do sedimento e respectivos critérios utilizados para estabelecer os valores de referência.

CLASSE	PARÂMETROS	MATRIZ	VALORES DE REFERÊNCIA CONSIDERADOS
Nutrientes	Nitrito, nitrato, N-amoniacoal, P-Total	Água	Legislação: CONAMA 357/2005
	Ortofosfato, Nitrito, Nitrato, N-amoniacoal, Silício	Água	Dados pretéritos: Figueiredo et al. (2016)
Metais/metaloide dissolvidos	V, Co, Ni, Cu, As, Ag, Cd, Ba, Pb, Fe, Mn, Zn, Hg	Água	Legislação: NOAA (1999)
Compostos Orgânicos	benzo(a) antraceno; criseno;	Água	Legislação: CONAMA 357/2005
	benzo(b) fluoranteno; bz(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; indeno(1,2,3-cd) pireno; dibenzo(a,h)antraceno		
Metais/metaloide	Ni, Cu, As, Ag, Cd, Ba, Pb, Cr, Zn, Hg	Sedimento	Dados pretéritos: Petrobras (2015a)
	V, Co, Ni, Cu, As, Ag, Cd, Ba, Pb, Cr, Fe, Al, Mn, Zn	Sedimento	Índice SQG-q (PEL – NOAA, 1999)
Compostos Orgânicos (HPAs)	naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, bz(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno.	Sedimento	Índice SQG-q (PEL – NOAA, 1999)
	naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, bz(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, HPA's Totais.	Sedimento	Dados pretéritos: Petrobras (2015b)

Para a avaliação quali-quantitativa desses critérios, foram realizados cálculos da frequência de ocorrência das amostras que apresentaram resultados acima dos valores de referência (% VR), bem como a taxa de incremento em relação a esses valores (VA), segundo a Equação 3 e Equação 4. Esses resultados permitiram avaliar a qualidade da água e sedimento por setor e estação de amostragem, em cada condição de coleta considerada (Período Chuvoso Ano 1, Período Seco Ano 1, Período Chuvoso

Transição/Ano 2), os quais foram plotados em mapas temáticos para a análise espaço-temporal dos critérios estabelecidos.

$$\%VR = \frac{nVR \times 100}{TR}$$

Equação 3

$$VA = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [amostra] / VR$$

Equação 4

Em que, % VR = frequência de ocorrência de amostras que apresentaram concentrações acima dos valores de referência; VR = valores de referência (limites estabelecidos pela legislação ou dados pretéritos); nVR = número de registros em que os valores encontrados nas amostras estiveram acima dos valores de referência; TR = total de registros; VA = taxa de incremento (número de vezes acima do valor de referência); [amostra] = concentração de determinado parâmetro na amostra.

Para avaliar a qualidade do sedimento, também foi utilizado o índice *Sediment Quality Guidelines Quotients* – SQG-q, o qual estabelece critérios de qualidade baseados nos efeitos adversos à fauna bentônica, a partir da normalização das concentrações obtidas nas amostras com os valores de PEL para os respectivos contaminantes (Probable Effect Level; MacDonald et al., 1996). Os compostos avaliados no presente estudo e seus respectivos valores de PEL estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Compostos utilizados para o cálculo do índice Sediment Quality Guidelines Quotients – SQG-q para as seguintes classes de contaminantes: metais/metaloide, compostos orgânicos (HPA's), compostos orgânicos (PCB's e pesticidas). Valores de PEL em mg kg⁻¹ para metais/metaloide e em ng g⁻¹ para compostos orgânicos. Limites PEL disponíveis em Screening Quick Reference Tables – SQulRTs (NOAA, 1999). PEL: Probable Effect Level (MacDonald et al., 1996).

CLASSE DE CONTAMINANTE	COMPOSTO	PEL
Metal/metaloide	As	41,6
	Ag	1,77
	Cd	4,21
	Cr	160
	Cu	108
	Ni	42,8
	Pb	112
	Zn	271
Compostos Orgânicos (HPA's)	naftaleno	391
	acenaftileno	128
	acenafteno	88,9
	fluoreno	144
	fenantreno	544
	antraceno	245
	fluoranteno	1494
	pireno	1398

CLASSE DE CONTAMINANTE	COMPOSTO	PEL
	benzo(a)antraceno	693
	criseno	846
	benzo(a)pireno	763
	dibenzo(a,h)antraceno	135
	HPAs (totais)	16770
Compostos Orgânicos (PCB's e Pesticidas)	PCBs totais	189
	Gama-HCH (Lindano)	0,99
	DDT (pp+op)	4,77
	DDD (pp+op)	7,81
	DDE (pp+op)	374
	Dieldrin	4,3

O cálculo do coeficiente gera resultados individuais para cada elemento/composto avaliado (PEL-q), bem como um índice integrado para as classes de contaminantes (SQG-q metais, SQG-q HPAs, SQG-q PCB's e pesticidas), segundo a Equação 5 e Equação 6.

$$PEL - q = \frac{[contaminante]}{PEL} \quad \text{Equação 5}$$

$$SQG - q = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n PEL - q \quad \text{Equação 6}$$

Em que, [contaminante] = a concentração de cada elemento na amostra em mg kg⁻¹ para metais/metaloide e ng g⁻¹ para compostos orgânicos; PEL = nível de PEL para cada contaminante, segundo NOAA (1999); n = número de contaminantes considerados para cada classe.

Os valores calculados foram, então, discriminados em três classes de qualidade que indicam prováveis efeitos adversos/toxicológicos à fauna bentônica (não impactado: SQG < 0,1; moderadamente impactado: 0,1 < SQG < 1,0; e altamente impactado: SQG > 1,0; MacDonald et al. 2004).

1.5 CÁLCULOS DO INDICADOR DE EUTROFIZAÇÃO COSTEIRA (ICEP)

O indicador das condições de eutrofização costeira (ICEP) é baseado no potencial de conversão dos nutrientes aportados por rios em biomassa de carbono. Para o cálculo são considerados o fósforo e nitrogênio totais (onde um está limitado em função do outro) aportados ou não em excesso no mar em relação a sílica dissolvida. Tanto as formas orgânicas (dissolvidas ou particuladas) quanto inorgânicas de N e P estão disponíveis para sustentar a produção primária marinha (Seitzinger e Sanders, 1999; Wiegner e Seitzinger, 2001) e, portanto, esses nutrientes foram considerados na sua totalidade para o cálculo. Este indicador expressa o potencial dos rios em sustentar a produção nova de algas não

silicosas em regiões marinhas, onde os resultados são expressos em carbono por dia ($C\text{ dia}^{-1}$) e calculados pelas seguintes equações:

$$ICEP = (NFlx/(14*16)-SiFlx/(28*16))*106*12$$

$$ICEP = (PFlx/31-SiFlx/(28*16))*106*12$$

onde PFlx, NFlx e SiFlx correspondem as concentrações encontradas em relação as massas molares e razões estequiométricas de cada nutriente. O valor negativo do índice indica que a sílica está presente em excesso em relação ao nitrogênio e fósforo, levantando a hipótese de que o ambiente apresenta menos problemas atrelados a eutrofização, como a proliferação de algas tóxicas não silicosas. Valores de ICEP positivos indicam um excesso de N e P que pode interferir no crescimento das diatomáceas e favorecer as algas não-silicosas. Este índice é então utilizado para verificar o impacto potencial do Rio Doce no equilíbrio trófico da região marinha adjacente.

1.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados, os quais apresentaram distribuição não-normal ($p < 0,05$). Assim, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para as análises de variação temporal das concentrações de nutrientes, metais e compostos orgânicos na coluna d'água e sedimento, considerando os pares de campanhas correspondentes entre o Ano 1 e o período de Transição.

Com relação aos compostos POPs e PCBs, o teste não paramétrico de Wilcoxon (nível de significância $\alpha = 0,05$) e análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis (nível de significância $\alpha = 0,05$), seguida do teste post-hoc de Dunn (na detecção de diferenças significativas) foi aplicada sempre que observada alguma tendência de variação espacial ou temporal nas concentrações dos POPs analisados. As análises foram realizadas através do pacote estatístico PMCMR (versão 4.3), no ambiente de programação RStudio (versão 1.2.5001).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para identificar os grupos de metal(óides) na água (frações dissolvida e particulada) e sedimento com relação aos diferentes períodos de amostragem e forçantes físicas (vazão e altura significativa de ondas - Hs). Os dados foram normalizados por transformação *standard score* ou *zscore*, a partir da razão entre a média do score bruto pelo desvio padrão. As análises estatísticas foram executadas através do Software PAST (versão 4.03), considerando o nível de significância $\alpha = 0,05$.

2 REFERÊNCIAS

ANSCHUTZ, P.; DEBORDE, J. Spectrophotometric determination of phosphate in matrices from sequential leaching of sediments. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 14, p. 245-256, 2016.

ARMSTRONG, F.A.J.; STERNS, C. R.; STRICKLAND, J.D.H. The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon AutoAnalyzer and associated equipment. **Deep-Sea Res.** 14(3): 381-389, 1967.

BRASIL, 2005. CONAMA Resolução 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (acesso em 07 de Agosto de 2020).

BRASIL, 2012. CONAMA Resolução 454, de 1º de novembro de 2012. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693> (acesso em 07 de Agosto de 2020).

DAVISON, W.; ZHANG, H. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**. 367:546–8, 1994.

DAVISON, W., ZHANG H. (editors). Diffusive Gradients in Thin-Films for Environmental Measurements [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2016 [cited 2020 Oct 30]. Available from: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781316442654>.

dos ANJOS, V.E.; ABATE G.; GRASSI, M.T. Determination of labile species of As (V), Ba, Cd , Co , Cr (III), Cu , Mn , Ni , Pb , Sr , V (V), and Zn in natural waters using diffusive gradients in thin-film (DGT) devices modified with montmorillonite. 1963 – 1972, 2017.

dos ANJOS, V.E. 2010. Desenvolvimento e avaliação de sensores baseados em difusão de filmes finos por gradiente de concentração (DGT) para o estudo da especiação de metais em Águas Naturais [Internet]. Universidade Federal do Paraná. Available from: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/26350?show=full>

FIGUEIREDO, J. A., COSTA, E., MILÁN, E., BARROSO, G. F., NETO, R. R. Nutrientes limitantes e as relações orgânicas e inorgânicas entre o fósforo, nitrogênio e silício no sistema pelágico da Bacia do Espírito Santo e porção Norte da Bacia de Campos – ES/Brasil. **Geochimica Brasiliensis**, 30(2), 95, 2017.

GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; KREMLING, K. Methods of Seawater Analysis, second revised and extended edition, 1983.

MacDONALD, D.D., CARR, R.S., CALDER, F.D., LONG, E.R., INGERSOLL, C.G. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. **Ecotoxicology**, 5(4), 253-278, 1996.

MACDONALD, D.D., CARR, R.S., ECKENROD, D., GREENING, H., GRABE, S., INGERSOLL, C. G., JANICKI, S., JANICKI, J., LINDSKOOG, R.A., LONG, E.R., PRIBBLE, R., SLOANE, G., SMORONG, D.E. Development, evaluation, and application of sediment quality targets for assessing and managing

contaminated sediments in Tampa Bay, Florida. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 46(2), 147-161, 2004.

MACHADO, G.C. Contaminantes químicos emergentes em águas naturais e de abastecimento público: desenvolvimento analítico e estudo de caso envolvendo capitais estaduais do Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Paraná. 138 p, 2015.

MACHADO, Kelly C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MURPHY, J.; RILEY, I.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Anal. Chim. Acta**. 27: 31-36, 1962.

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. 1999. Screening Quick Reference Tables. Disponível em: <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/9327> (acesso em 07 de Agosto de 2020).

PETROBRAS, 2015a. Relatório Final do Projeto de Caracterização Ambiental Regional da Bacia do Espírito Santo e Parte Norte da Bacia de Campos (PCR-ES/AMBES). **Anexo II.2.3-2 – Metais biodisponíveis e totais, fósforo e enxofre nos sedimentos superficiais da Bacia do Espírito Santo e Porção Norte da Bacia de Campos**.

PETROBRAS, 2015b. Relatório Final do Projeto de Caracterização Ambiental Regional da Bacia do Espírito Santo e Parte Norte da Bacia de Campos (PCR-ES/AMBES). **Anexo II.2.3-2 – Metais biodisponíveis e totais, fósforo e enxofre nos sedimentos superficiais da Bacia do Espírito Santo e Porção Norte da Bacia de Campos. Anexo II.2.3-3 – Distribuição de hidrocarbonetos em sedimentos superficiais da região de Influência da Foz do Rio Doce**.

SODRÉ, Fernando F.; LOCATELLI, Marco Antonio F; JARDIM, Wilson F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, 2010

SOUZA, A.C.; COMBI, T.; SILVA, J.; MARTINS, C.C. Occurrence of halogenated organic contaminants in estuarine sediments from a biosphere reserve in Southern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 436–441, 2018.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Anal. Chem.** 51: 844–851, 1979.

UNEP (United Environment Programme). Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments, reference methods for marine pollution studies, p. 75, 1992.

U.S. EPA. 1996a. Method 3510C: Separatory funnel liquid-liquid extraction. Revision 3. 8 p.

U.S. EPA. 1996b. Method 3540C: Soxhlet extraction. Revision 3. 15 p.

U.S. EPA. 1996c. Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Revision 0. 20 p.

U.S. EPA. 2007. Method 8270D: Semivolatile organic compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Revision 4. 72 p.

U.S. EPA. 2014. Method 5021A: Volatile organic compounds in various sample matrices using equilibrium headspace analysis. Revision 2. 31 p.

ZHANG, H.; DAVISON, W. 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Anal Chem.* 67(19):3391–400.