

4

METODOLOGIA

Para uma avaliação geoquímica da área de estudo, através de compostos orgânicos do grupo dos esteróis, foram realizados testes - apresentados no capítulo 4.3 - com a metodologia encontrada em bibliografia e em trabalhos na mesma área de estudo, como Carreira (2000), Kalas (2001) e Lopes (2005), realizando-se as adaptações necessárias para obtenção de um procedimento adequado e de baixa variabilidade, o que resulta em boa recuperação e repetibilidade analíticas.

Para caracterizar o ambiente e entender melhor a distribuição dos esteróis, foram analisados também alguns parâmetros ambientais complementares:

1. Temperatura da água;
2. pH;
3. Profundidade do Disco de Secchi;
4. Salinidade;
5. Clorofilas;
6. Oxigênio Dissolvido (OD);
7. Sólidos em Suspensão (SS);
8. Carbono orgânico (C_{org}) e Nitrogênio total (N_{total});
9. Granulometria do sedimento;
10. Umidade do Sedimento;
11. Lipídios Totais Extraíveis – TLE (Óleos e Graxas).

4.1. AMOSTRAGEM

Foram realizadas duas amostragens, a primeira em 02 de março de 2004 e a segunda em 22 de setembro de 2004. Na amostragem de março, foram coletadas 7 amostras de sedimento superficial e 8 amostras de material particulado. Na amostragem de setembro, foram coletadas 10 amostras de sedimento superficial e 7 amostras de material particulado. As estações de amostragem foram apresentadas no capítulo 3.

As amostras de sedimento superficial foram coletadas para determinação de compostos orgânicos e análise granulométrica, utilizando-se um amostrador de aço do tipo Eckman. A camada superficial (0 - 2 cm) foi sub-amostrada e conservada em embalagens de alumínio previamente descontaminadas.

Para as determinações de compostos orgânicos no material particulado, de clorofila, de carbono orgânico e nitrogênio total e para a quantificação de material particulado em suspensão, foram coletados 4 L de água subsuperficial (a 0,5 m de profundidade). As garrafas de vidro foram imersas fechadas na coluna d'água, sendo abertas na profundidade da coleta para que o filme superficial, mais enriquecido em compostos hidrofóbicos, não contaminasse a amostra.

Todas as amostras foram acondicionadas sob refrigeração para transporte ao laboratório.

Algumas das medições físico-químicas da água de cada estação de amostragem foram realizadas *in situ*: pH, temperatura e profundidade do disco de Secchi. Também foi subamostrada água de cada estação, em frascos apropriados, para medição no laboratório, da salinidade e do oxigênio dissolvido pelo método de Winkler.

No laboratório, as amostras de sedimento foram congeladas à - 80 °C e as amostras de água foram filtradas.

Os princípios teóricos e as metodologias adotadas para cada parâmetro estão descritos a seguir.

4.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.2.1. Temperatura

Segundo Strickland e Parsons (1972) e Tundsi *et al.* (1995), as propriedades físicas, químicas e biológicas de um corpo d'água são sujeitas à influência da temperatura. O transporte de substâncias em rios, sejam elas dissolvidas ou particuladas, também é afetado por este parâmetro físico.

De acordo com Laws (1993), a temperatura, aliada a profundidade e pressão, controla a estabilidade da coluna d'água.

As temperaturas das águas de sub-superfície de cada estação de amostragem foram medidas *in situ* com termômetro de mercúrio graduado em décimo de grau Celsius.

4.2.2. Salinidade

A salinidade da água é obtida indiretamente a partir de cálculos que envolvem a condutividade e a temperatura da água. Também se pode usar um salinômetro, onde a conversão à condutividade é realizada automaticamente.

A condutividade expressa o teor de sais dissolvidos, entre os quais podem-se destacar os cloretos de sódio, magnésio e cálcio, os sulfatos de magnésio, potássio e cálcio e os carbonatos e nitratos de cálcio e magnésio. Os sais dissolvidos e ionizados presentes na água transformam-na num eletrólito capaz de conduzir a corrente elétrica. Como há uma relação de proporcionalidade entre o teor de sais dissolvidos e a condutividade elétrica, pode-se estimar o teor de sais pela medida de condutividade na água. A medida é feita através de condutivímetro e a unidade de condutância adotada pelo Sistema Internacional de Unidades é Siemens (S). Como a condutividade aumenta com a temperatura, emprega-se 25 °C como temperatura padrão (Grasshoff *et al.*, 2000).

Na Resolução CONAMA 357/05, considera-se para fins de classificação, águas doces como as que apresentam até 0,5 g de sais por 1000 g de solução; águas salobras com salinidade maior que 0,5; e as águas salinas como aquelas com salinidade maior ou igual a 30. Os procedimentos de algumas análises e o comportamento da biota são bastante influenciados pela salinidade.

Neste trabalho, as amostras foram conservadas frescas até leitura.

Na coleta de março, as medições deram-se em condutivímetro Analion® modelo C-702 com eletrodo de vidro, em temperatura fixa de 20 °C e escala de unidade de 20 mS (precisão de $\pm 1,5$ % da leitura). O condutivímetro foi calibrado com água do mar padrão de salinidade 34.998 (IAPSO Standard Seawater da Ocean Scientific International Ltd. – 09/12/99, $R_{15} = 0.99995$).

Os valores de salinidade, para esta coleta, foram obtidos através da seguinte equação (UNESCO, 1981 *apud* Grasshoff *et al.*, op. cit.):

$$S = 0,008 + (-0,1692 \cdot (C_a/C_{sw})^{1/2}) + (25,3851 \cdot (C_a/C_{sw})) + (14,0941 \cdot (C_a/C_{sw})^{3/2}) \\ + (-7,0261 \cdot (C_a/C_{sw})^2) + (2,708 \cdot (C_a/C_{sw})^{5/2}) + (((T_a - 15) / (1 + 0,0162 \cdot (T_a - \\ 15))) \cdot (0,0005 + (-0,0056 \cdot (C_a/C_{sw})^{1/2})) + (-0,0066 \cdot (C_a/C_{sw})) + (-0,0375 \cdot \\ (C_a/C_{sw})^{3/2})) + (0,0636 \cdot (C_a/C_{sw})^2) + (-0,0144 \cdot (C_a/C_{sw})^{5/2})$$

Onde: S_a é valor de salinidade; C_a é o valor de condutividade da amostra; C_{sw} é o valor de condutividade da água do mar padrão; T_a é a temperatura da amostra.

Na coleta de setembro as medições deram-se em salinômetro da YSI® modelo 30, ajustado para 20 °C (faixa de leitura de 0 - 80 e acurácia de $\pm 2 \%$), também calibrado com a água do mar padrão.

4.2.3. pH

O pH representa a atividade hidrogeniônica, ou seja, é uma estimativa da concentração dos ácidos ou álcalis presentes em uma solução. As enzimas catalisam todas as reações bioquímicas dos seres vivos e são susceptíveis às reações de desnaturações que as inutilizam, sendo o pH um dos parâmetros capazes de provocar tais desnaturações. Sabe-se que um outro efeito de variações de pH do meio está relacionado ao equilíbrio osmótico das células. Logo, mudanças de pH representam um risco à integridade do metabolismo dos organismos marinhos (Parsons *et al.*, 1984). O pH determina a especiação química nos corpos de água e influencia o transporte, degradação e destino de elementos químicos e compostos diversos.

Os valores de pH das águas de sub-superfície de cada estação de amostragem foram determinados através de medidor de pH Orion® modelo 250A (acurácia de $\pm 0,02$), equipado com eletrodo de vidro previamente calibrado com soluções tampões (4.0, 7.0 e 10.0 da Orion®).

4.2.4. Profundidade do Disco de Secchi

A energia luminosa proveniente do sol modifica substancialmente a estrutura térmica de um corpo d'água e interfere nos padrões de circulação e de estratificação da massa de água. Esta energia também é transformada

biologicamente pelo processo fotossintético, principalmente a radiação compreendida entre 390 a 710 nm, fundamental para o metabolismo dos ecossistemas aquáticos (Pompêo, 1999).

Considerando o regime luminoso, um corpo aquoso pode ser dividido em dois compartimentos: a zona eufótica (região da massa de água iluminada com até 1 % da luz superficial) e a zona afótica (região sem luz) (Pompêo, op. cit.).

Na zona fótica, ao penetrar na massa d'água, a luz tem sua intensidade diminuída e sua composição espectral alterada pela absorção e dispersão. Assim, a luz sofre uma alteração tanto quantitativa como qualitativa, denominada de atenuação da luz, expressa pela Lei de Lambert-Bouguer:

$$I_o = I_z \cdot e^{(-Kds)} \quad (\text{equação 1})$$

Onde **I_o** é a intensidade luminosa subsuperficial, **I_z** a intensidade luminosa na profundidade *z* (m), **Kds** o coeficiente de atenuação vertical (1.m⁻¹).

Um dispositivo muito simples é utilizado para medir a transparência da coluna d'água e avaliar a profundidade da zona fótica, o disco de Secchi. Este consiste em um disco metálico de 20 cm de diâmetro, com dois quadrantes pintados de preto e branco e suspenso por um cabo graduado. A leitura final é a média das medidas das profundidades de desaparecimento e reaparecimento do disco na coluna d'água. O valor obtido de transparência corresponderá à profundidade na qual a incidência de luz corresponde a 1 %, sendo o limite entre a zona eufótica e afótica.

Mesmo não fornecendo dados qualitativos e quantitativos sobre a radiação subaquática, é possível calcular o coeficiente de atenuação vertical da luz (Kds) através das medidas da profundidade do disco de Secchi. A transparência do disco de Secchi (Zds) é, basicamente, função da reflexão da luz na superfície do disco, sendo também dependente da intensidade luminosa subsuperficial (I_o) e da intensidade luminosa na profundidade do desaparecimento visual do disco (I_{ds}) e, de acordo com a lei de Lambert-Bouguer, temos:

$$Zds = \ln(I_o/I_{ds})/Kds \quad (\text{equação 2})$$

Como a relação I_o/I_{ds} é de aproximadamente 1,7, pode-se calcular Kds através da seguinte relação:

$$Kds = 1,7/Zds \quad (\text{equação 3})$$

Desta forma, a partir das equações 1 e 2 podem ser calculados fatores que quando multiplicados pela profundidade do disco de Secchi permitem a obtenção

de profundidades correspondentes a percentuais da luz incidente na coluna de água sub-superficial. Para calcular a profundidade na massa de água cuja intensidade luminosa corresponda a 1 % do valor da sub-superfície deve-se multiplicar a profundidade do disco de Secchi por um fator **fz** de 2,709 (Pompêo, 1999).

Em corpos com águas claras a profundidade do disco de Secchi é mais fiel à realidade, visto que nestas condições ocorre pouca dispersão da radiação, conseqüentemente, a radiação refletida a partir da superfície do disco é, em grande parte, captada pelo observador. Por outro lado, em corpos aquosos com elevadas concentrações de compostos dissolvidos e particulados ocorre maior dispersão da radiação, prejudicando a observação. Em águas muito turvas **fz** da ordem de 4 ou 5 também têm sido utilizados (Pompêo, op. cit.).

Segundo Niencheski *et al.* (1999), os melhores resultados obtidos pela imersão do Disco de Secchi ocorrem quando a medida é realizada entre 10 e 14 horas, correspondendo ao período de incidência de luz mais vertical no sistema aquático. Medidas realizadas em diferentes horas do dia podem representar resultados não significativos, devido a diferenças na iluminação e ondulações na superfície da água, tornando os dados obtidos não comparáveis. Outro fator importante a ser considerado em estudos comparativos, na escala temporal ou espacial, é que as medidas devem ser realizadas pelo mesmo observador (Niencheski *et al.*, 1999).

Contudo, apesar de haver alguns fatores limitantes, o disco de Secchi é amplamente utilizado, devido a sua facilidade de transporte e de obtenção dos dados. Isto proporciona comparações de dados de diversos trabalhos realizados em diferentes países e zonas climáticas (Esteves, 1988).

Neste estudo, o disco de Secchi foi utilizado para determinar o nível de transparência das águas através da profundidade de Secchi, a qual foi empregada na classificação de trofia do ambiente, discutido no capítulo 5. As medidas de profundidade de Secchi foram realizadas entre 9:30 e 14:00 h de acordo com os princípios citados acima.

4.2.5. Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido (OD) provém, em geral, da dissolução do oxigênio atmosférico na água e da produção de oxigênio por organismos fotossintéticos, principalmente o fitoplâncton. A solubilidade do oxigênio é função da altitude, da temperatura e da salinidade do corpo d'água (Libes, 1992).

O nível de disponibilidade de OD na água vai depender do balanço entre a quantidade consumida pela respiração dos seres vivos presentes (fontes pontuais e difusas), a quantidade produzida no próprio corpo d'água através de organismos fotossintéticos e a velocidade de difusão para ou da atmosfera. A perda de oxigênio no ecossistema aquático se dá, então, em processos de oxidação de matéria orgânica, troca com a atmosfera e pela respiração dos seres vivos. Se o balanço de OD permanecer negativo por tempo prolongado, o corpo d'água pode tornar-se anóxico (ausência de oxigênio), causando a geração de maus odores, o crescimento de bactérias anaeróbicas e a morte de diversos seres aeróbicos, inclusive peixes.

Portanto, o OD é um dos principais parâmetros de caracterização dos efeitos da poluição das águas decorrentes de despejos orgânicos. É interessante ressaltar que valores de OD inferiores ao valor de saturação, que considera a salinidade e a temperatura da amostra, podem indicar a presença de matéria orgânica em decomposição e, valores superiores, podem indicar a existência de crescimento anormal de algas.

A determinação do oxigênio dissolvido foi realizada pelo método modificado de Winkler, a partir de Grasshoff *et al.* (2000). A concentração de OD é obtida em mg.L^{-1} e a partir de equações que relacionam a salinidade, a temperatura e a concentração de OD, também pode-se obter o grau de saturação de OD na água (UAO %).

$$\text{mg } O_2.L^{-1} = 0,1016 \cdot f \cdot V \cdot 16$$

$$f = 5 \cdot V^1$$

Onde: **f** é o fator da solução de tiosulfato de sódio; **V** é o volume de tiosulfato de sódio utilizado na titulação.

Os fatores das soluções de tiosulfato de sódio 0.01 M utilizadas neste estudo foram de 1,23 para a solução de março e de 1,39 para a solução de setembro.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 125 mL com tampa esmerilada, tomando-se o cuidado de não formar bolhas de ar na amostra e de fixá-las *in situ*, podendo então, ser estocada por até doze horas em ambiente escuro até a titulação.

4.2.6. Clorofila a, b e c

A determinação de pigmentos é usada como uma estimativa de biomassa fitoplanctônica, podendo ser empregada na determinação de índices de assimilação de nutrientes juntamente com medidas de produtividade primária. A correlação entre concentração de clorofila e disponibilidade de nutrientes é, geralmente, direta. Quando uma região apresenta altas concentrações de ambos, pode ser considerada eutrofizada ou sob este processo (Mayr, 1998).

Dado que toda a produção orgânica de um ecossistema aquático depende dos organismos fotossintetizantes, é fundamental que se considere a medida desta produção como o ponto de partida inicial para uma avaliação sobre o potencial sustentável do mesmo (Tundisi e Tundisi, 1976).

Esteves (1998) menciona que a produtividade primária de um ambiente pode ser definida, em sentido amplo, como a sua capacidade de alimentar organismos, isto é, a sua riqueza em nutrientes que possibilitem a vida e a reprodução de organismos aquáticos. A produção primária refere-se à fixação de carbono inorgânico produzindo matéria orgânica a partir da fotossíntese.

Dentre os fatores importantes relacionados à produtividade primária, a disponibilidade de nutrientes e a intensidade luminosa são fundamentais para otimizar a produção de biomassa em ecossistemas aquáticos. Assim, a dinâmica dos compostos orgânicos e inorgânicos tem um papel fundamental na produtividade em diversos ecossistemas marinhos (Tundisi *et al.*, 1995).

Contudo, o próprio funcionamento do ecossistema faz com que outras variáveis abióticas sejam consideradas, principalmente fatores físicos, como hidrodinâmica, regime de ventos, salinidade e temperatura (Esteves, *op. cit.*). Além disso, corpos de águas tropicais, respondem a mudanças ambientais em

curto prazo. Forças climáticas e meteorológicas, como episódios anômalos de intensa precipitação ou seca, ciclos relativos a rios e à maré, ação de ventos fortes, podem afetar rapidamente o processo biogeoquímico destes corpos (Knoppers *et al.*, 1990).

A produtividade biológica nas zonas costeiras está, em muitos casos, relacionada com a abundância dos organismos planctônicos que constituem a base energética para outros níveis tróficos. O fitoplâncton faz parte desta base em muitos ciclos alimentares em ambientes aquáticos e globalmente está entre os mais importantes produtores primários (Chiu *et al.*, 1994).

A clorofila a é o composto mais comumente determinado em estudos ambientais, por ser o pigmento de mais ampla ocorrência nas populações de microalgas em geral. Com a análise de diferentes tipos de pigmentos, como é o caso das clorofilas a, b e c (figura 7), aliado a determinação de outros pigmentos, é possível estimar as famílias de microalgas prevalentes na região de estudo e, assim, utilizá-las como organismos bioindicadores da qualidade do ambiente, de acordo com as características e propriedades de cada grupo taxonômico (Jeffrey, 1997).

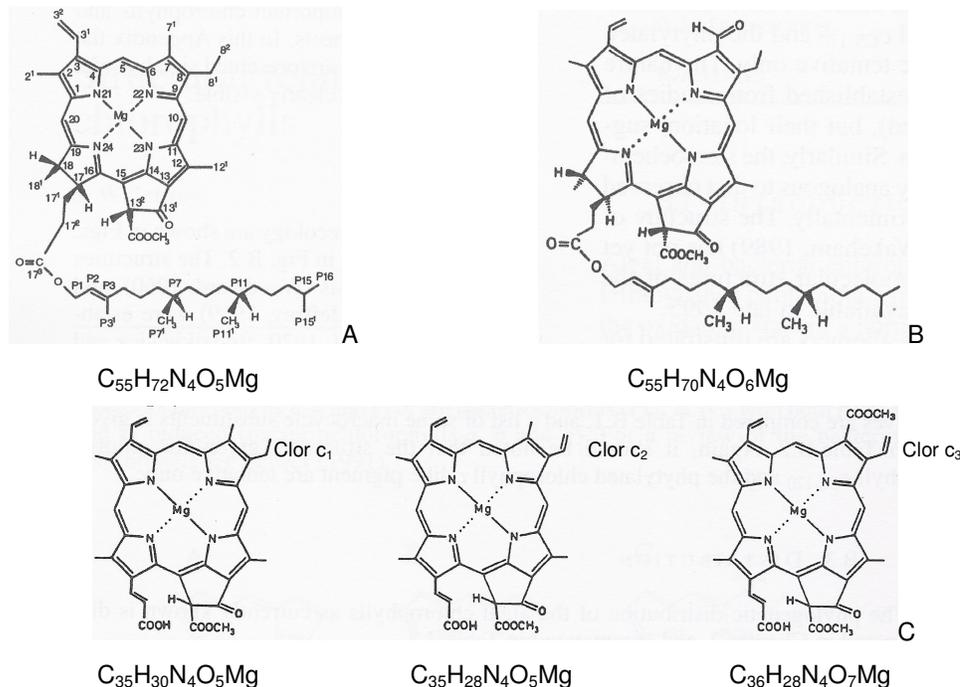


Figura 7: Estrutura molecular das clorofilas. A – clorofila a; B – clorofila b; C – clorofila c total ($c_1 + c_2 + c_3$). Fonte: In Jeffrey *et al.* (ed.) (1997).

As análises metodológicas de clorofila empregadas neste trabalho seguiram Parsons *et al.* (1984) e estão descritas a seguir.

Foram filtrados, no fim de cada dia de coleta, em laboratório, até 100 mL de amostra. O volume filtrado depende da quantidade de sólidos em suspensão presente na água, pois a filtração ocorre até a leve comatação do filtro, sob vácuo fraco, para que não houvesse rompimento das células e cloroplastos. Utilizou-se *kit* de filtração plástico e filtros de membrana de acetato de celulose HA 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro (Millipore®).

Os filtros foram congelados à -80 °C por 18 horas para serem então tratados com solução de acetona 90 %, em tubos de centrífuga, agitando-se vigorosamente, e deixando-os em repouso em ambiente refrigerado e escuro por 16 horas.

Após atingirem temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas de 5 a 10 minutos a 3000 rpm (centrífuga IEC Centra® modelo MP4R). A leitura ocorreu em seguida em espectrofotômetro de varredura (modelo DMS 100 UV-Visível – Intralab, Perkin Elmer®), utilizando-se cubetas de 1 cm, em comprimentos de onda (λ) diferentes: 630, 647, 664 e 750 nm. As amostras foram lidas contra o branco (filtro limpo reagido na solução de acetona 90 %) em cada λ. Corrigiu-se a turbidez descontando-se os valores lidos no λ 750 nm de cada resultado.

Os cálculos para obtermos resultados de clorofilas a, b e c são:

$$C_a = 11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630}$$

$$C_b = 21.03 E_{647} - 5.43 E_{664} - 2.66 E_{630}$$

$$C_c = 24.52 E_{630} - 1.67 E_{664} - 7.60 E_{647}$$

Onde: C_a , C_b e C_c representam os valores de clorofilas a, b e c, respectivamente, em µg.mL⁻¹; E é a absorbância já corrigida para o λ 750 nm; e C_c corresponde ao valor de clorofila c total (Parsons *et al.*, 1984).

Para o valor em miligrama de clorofila por metro cúbico, aplica-se:

$$mg_{clorofila} \cdot m^{-3} = (C.v).(V.10)^{-1}$$

Onde: v é o volume da solução de acetona 90 % utilizado em mL; V é o volume de amostra filtrado em litros; e C é a quantidade do tipo de clorofila.

4.2.7. Sólidos em Suspensão (SS)

Seston - ou sólidos em suspensão (SS) - são pequenas partículas encontradas na água.. O seston é constituído de uma fração mineral (ou inorgânica) e outra orgânica. As concentrações na água são bastante variáveis no espaço e no tempo, dependendo da hidrodinâmica, do aporte terrestre, da constituição do substrato e margens dos corpos d'água, de fatores meteorológicos, biológicos, etc. As águas oceânicas profundas são pobres em SS, enquanto as águas continentais e, principalmente, as estuarinas são bem mais enriquecidas (Strickland e Parsons, 1972).

A quantidade de SS foi obtida a partir dos filtros utilizados para determinação de carbono orgânico particulado, conforme descrito no item seguinte. A massa dos filtros limpos e descontaminados (aquecimento em mufla a 450 °C por 8 horas – Quimis[®]), após atingirem peso constante (medido em balança digital de 5 casas decimais – Mettler Toledo[®] modelo AT 261 Dela Range), foi registrada. A diferença de massa obtida entre o filtro com material (seco em estufa a 60 °C até peso constante - Fanem modelo 315SE - Incibrás[®]) e o filtro limpo corresponde à quantidade de seston presente no volume filtrado.

4.2.8. Carbono Orgânico (Corg) e Nitrogênio Total (NT)

A caracterização da matéria orgânica (MO) no sistema de tributários é de suma importância e utilidade para se conhecer a origem, os processos e características da composição geoquímica de todo o ecossistema estuarino.

A razão C:N (Carbono:Nitrogênio) é determinada a partir de análise elementar e é uma ferramenta bastante utilizada para determinação da origem da matéria orgânica para o meio e dos processos diagenéticos sofridos por ela. Plantas e organismos liberam através da degradação de seus tecidos, tanto carbono quanto nitrogênio, constituintes das estruturas de suas proteínas. A entrada de material orgânico por esgoto doméstico fornece quantidades relativamente maiores de carbono do que o aporte derivado de plantas. Assim, a razão C:N pode servir como reforço para o uso de esteróis como indicadores de poluição antrópica (Lourenço, 2003).

A matéria orgânica de origem autóctone na água, isto é, produzida principalmente pela comunidade planctônica local; tem razão molar de C:N entre 5 e 7 e C:P em torno de 106 (Meyers, 1994). Valores de C:N superiores a 20 são característicos da matéria orgânica terrestre, produzida principalmente por plantas superiores. Também variam as proporções relativas de carboidratos, lipídios, proteínas e outras classes químicas componentes da matéria orgânica total de acordo com sua origem (Macko *et al.*, 1993; Meyers, 1994).

A metodologia utilizada para determinação de carbono e nitrogênio orgânico foi adaptada de Verardo *et al.* (1990). Utilizou-se o método de combustão a seco em um equipamento CHNS (Analisador Elementar da CE Instruments[®], modelo EA 1110). O princípio de funcionamento é baseado na queima catalisada da amostra a alta temperatura.

As amostras de sedimento foram homogeneizadas depois de descongeladas e foi retirada uma alíquota para ir à secura em estufa a 60 °C (Estufa de Secagem e Esterilização Fanem modelo 315 SE – Incibrás[®]). Quando secas, as subamostras foram maceradas em grau e pistilo de ágata. Cerca de 1 g deste sedimento foi pesado em tubos plásticos de centrífuga de 50 mL (Sarstedt) usando-se balança digital de 4 casas decimais (Mettler Toledo[®] AT21 Compactor Pro Fact). As amostras foram descarboxadas para eliminação do carbono inorgânico (carbonato de cálcio) com adição de cerca de 15 - 20 mL da solução aquosa de HCl 1 M (até obtenção de pH 2), deixando reagir em mesa agitadora (a 140 rpm) por 20 horas. As amostras foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Clínica Spin IV – Incibrás[®]), para retirar o ácido e ao lavá-las com água destilada 3 vezes, centrifugando entre as lavagens, com o cuidado para não ocorrer perda de sedimento. As amostras foram secas a 60 °C em estufa com circulação de ar mecânica (FANEM modelo 320-SE – Incibrás[®]) até atingirem peso constante, quando foram, então, remaceradas e levados a 105 °C em estufa (General Signal – Lindberg[®] modelo SW-11TA-1) para retirar toda umidade residual. Alíquotas de 5 - 10 mg foram pesadas em cápsulas de estanho para análise de CHNS. As amostras foram preparadas em duplicata e as análises repetidas no caso do coeficiente de variação ser maior que 20 %.

Na determinação de C e N do material particulado, as amostras de água foram filtradas até comatação dos filtros (até cerca de 350 mL de amostra). A filtração foi realizada a vácuo em *kit* de filtração de vidro, previamente

descontaminado, utilizando-se filtros de fibra de vidro Whatman[®] GF/F de 0,7 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro, também previamente descontaminados e pesados. Após filtração, os filtros foram levados a peso constante em estufa a 60 °C para obtenção da concentração de SS. Foram então, descarbonatados a partir da exposição a vapores de ácido clorídrico concentrado por 18 horas, e secos em estufa a 60 °C por 48 horas, para subamostragem de pequenos círculos de 0,5 cm de diâmetro. Antes de serem acondicionadas nas cápsulas de estanho, as alíquotas passaram uma noite a 105 °C para retirada da umidade residual.

As amostras foram analisadas em triplicata, todos os coeficientes de variação (CV) estiveram abaixo de 20 %. Uma amostra (F-1-5) foi analisada em 6 alíquotas para testar a repetibilidade do método. Os coeficientes de variação (CV) desta amostra foram de 16,43 % para N e de 11,32 % para C.

Todo o material utilizado nas análises de C orgânico e N total foi previamente descontaminado em mufla (a 450 °C, por 8 horas) para a retirada de qualquer traço de substâncias orgânicas porventura presente.

As concentrações de Corg e NT foram obtidas a partir de uma curva de calibração no equipamento utilizando-se como padrão BBOT (C₂₆H₂₆N₂O₂S – 2,5-Bis-(5-tert-butyl-benzoaxazol-2-il)-thiophen) - Thermo Quest Itália s.p.a. – CE Instruments[®]. As cápsulas limpas de estanho foram testadas e não foram encontrados traços de C ou N.

A precisão do procedimento analítico instrumental foi calculada com base nas determinações do padrão BBOT como amostra desconhecida, ao longo da leitura das amostras. Os percentuais encontrados para cada elemento estiveram sempre dentro da faixa satisfatória de 10 % do valor certificado (72,53 % de C, e 6,51 % de N).

O limite de detecção (LD) do equipamento foi calculado da seguinte forma: pesou-se massas decrescentes até o mínimo valor detectável, cerca de 0,1 mg do padrão cistina (nesta massa n = 7), analisando-as; o valor do LD foi calculado como 3 vezes o desvio padrão dos resultados dessas análises para carbono e para nitrogênio. Os valores do LD encontrados em percentual de massa foram de 0,06 % para C e de 0,01 % para N. O Limite de quantificação (LQ) do método é o mesmo valor do LD, já que corresponde a uma massa mínima.

4.2.9. Granulometria

A análise das dimensões das partículas sedimentares é importante para indicar sua origem (tipos de rochas), seu transporte e seus ambientes deposicionais.

“Análise granulométrica consiste na determinação das dimensões das partículas que constituem as amostras representativas do sedimento e no tratamento estatístico dessa informação” (Dias, 2004). Essa determinação e o estudo da distribuição das partículas sedimentares podem ser feitos pelo peso da classe dimensional considerada, pelo seu volume, ou pelo número de partículas integradas em cada classe. Quanto menor for a amplitude das classes granulométricas, melhor é a descrição da variabilidade dimensional das partículas que constituem o sedimento (Dias, op. cit.).

As análises granulométricas foram realizadas no Analisador de Partículas a Laser (CILAS[®] modelo 1064) pelo método de difratometria a laser, comumente designado LALLS – *Low Angle Laser Light Scattering*. Este método baseia-se no princípio de que o ângulo de difração é inversamente proporcional à dimensão da partícula. O equipamento utilizado apresenta faixa analítica de 0,04 microns a 500 microns, 64 detectores e 100 classificações de tamanho de partículas, e dois emissores de laser para uma melhor precisão na faixa do submicron. No funcionamento do equipamento, um laser de He-Ne produz um feixe de luz monocromático, com λ de 830 nm (banda do infra-vermelho) e outro com λ de 635 nm (banda do vermelho), que iluminam uma célula de medida onde se encontra o fluido com as partículas. A luz incidente é difratada pelas partículas sendo então gerado um padrão de difração estável, independente do movimento das partículas. Este padrão de difração é focado por uma lente, para um detector fotoelétrico constituído por um conjunto de detectores de silício foto-sensitivo. Produz-se, deste modo, um sinal proporcional à intensidade da luz incidente, o qual, após ser amplificado por um tubo fotomultiplicador, é transmitido a um computador que registra o padrão de difração e realiza as integrações necessárias. Teoricamente, este tipo de equipamento determina o volume das partículas, deduzindo-se o seu raio (Dias, op. cit.).

A presença de duas fontes de luz para a difração, com λ diferentes – comum nos equipamentos mais modernos - permite ao instrumento cobrir toda a classe

granulométrica em uma única medição, sem qualquer ajuste mecânico ou realinhamento ótico, com maior resolução no que se refere às partículas com dimensões inferiores a um micrômetro. As partículas finas são medidas pelo modelo de difração aplicando à teoria de Fraunhofer ou de Mie. As partículas mais grosseiras são medidas a partir de imagens em tempo real da Transformação Rápida de Fourier (“*Fast Fourier Transform*”), obtidas por uma câmera CCD equipada com uma unidade de processamento digital (DSP) (CILAS, 2005).

Neste estudo, as amostras de sedimento úmido foram homogeneizadas e subamostradas em cerca de 1 g. A fração cascalho é separada do restante da amostra, úmida, em peneira de 500 μm . Após esta primeira peneiração, as amostras foram então, levadas diretamente ao aparelho, onde passaram em ultrassom com água destilada por 5 minutos, para melhor homogeneização, antes da separação granulométrica nas 100 peneiras, determinada pelo laser. Entre cada amostra, o aparelho é programado para rinsagem dos suportes por 4 vezes com água destilada. As amostras referem-se a granulometria total.

Os dados gerados pelo equipamento foram tratados no programa GRADISTAT (Blott, 2000) disponibilizado na internet. A partir deste programa obteve-se a divisão granulométrica de cada amostra e a distribuição de partículas na área de estudo, representada por um diagrama. A tabela 6 apresenta a escala de tamanho adotada pelo programa GRADISTAT.

Tabela 5: Escala de tamanhos de grão do programa GRADISTAT (Blott, 2000), modificada de Udden (1914) e Wentworth (1922).

Tamanho do Grão phi	mm	Termo Descritivo	
-10	1024	Muito Grande	
-9	512	Grande	
-8	256	Médio	Boulder
-7	128	Pequeno	
-6	64	Muito pequeno	
-5	32	Muito grosseiro	
-4	16	Grosseiro	
-3	8	Médio	Cascalho
-2	4	Fino	
-1	2	Muito fino	
0	1	Muito grosseiro	
1	microns 500	Grosseiro	
2	250	Médio	Areia
3	125	Fino	
4	63	Muito fino	
5	31	Muito grosseiro	
6	16	Grosseiro	
7	8	Médio	Silte
8	4	Fino	
9	2	Muito fino	
		Argila	

Nota: O sinônimo de Boulder em português é matacão, pedaço de rocha.

4.2.10. Umidade do sedimento

A quantidade de água numa amostra é importante para se conhecer o tipo de ambiente estudado.

O teor de água das amostras de sedimento foi determinado por diferença de peso entre uma alíquota do sedimento úmida e seca a peso constante. Para tal, foi utilizada estufa a 60 °C e balança analítica de 4 casas decimais. As amostras levaram, em média, uma semana para atingirem o peso constante.

4.2.11. Lipídios Totais Extraíveis (TLE)

Os lipídios totais extraíveis, ou óleos e graxas, constituem a quantidade de lipídios separados da matriz da amostra após a etapa da extração orgânica.

Após a etapa da extração orgânica, os extratos foram levados a exatos 1.000 μL de diclorometano por rotoevaporação (Evaporador Rotativo modelo MA120 - Marconi[®]) a vácuo e redução em fluxo de nitrogênio ultra puro (AGA[®]) e ajuste de volume. Em cápsulas de alumínio descontaminadas e taradas, foram pesadas alíquotas de 5-10 μL de amostra e evaporadas em aquecimento leve. Pelo menos três repetições das pesagens foram realizadas para obtenção de uma média de massa de TLE (mg) com um coeficiente de variação menor que 10 %. Tal resultado é dividido pela massa de sedimento seco extraída, resultando na quantidade de TLE em mg.g^{-1} de amostra. A balança utilizada foi uma Mettler Toledo[®] AT21 digital de 6 casas decimais.

Esse procedimento foi realizado para todas as amostras (material particulado e sedimentos) e brancos, mas somente se obteve resultados maiores que o limite de detecção (massa maior que zero) nas amostras de sedimento e nos filtros referentes à amostra de esgoto bruto, já que o volume utilizado é muito pequeno.

4.2.12. Esteróis

Um grupo de 14 esteróis foi determinado por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG/EM). Para tal, diversas etapas analíticas foram necessárias para a separação dos esteróis de suas matrizes. Em seguida serão descritos essas etapas e os cuidados tomados em cada uma para assegurar uma boa qualidade analítica.

4.2.12.1. Descontaminação

Toda a vidraria utilizada para determinação de esteróis sofreu lavagem com água de torneira e detergente; tratamento em extran; lavagem com água destilada; secagem em estufa a 60° C; e descontaminação em mufla a 450° C por no mínimo 6 horas, ou descontaminação com solventes orgânicos (acetona e diclorometano).

Os solventes utilizados foram: acetona (CH₃COCH₃), n-hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂), metanol (CH₃OH) e acetonitrila (CH₃CN). Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico (pureza ≥ 99.9 %) da Merck[®] ou da Mallinckrodt Chemicals[®].

Todos os reagentes utilizados foram Merck[®] pró análise (p.a.), com grau de pureza ≥ 99 % e foram preparados das seguintes formas:

- *Sulfato de sódio anidro p.a (Na₂SO₄):* descontaminado em mufla a 450° C durante 8 horas. Mantido em estufa a 170 °C e resfriado em dessecador antes de ser utilizado.
- *Sílica Gel 60 - SiO₂ (0,063-0,200 mm):* ativada em estufa a 170 °C por 12 horas. Resfriada em dessecador antes de ser utilizada.
- *Alumina - Al₂O₃ (Alumínio óxido 90 ativo neutro; 0,063-0,200 mm):* descontaminada em mufla a 450° C durante 8 horas. Ativada em estufa a 170 °C. Desativada, a 2 % (p/v), com adição de água destilada previamente extraída com n-hexano e agitação vigorosa, antes de ser utilizada.
- *Cobre ativado:* sulfato de cobre (II) pentahidratado p.a. (CuO₄S.5H₂O) diluído em água destilada na proporção de 1:10 com adição de zinco em

pó na proporção de 1:3 de sulfato de cobre. A solução foi lavada com acetona e diclorometano e reservada protegida da luz e calor.

➤ *Lã de vidro*: descontaminada em mufla a 450° C durante 8 horas.

4.2.12.2. Etapas Analíticas

A figura 13 representa o resumo da metodologia analítica empregada na determinação dos esteróis. Cada etapa é detalhada a seguir.

Extração:

Cerca de 1g de sedimento seco, em estufa a 60 °C, foi submetido à extração em Soxhlet, por 24 horas, utilizando-se como solvente 210 mL da solução diclorometano:metanol 2:1 (v:v). Foram adicionados diretamente sobre o sedimento 1000 ng do padrão subrogado de recuperação, o androstanol (5 α -androstan-3 β -ol), para acompanhar o desempenho da metodologia analítica adotada para esteróis. Foram encontradas recuperações entre 60 e 120 %. Também foram adicionados padrões de recuperação para determinações de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, separados na primeira e segunda fração da coluna cromatográfica, mas cujos resultados não são apresentados neste trabalho.

Para retirada do metanol aplicou-se às amostras o processo de *salting out* com solução salina na proporção 2:2:1,8 (v:v) diclorometano : metanol : solução aquosa de cloreto de sódio 20 %. Para atingir tal proporção, adiciona-se aos extratos das amostras 126 mL da solução NaCl 20 % (extraída com n-hexano) e 70 mL de metanol, agitando-os vigorosamente em funis de separação de 0,5L de vidro ou teflon. A fase orgânica é extraída com n-hexano (3 vezes com 30 mL) e água extraída em n-hexano (2 vezes com 30 mL). A água residual é retirada com adição de sulfato de sódio anidro e repouso por 12 horas. O extrato é reduzido à cerca de 1mL por rotoevaporação e fluxo de nitrogênio ultrapuro.

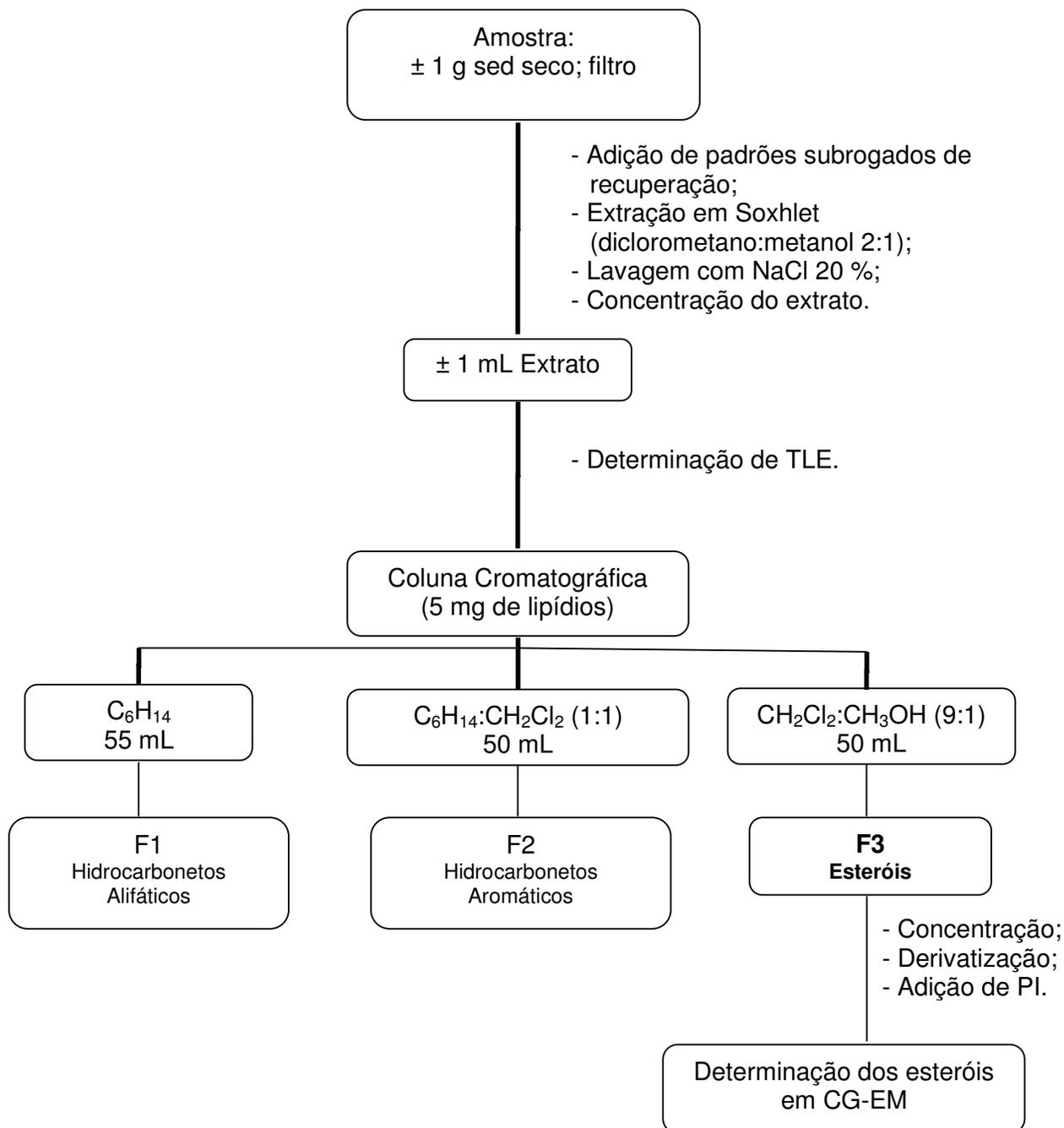


Figura 8: Fluxograma da metodologia analítica utilizada.

Coluna cromatográfica:

Após obtenção do TLE das amostras, utilizou-se volume correspondente a 5 mg de lipídeos de cada amostra, cujo solvente foi substituído para n-hexano, para separar as frações orgânicas na coluna de separação. A coluna tem 13 mm de diâmetro interno e foi montada em diclorometano com 1 g de alumina e 11 g de sílica gel para separação cromatográfica, 1 g de sulfato de sódio anidro para retenção de água residual e 1 g de cobre ativado para retenção de enxofre. Os eluentes utilizados foram:

- 55 mL de n-hexano para a retirada dos hidrocarbonetos alifáticos;
- 50 mL da solução diclorometano:n-hexano 1:1 (v:v) para retirada dos hidrocarbonetos aromáticos e;
- 50 mL da solução diclorometano:metanol 9:1 (v:v) para retirada dos compostos mais polares - esteróis.

Cada fração foi concentrada por rotoevaporação e em fluxo de nitrogênio ultrapuro.

A coluna foi previamente calibrada para a boa separação dos compostos, testando-se os volumes e eluentes utilizados em cada fração.

Derivatização:

A fração dos esteróis foi levada à secura sob fluxo de nitrogênio. Adicionou-se às amostras 500 µL de acetonitrila e 200 µL do reagente derivatizante BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, >99 % de pureza, grau cromatográfico, Supelco®) e aqueceu-se a 60 °C por 15 minutos. O excesso de reagente foi retirado em fluxo de nitrogênio ultrapuro e as amostras foram retomadas em volume conhecido (1 mL) de diclorometano. Adicionamos então, 1000 ng de colestano (C₂₇H₄₈ -5α-colestan) como padrão interno de quantificação à todas as amostras.

Essa etapa é necessária para que os esteróis sejam identificados na cromatografia. Os reagentes derivatizantes promovem a trimetilsilanização de compostos orgânicos polares, trocando hidrogênios ativos pelo grupo trimetilsilil (-Si(CH₃)₃) (figuras 9 e 10). O BSTFA reage mais rapidamente, é termodinamicamente mais estável e é menos suscetível à hidrólise que outros reagentes silanizados, além de causar menos interferências cromatográficas por ser mais volátil. Mas deve-se ter o cuidado de evitar a umidade, por isso, essa

etapa foi desenvolvida em atmosfera de nitrogênio ultrapuro dentro de uma capela inflável (Two hand AtmosBag – Aldrich®).

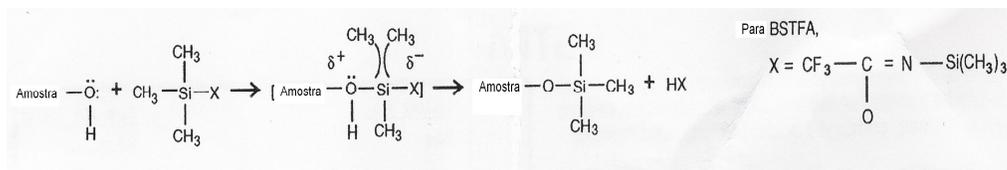


Figura 9. Reação geral para a formação do derivado trialquilsilil. Fonte: Supelco® (2003).

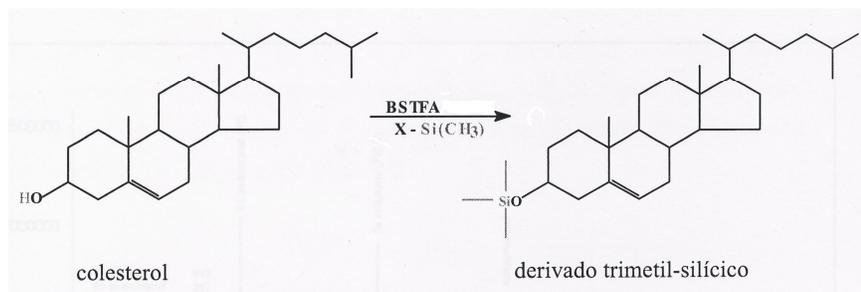


Figura 10. Reação de derivatização esteróis utilizando BSTFA. Fonte: adaptado de Lourenço (2003).

Determinação por CG / EM:

A fração dos esteróis foi analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando-se equipamentos da Thermo Finnigan® (cromatógrafo modelo Trace e espectrômetro de massas modelo GCQ Plus). A programação dos equipamentos foi a seguinte:

- Coluna capilar DB5MS-MSD (5 % metil-fenil silicone), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e revestida com camada de filme de 0,25 µm de espessura;
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Modo de injeção: sem divisão do fluxo (*splitless*);
- Volume de injeção: 1 µL, programando-se lavagens da seringa 8 vezes com 7 µL de cloreto de metileno e 1 vez com a própria amostra antes de cada injeção e 9 vezes com 7 µL cloreto de metileno depois de cada injeção;
- Gás carreador: hélio, sob fluxo constante de 1,2 mL.min⁻¹, ao longo da rampa de temperatura;

- Programa de temperatura: início a 60 °C durante 1 minuto, 6 °C.min⁻¹ até 290 °C, o que leva cerca de 38 minutos, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos, 12 °C.min⁻¹ até 305 °C, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos. O tempo total da corrida foi de 59 minutos;
- Temperatura da linha de transferência entre o CG e o EM: 300 °C;
- Modo de aquisição: total de íons na faixa de 50-550 u.m.a. (*Full Scan*);
- Atraso de solvente: 7 minutos;
- Temperatura da fonte: 200 °C;
- Taxa de aquisição: 0,52 segundo;
- Impacto eletrônico: 70 eV;
- Corrente de emissão: 250 mA.

A identificação dos esteróis foi feita por tempo de retenção (tabela 6), este determinado usando-se padrões autênticos na curva de calibração (a partir de uma solução de 9 esteróis injetados na faixa de concentração de 59,50 a 7.830,00 ng.mL⁻¹) e por comparação de espectros de massas característicos produzidos pelos esteróis. Espectros de massas publicados na literatura foram utilizados para identificação de esteróis para os quais não tínhamos disponíveis padrões autênticos.

As respostas no CG/EM variam para cada esterol pois a área de cada pico é relativa à estrutura da molécula e aos íons gerados. Cria-se então um Fator de Resposta Relativo (**FRR**), que é calculado automaticamente a partir da curva de calibração e de um padrão interno de quantificação (PI). A quantificação dos esteróis foi feita pelo software do equipamento utilizado, através da área do padrão interno e do esterol de interesse e do FRR calculado:

$$Massa_{esterol} = (Área_{esterol} / Área_{PI}) \times (Massa_{PI} / FRR)$$

Dividindo a massa do esterol (ng) pela massa de sedimento extraída (g), obtemos as concentrações em ng.g⁻¹ de sedimento seco.

As concentrações dos esteróis identificados sem padrões autênticos foram obtidas através da curva de calibração de esteróis com padrões que apresentam fragmento de massa comum, ajustando-se os tempos de retenção referentes aos compostos verdadeiros. Assim, o epi-colestanol foi calculado a partir da curva do

coprostanol; o campestanol a partir do campesterol; o β -sitostanol, o dinosterol e o dinosterol-8(14) a partir do β -sitosterol.

As curvas de calibração dos esteróis com padrões autênticos, os cromatogramas dos principais esteróis identificados, assim como seus espectros de massas estão apresentados no Apêndice.

Tabela 6: Tempos de Retenção e Íons utilizados na identificação e quantificação dos esteróis por GC-EM.

Código	Nome Simples	Nome Completo	TR		Íon Molec	Íon Quan	Íon 1	Íon 2	Íon 3	Íon 4	Íon 5
			(min.)	TRR							
S1	Coprostanol	5 β -colestan-3 β -ol	40,11	0,970	460(5)	370,4	355,3	215,3	257		
S2	Epi-coprostanol	5 β -colestan-3 α -ol	40,21	0,972	460(3)	370	355	215	257	56	
S3	Epi-colestanol	5 α -colestan-3 α -ol	40,40	0,977		373	374	388	355	215	233
S4	Coprostanona	5 β -colestan-3-ona	40,97	0,991		386,4	231,3	316,3			
S5	Colesterol	colest-5-en-3 β -ol	41,36	1,000	458(18)	458,3	368,3	353,4	329,3	443,4	
S6	Colestanol	5 α -colestan-3 β -ol	41,50	1,003	460(27)	445,3	460,3	403,4	370,4	356,3	215,3
S7	Colestanona	5 α -colestan-3-ona	41,67	1,007		386,4	231	371			
S8	Campesterol	24-metilcolest-5-en-3 β -ol	43,00	1,040	472(20)	382,4	472,4	367,4	343,3		
S9	Campestanol	24-metil-5 α -colestan-3 β -ol	43,17	1,044	474(42)	474,3	459	417	384	369	
S10	Stigmasterol	24-etilcolest-5,22-dien-3 β -ol	43,53	1,052	484(10)	394,4	484,4	255,4			
S11	β -sitosterol	24-etilcolest-5-en-3 β -ol	44,59	1,078	486(15)	396,5	357,3	486,4			
S12	β -sitostanol	24-etilcolest-3 β -ol	44,80	1,083	488(45)	473,4	431,4	398,4	383,4	215,3	
S13	Dinosterol	4 α ,23,24-trimetil colest-22-en-3 β -ol	45,37	1,097	500(5)	359,3	373,3	388,3	500,4		
S14	Dinosterol-8(14)	4 α ,23,24-trimetil colest-8(14)-en-3 β -ol	46,42	1,122	500(100)	485	410	395	269	243	227
PR	Androstanol	5 α -androstan-3 β -ol	31,44	0,760		333,2	257,3				
PI	Colestano	5 α -colestan	37,78	0,913	372	372,3	148,3	217,3	218,2	357,4	373,4

Legenda: TR – Tempo de Retenção em minutos; TRR – Tempo de Retenção Relativo (TR de cada esteroide dividido pelo TR do colesterol; permite a noção da ordem de separação dos esteróis pela coluna cromatográfica); Íon Molec – Íon Molecular dos compostos, os números em parênteses representam a intensidade espectral desses íons; Íon Quan – Íon de Quantificação utilizado para a identificação do composto pelo CG-EM, os demais íons (1 a 5) são os íons de confirmação da identificação do composto; PR – padrão de Recuperação analítica do método; PI – Padrão Interno de quantificação dos esteróis utilizado pelo CG-EM.

Controle de qualidade do método:

Não existem sedimentos certificados para esteróis, portanto, a confiabilidade do método foi obtida, além do cálculo da recuperação do padrão subrogado, a partir de análises em triplicata de um sedimento de referência de calibração interlaboratorial (IAEA – 417 da Agência de Energia Atômica Internacional, de 2000) analisado por três laboratórios distintos, utilizando a mesma metodologia como para as amostras. A recuperação média das determinações do sedimento de referência foi de 95 % e o desvio padrão de 16,27 %. E para testar a reprodutibilidade do método foram realizadas análises em triplicata da amostra X coletada em 02 de março de 2004. A recuperação média das determinações da amostra X foi de 77 % e o desvio padrão foi de 12,16 %. Tais resultados estão apresentados no capítulo 4.3.

Branco de procedimento analítico também foram realizados ($n = 7$), com valor médio de recuperação de 50,28 % e desvio padrão de 6,87 %. Foi encontrada uma massa média de 72,89 ng de colesterol nos brancos. Todos os valores de esteróis encontrados nos brancos foram descontados das amostras (no Apêndice).

O limite de detecção (LD) do método foi considerado como três vezes o desvio padrão de oito injeções da solução de padrões autênticos de menor concentração detectável (equivalente a cinco vezes a altura da razão sinal/ruído). O primeiro ponto da curva de calibração de cada composto coincidiu com o limite de detecção, por isso utilizamos esse mesmo valor como limite de quantificação (LQ) do método. Os limites de detecção e quantificação encontrados para este método no CG/EM estão reportados na tabela 7.

Tabela 7: Limites de Detecção e Quantificação e maiores valores da Curva de Calibração de cada esterol quantificado para todas as amostras ambientais analisadas.

Composto	LD = LQ (ng.g⁻¹)	Concentrações mais altas da curva de calibração (ng.g⁻¹)
Coprostanol	14,00 - 66,35	1043,22 - 4329,38
Epi-colestanol	17,41 - 72,26	1043,22 - 4329,38
Epi-coprostanol	15,99 - 66,35	1108,96 - 4602,18
Coprostanona	13,89 - 57,66	894,40 - 3711,78
Colesterol	12,78 - 53,04	1297,78 - 5385,79
Colestanol	19,29 - 80,07	1431,79 - 5941,91
Colestanona	27,94 - 115,94	1906,47 - 7911,86
Campesterol	13,39 - 55,58	861,30 - 3574,38
Campestanol	13,39 - 55,58	861,30 - 3574,38
Estigmasterol	18,10 - 75,10	1113,52 - 4621,12
β-sitosterol	13,00 - 86,44	1233,91 - 5120,72
β-sitostanol	20,83 - 86,44	1233,91 - 5120,72
Dinosterol	20,83 - 86,44	1233,91 - 5120,72
Dinosterol-8(14)	20,83 - 86,44	1233,91 - 5120,72

Nota: Os LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação) para a amostra de esgoto Bruto (EB) variaram de 185,27 a 386,47 ng.L⁻¹ para os compostos analisados e a maior concentração da curva de calibração variou entre 11.914,60 e 26.372,87 ng.L⁻¹ para os compostos analisados.

As amostras cujos valores estiveram fora da curva de calibração sofreram diluições de até 20 vezes antes de serem reanalisadas.

O tratamento estatístico descritivo foi aplicado a todos os resultados obtidos neste trabalho. Teste de correlação não-paramétrica de Spearman também foi aplicado e os resultados utilizados na discussão dos dados estão relatados ao longo do texto.

4.3. TESTES METODOLÓGICOS

A metodologia para a análise dos esteróis por GC-EM foi otimizada através de testes metodológicos tendo como base métodos descritos na literatura. Estes

testes são descritos a seguir e os resultados deles apresentados nas tabelas 1A, 2A e 3A no Apêndice.

TESTE 1: TESTE DE DERIVATIZAÇÃO:

Para escolher o método de derivatização da fração de esteróis mais eficaz para determinação no CG-EM foi realizado um teste com soluções contendo 9 padrões autênticos de esteróis. Quatro alíquotas com a mesma concentração foram submetidas a derivatização a seco e outras quatro, também com a mesma concentração, foram derivatizadas em 500 μ L de acetonitrila. Em ambos os métodos a derivatização foi realizada com a adição de 200 μ L de BSTFA e aquecimento a 60 °C por 15 minutos. O reagente é posteriormente evaporado em fluxo de nitrogênio e o extrato é avolumado a exatos 1 mL com diclorometano e adiciona-se 1000 ng de colestano como padrão interno.

Como pode ser observado na tabela 1A no Apêndice, os resultados de maior repetitividade foram os obtidos com a derivatização em solução, neste caso 500 μ L de acetonitrila, cujos coeficientes de variação estiveram entre 1,82 e 4,83 %. Da mesma forma, as recuperações foram maiores na derivatização em solução, com valor médio de 87,99 % e desvio padrão de 2,07 %. Esta metodologia foi então aplicada também às amostras.

TESTE 2: TESTE DE EXTRAÇÃO ORGÂNICA COM SEDIMENTO REFERENCIADO:

Para verificar-se o método de extração orgânica mais eficaz para separação dos esteróis da matriz sedimento realizamos um teste de extração utilizando o sedimento referenciado pela IAEA (IAEA-417) empregando duas misturas de solventes orgânicos diferentes na extração por refluxo em Soxhlet, uma de acetona:diclorometano 1:1 (v:v) e outra de diclorometano:metanol 2:1 (v:v). Foram extraídas 4 réplicas do sedimento referenciado para cada mistura de extração, todas por 24 horas.

Como pode ser observado na tabela 2A no Apêndice, os valores das concentrações dos esteróis são semelhantes para ambas as extrações. Entretanto, os resultados de maior repetitividade foram os obtidos utilizando-se como

solvente de extração a solução diclorometano:metanol 2:1 (v:v), cuja média do coeficiente de variação para os esteróis fecais (os 6 primeiros da tabela 2A no Apêndice) foi de 11,48 %. Da mesma forma, as recuperações do padrão subrogado (androstanol) foram melhores com este solvente, com valor médio de 95,50 % e desvio padrão de 23,02 %. Esta metodologia foi então aplicada também às amostras.

Os resultados reportados por quatro laboratórios dentro do programa de intercalibração laboratorial da IAEA para esteróis no sedimento IAEA-417 estão apresentados na tabela 4A no Apêndice. Estes resultados reportados pela IAEA apresentaram faixas de concentrações grandes. Nesse contexto, observa-se que os resultados dos esteróis obtidos com a metodologia adotada neste estudo foram dentro dessas faixas e que os coeficientes de variação obtidos neste estudo estiveram consideravelmente baixos.

TESTE 3: TESTE DE REPRODUTIBILIDADE - AMOSTRA X:

Para atestar a reprodutibilidade da metodologia adotada na determinação de esteróis por CG-EM, esta foi empregada em quatro alíquotas da amostra X - amostra de sedimento superficial da Baía de Guanabara - coletada em 02 de março de 2005. A metodologia empregada neste teste consiste na descrita no item 4.2.12.2.

Na tabela 3A no Apêndice observamos que os resultados mostraram repetitividades bastante razoáveis para todos os esteróis, considerando-se a complexidade da matriz. Os coeficientes de variação estiveram entre 4,85 e 22,56 % e o valor médio das recuperações foi de 77,02 % com desvio padrão de 12,16 %.