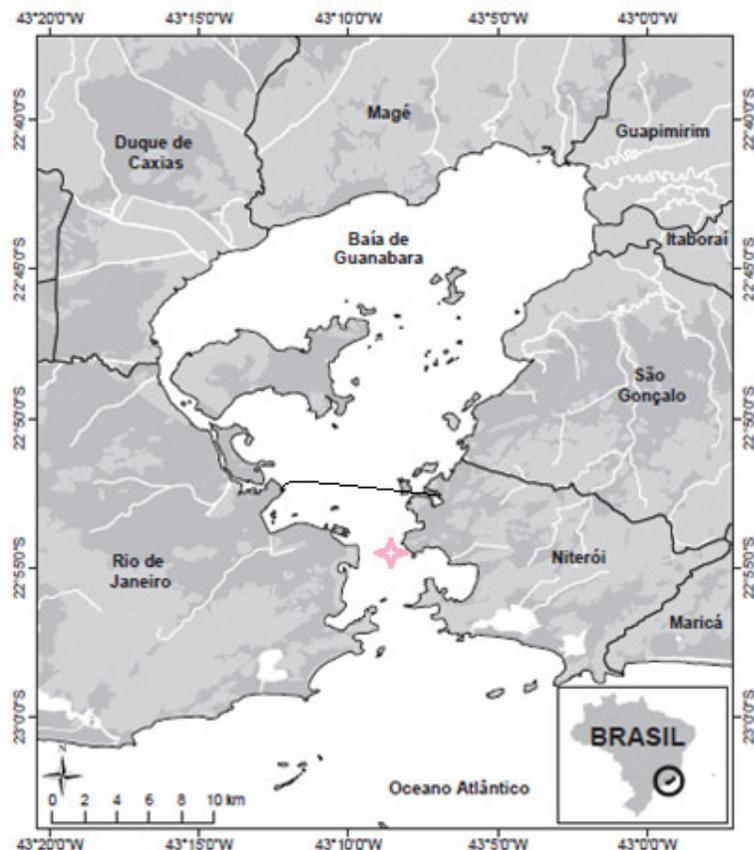


## 5 Materiais e Métodos

### 5.1. Amostragem

Foram realizadas duas campanhas de amostragem, a campanha 1 (C1) foi realizada nos dias 16 e 17 de junho de 2011 próximo a entrada do inverno (estação seca) e a campanha 2 (C2) nos dias 9 e 10 de novembro de 2011 próximo a entrada do verão (estação chuvosa) em uma estação fixa  $22^{\circ}54'13''S$  de latitude e  $43^{\circ}08'55''W$  de longitude (Figura 5.1-1) Os dados pluviométricos de cada amostragens estão descritos na tabela 5.1-1. O ponto amostral foi estrategicamente escolhido por estar próximo ao canal central e também próximo à desembocadura de modo a abranger todo o fluxo de entrada e saída de material da Baía de Guanabara. As expedições foram feitas no período de maré de sizígia (lua cheia ou nova) a qual permite obter maiores variações de amplitude entre a preamar e a baixa-mar. A duração foi de 25 horas com o objetivo de amostrar um ciclo de maré diurna. Os dados de variação de maré foram obtidos na estação maregráfica da Marinha do Brasil na Ilha Fiscal e podem não corresponder ao exato valor da variação da maré na estação de amostragem, porém auxiliaram na ilustração dos parâmetros obtidos e na propagação da onda de maré ao longo da amostragem. Foram realizadas coletas a cada 2 horas a fim de obter material dos regimes de marés vazante (saída de água continental) e enchente (entrada de água marinha). Para levar em conta os gradientes verticais da coluna d'água foram amostradas em 3 profundidades distintas (superfície <1m (S), meia-água 5m (M) e fundo 25m (F)), resultando em 13 amostragens totalizando 39 amostras em cada campanha, exceto para a C2 que foi realizado um fundeio a mais para acompanhar os dados coletados pelo ADCP. As campanhas foram realizadas a bordo da embarcação Parcel da empresa Alfamar, com profundidade local variando entre 28 e 30 metros. A tabela 5.1-1 descreve o horário de cada amostragem. Deve-se ressaltar que a C2 foi realizada dentro do período do horário de verão, o qual se adianta 1 hora do horário de Brasília, devido à incidência solar.



**Figura 5.1-1:** Mapa da Baía de Guanabara mostrando a estação de amostragem.

**Tabela 5.1-1:** Dados pluviométricos referentes ao dia anterior de cada amostragem, aos dias das amostragens e a precipitação total mensal (acumulada).

Data	Precipitação (mm)	Data	Precipitação (mm)
15/06/2011	8,8	08/11/2011	0
16/06/2011	0	09/11/2011	0
17/06/2011	0	10/11/2011	0
Acumulada mensal	81,7	Acumulada mensal	106,1

Fonte: INMET - BDMEP - ESTAÇÃO DO RIO DE JANEIRO (Nº 83.743: Rio de Janeiro - Coordenadas: 22º88'S e 43º18'W – Altura da estação pluviométrica: 11,10 m.

**Tabela 5.1-2:** Horários de amostragens da C1 e C2.

	C1			C2		
	S	M	F	S	M	F
1	10:37:00	10:42:00	11:22:00	07:50:00	07:30:00	07:20:00
2	12:30:00	12:42:00	12:53:00	09:26:00	09:33:00	09:42:00
3	14:40:00	14:53:00	15:07:00	11:23:00	11:27:00	11:35:00
4	16:32:00	16:40:00	16:53:00	13:24:00	13:27:00	13:39:00
5	18:30:00	18:40:00	18:52:00	15:45:00	15:43:00	15:40:00
6	20:37:00	20:45:00	20:51:00	17:59:00	17:52:00	17:24:00
7	22:43:00	22:52:00	23:01:00	19:20:00	19:29:00	19:38:00
8	00:40:00	00:49:00	00:58:00	21:41:00	21:38:00	21:20:00
9	02:39:00	02:54:00	03:00:00	23:27:00	23:35:00	23:48:00
10	04:37:00	04:46:00	04:57:00	01:32:00	01:40:00	01:55:00
11	06:40:00	06:53:00	07:02:00	03:35:00	03:48:00	03:57:00
12	08:37:00	08:45:00	08:53:00	05:43:00	05:53:00	06:15:00
13	10:35:00	10:42:00	10:50:00	07:44:00	07:39:00	07:31:00
14				09:35:00	09:31:00	09:26:00

A coleta das amostras destinadas às análises do material orgânico particulado e dissolvido foi feita com a ajuda de cabos junto a amostradores de garrafas de vidro de 4 litros, sendo 3 garrafas por profundidade. Já as amostras destinadas às análises de clorofilas e nutrientes inorgânicos dissolvidos foram coletadas em garrafas Go-flo de 4 litros e armazenadas em garrafas de plástico de 1,5 litro, também foram coletadas 3 para cada profundidade. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas até o processo de filtração no laboratório para preservar ao máximo os analitos de interesse com a intenção de estes serem representativos do ambiente estudado. As amostras de bacterioplâncton foram fixadas com paraformaldeído imediatamente após cada coleta e mantidas em nitrogênio líquido até serem analisadas. As amostras destinadas à determinação de nitrogênio amoniacal foram armazenadas em tubos de vidro de 50 mL com tampa de rosca e também foram fixadas em campo seguindo o método descrito em Grasshoff *et al.* (1999).

Os parâmetros físico-químicos como pH, T°C, OD e profundidade do disco de Secchi foram determinados *in situ*. As amostras destinadas às análises de salinidade foram armazenadas em tubos de centrifuga de 50 mL e mantidas refrigeradas até à análise em laboratório.

Simultaneamente foram coletados dados de T°C, salinidade e profundidade através do sistema Conductivity, Temperature and Depth (CTD) a fim de obter um perfil de toda a coluna d'água à cada hora. Além disto, foi instalado um perfilador acústico doppler de correntes (ADCP WorkHorse 600KHz) para obtenção de dados de corrente.

As amostras de água foram direcionadas para o laboratório para então serem filtradas obtendo o material particulado em suspensão. As destinadas às análises de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 142 mm de diâmetro e 0,7 $\mu$ m de porosidade da marca Macherey-Nagel. As amostras destinadas às análises de carbono orgânico particulado (COP), nitrogênio particulado (NP) e razões isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 47 mm e 0,7 $\mu$ m de porosidade da mesma marca, ambas com o auxílio de um kit filtração e bomba à vácuo. As amostras destinadas as análises de clorofila foram filtradas em filtros de acetato de celulose e estes foram imediatamente imersos em solução de acetona 90% para posterior análise. A água resultante desta filtração foi armazenada em garrafas plásticas de 500mL e congeladas para análises de nutrientes inorgânicos dissolvidos: fosfato, nitrito e nitrato.

## **5.2. Descontaminação do material**

Todo o material utilizado nas amostragens, no tratamento das amostras e durante as etapas analíticas passou por processo de lavagem com solução de detertec 10% e água corrente, rinsado severas vezes com água destilada e Milli-Q e por fim descontaminados conforme suas necessidades.

As garrafas de plástico destinadas à amostragem e armazenamento de água para análises de clorofilas e nutrientes foram lavadas com solução de HCl 0,1M e rinsada sucessivas vezes com água milli-Q.

Toda a vidraria utilizada para determinação de material orgânico particulado e dissolvido, após a lavagem passou pelo processo de descontaminação em mufla à 450 $^{\circ}$  C por 12 horas ou descontaminados com solventes orgânicos (acetona e diclorometano). Os solventes utilizados foram: acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), n-hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). 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:

Lã de vidro: descontaminada em mufla a 450 $^{\circ}$  C durante 8 horas;

Sulfato de sódio anidro p.a ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ): descontaminado em mufla a 450 $^{\circ}$  C durante 8 horas. Mantido em estufa a 170  $^{\circ}$ C e resfriado em dissecador antes de ser utilizado;

Sílica Gel 60 - SiO<sub>2</sub> (0,063-0,200 mm): ativada em estufa a 170 °C por 12 horas. Resfriada em dissecador antes de ser utilizada;

Alumina - Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (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;

Os filtros de acetato de celulose (marca) foram lavados com água destilada, de ambos os lados e levados a secura em estufa à 60°C por 3 horas. Já os filtros de fibra de vidro foram lavados com água destilada, secos em estufa à 60°C e em seguida descontaminados em mufla à 450°C por 12 horas. Após este procedimento todos os filtros foram pesados e colocados individualmente em envelopes de papel alumínio fechados para evitar contaminação até serem utilizados na filtração das amostras.

### **5.3. Nutrientes inorgânicos**

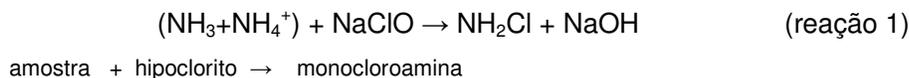
Para a análise de cada nutriente dissolvido foi utilizada uma alíquota (subamostra) tirada da amostra filtrada para a determinação das concentrações de clorofilas. Estas subamostras foram congeladas em garrafas de plásticos de 500 mL e descongeladas no dia da análise de cada nutriente. Esta filtração foi necessária para que ocorresse a separação das formas solúveis e em suspensão na amostra. Desta forma, a subamostra ficou livre de material em suspensão e de turbidez, que perturbariam as análises espectrofotométricas por causarem dispersão da luz incidente, aumentando o resultado da absorbância e superestimando os resultados das concentrações (Baumgarten *et al.*, 2010) exceto para o nitrogênio amoniacal o qual foi passado pelo processo de filtração. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de varredura (modelo DMS 100 UVVisível– Intralab, Perkin Elmer®), utilizando-se cubetas de vidro de comprimento óptico de 5 cm, em diferentes comprimentos de onda  $\lambda$  conforme o nutriente em questão.

#### **5.3.1. Nitrogênio Amoniacal**

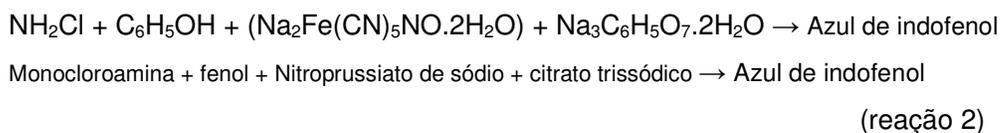
O método utilizado para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>+N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi o método descrito por Strickland & Parsons (1972) (Grasshoff *et al.*, 1999). Baseia-se na medição da totalidade de nitrogênio amoniacal em ambas as formas: N-NH<sub>3</sub> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O amônio foi determinado numa alíquota de

25 mL baseado na reação do azul de indofenol (Aminot e Chaussepied, 1983), no qual a absorbância foi lida a 630 nm. As etapas de reação são:

O nitrogênio amoniacal da amostra reage com o hipoclorito de sódio em meio alcalino (pH entre 10,8 a 11,5) para formar a monocloroamina.



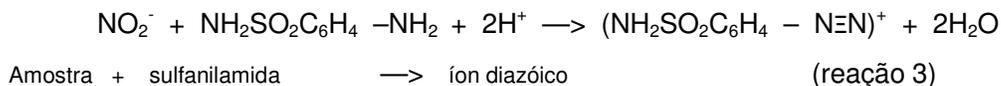
A monocloramina reage com o fenol na presença de um excesso de hipoclorito e também de nitroprussiato de sódio (catalisador), formando o azul de indofenol, cuja absorção máxima é a 630 nm. A fim de evitar a precipitação nesse meio alcalino, dos íons alcalinos terrosos (Ca, Ba, Mg) da água, adiciona-se citrato trissódico (complexante), evitando a interferência quanto a turbidez, que poderia ser causada pela precipitação deste íons.



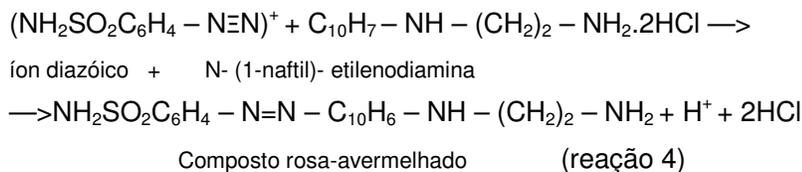
A curva de calibração foi feita utilizando água milli-Q e solução padrão de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) em 8 diluições de (0,5  $\mu\text{M}$  à 15  $\mu\text{M}$ ) mais o branco (Milli-Q). Obtendo o  $R^2 = 0,9961$ .

### 5.3.2. Nitrito

O nitrito  $\text{N-NO}_2$  foi determinado pelo método descrito por Aminot e Chaussepied (1983) (Grasshoff *et al*, 1999), no qual os íons nitrito formam um íon diazótico com a sulfanilamina (reagente 1) em meio ácido (pH < 2). (Baumgarten *et al.*, 2010).



A seguir esse íon reage com o N-naftil etilenodiamina (reagente 2) para formar um composto colorido, cuja absorção máxima é a 543 nm.



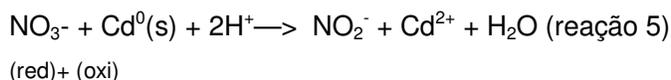
A curva de calibração foi feita utilizando água milli-Q e solução padrão de nitrito de sódio anidro ( $\text{NaNO}_2$ ) em 6 diluições de ( $0,5\mu\text{M}$  à  $4\mu\text{M}$ ) mais o branco (Milli-Q). Obtendo o  $R^2 = 0,9994$ .

### 5.3.3.Nitrato

O nitrato ( $\text{NO}_3$ ) foi analisado por redução quantitativa em coluna redutora preenchida com cádmio granulado tratado com solução cúprica (cádmio envelopado com cobre) e em seguida determinado como nitrito, cuja absorvância foi medida a 543 nm. O método adotado foi o desenvolvido por Wood *et al.* (1967), citado e modificado por Aminot e Chaussepied, (1983), onde a modificação consiste no uso do  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em vez do EDTA.

A concentração do nitrato é determinada subtraindo o nitrito original da amostra, da concentração do nitrito total dosado (somatório deste nitrito com o nitrato reduzido) (Baumgarten *et al.*, 2010).

O princípio geral da reação de redução é:



Em meio neutro ou alcalino a reação é:



A reação de redução depende do metal usado na coluna redutora, do pH da solução e da atividade da superfície do metal.

Equação matemática utilizada:

$$[\text{NO}_3^-(\mu\text{M})] = C \times 1/R - \{[\text{NO}_2^-(\mu\text{M})] \times r/R\}, \quad (2)$$

Onde:

C = somatório das concentrações de nitrito original dosado e nitrato reduzido;  
 $[\text{NO}_2^-(\mu\text{M})]$  = concentração de nitrito original, previamente analisada em outra alíquota da amostra;

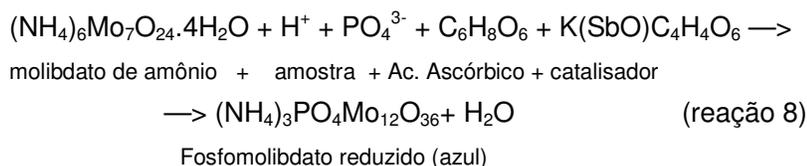
R = rendimento da redução de íons nitrato a nitrito na coluna de cádmio (90% neste trabalho)

r = percentual de íons nitrito não reduzidos pela coluna (100% neste trabalho).

A curva de calibração foi feita utilizando água milli-Q e solução padrão de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) em 8 diluições de (0,5µM à 8µM) mais o branco (Milli-Q). Obtendo o R<sup>2</sup> = 0,9953.

### 5.3.4.Fósforo Inorgânico

O ortofosfato engloba os íons H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, também chamado de fósforo reativo solúvel, fósforo inorgânico ou simplesmente fosfato. O método de análise foi adaptado de Murphy e Riley (1962) e descrito em Aminot e Chaussepied (1983). O princípio básico é a dosagem de fósforo na forma de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, por se constituir na espécie predominante (89%) sobre as espécies PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (10%) e H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (1%), os quais reagem com o molibdato de amônio em meio ácido formando o complexo fosfomolibdato, que é reduzido pelo ácido ascórbico, resultando num complexo azul, cuja absorção máxima é a 880 nm. Essa redução é catalisada pelo tartarato de antimônio e potássio (Baumgarten *et al.*, 2010).



A curva de calibração foi feita utilizando água milli-Q e solução padrão de diidrogeno fosfato de potássio anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) em 6 diluições de (0,5µM à 4µM) mais o branco (Milli-Q). Obtendo o R<sup>2</sup> = 0,9918.

## 5.4. Pigmentos fotossintetizantes

As análises de clorofilas seguiram o método tricromático em extrato de acetona descrito por Parsons *et al.* (1984). Apresentado a seguir:

Primeiramente, no laboratório com a utilização de um kit filtração de plástico (Nalgene) foram filtrados em filtros de acetato de celulose 47mm de

diâmetro e 0,45µm de porosidade (Microlar) ,aproximadamente, 2L de amostra, este volume foi determinado conforme a quantidade de matéria em suspensão presente na água, pois a amostra foi filtrada até que houvesse uma breve comatação do filtro, este procedimento foi feito com o auxílio de uma bomba à vácuo fraco, para que não ocorresse quebra nas estruturas dos pigmentos, como nas células e cloroplastos. Em seguida, cada filtro foi imerso, individualmente, em tubos de centrifuga de 14 mL com aproximadamente 10 mL de solução de acetona 90% agitados e deixados no escuro por 20 horas até sua leitura em espectrofotômetro de varredura (modelo DMS 100 UVVisível– Intralab, Perkin Elmer®), utilizando-se cubetas de vidro de 1 cm, em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ): 630, 647, 664 e 750 nm. As amostras foram lidas contra o branco (filtro limpo reagido na solução de acetona 90 %) em cada  $\lambda$ .

Para os cálculos foram utilizadas as equações de Jeffrey & Humphrey (1975) que se encontra descrito em Parsons *et al.* (1984). Este método permite determinar a concentração de clorofila *a*, *b* e *c* mas não é efetuada nenhuma correção para a presença de produtos de degradação.

$$\text{Clorofila a (mg/m}^3\text{)} = [11,85 (A664-A750) - 1,54 (A647-A750) - 0,08 (A630-A750)] \times V1 / (V2 \times l) \quad (3)$$

$$\text{Clorofila b (mg/m}^3\text{)} = [-5,43 (A664-A750) + 21,03 (A647-A750) - 2,66 (A630-A750)] \times V1 / (V2 \times l) \quad (4)$$

$$\text{Clorofila c (mg/m}^3\text{)} = [-1,67 (A664-A750) - 7,60 (A647-A750) + 24,52 (A630-A750)] \times V1 / (V2 \times l) \quad (5)$$

Onde:

A630 =Absorvância a 630 nm

A647= Absorvância a 647 nm

A664= Absorvância a 664 nm

A750= Absorvância a 750 nm, correção para a turbidez

V1= Volume de acetona a 90% utilizado na extração (mL)

V2= Volume da amostra filtrada (L)

l =Percurso óptico da célula do espectrofotômetro (cm)

## 5.5. Abundância bacteriana

A abundância bacteriana foi enumerada por citometria de fluxo seguindo a descrição de Gasol & del Giorgio (2000) e Andrade *et al.* (2003). Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  foram retiradas da preparação descrita no parágrafo anterior, sendo transferidas para tubos plásticos estéreis específicos para citometria. Os ácidos nucleicos das bactérias foram marcados com 20  $\mu\text{L}$  do fluorocromo Syto13 a 2,5  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes, ref. S-7575) e durante 15 minutos. O Syto13 é um corante que apresenta uma grande afinidade por ácidos nucleicos, podendo ser utilizado para marcar o DNA e o RNA de células vivas e/ou mortas. Cabe ressaltar que este procedimento foi realizado ao abrigo da luz e as amostras imediatamente homogeneizadas em vórtex. Após sonicação, 1  $\mu\text{L}$  de uma solução de microesferas fluorescentes (Fluoresbrite YG carboxilate 1,58  $\mu\text{m}$ , ref 17687, Polysciences) foram adicionados às amostras e utilizadas para calibração do aparelho e como padrão interno das contagens. A concentração de esferas na solução de trabalho foi aferida através de microscopia de epifluorescência seguindo a descrição de Lebaron *et al.* (1994).

A quantificação celular foi realizada através de um citômetro em fluxo FacsCalibur (BD Biosciences) equipado com laser de estado sólido (emissão de 25 mW a 488 nm). A fluorescência emitida pelas bactérias foi observada pelo espalhamento lateral a 90° (SSC, side scatter, eixo X, indicativo de tamanho celular) e pelas fotomultiplicadoras FL1 (510  $\pm$  15 nm) e FL4 (660  $\pm$  15 nm) (eixo Y, fluorescência verde do Syto13 relacionada ao teor de ácidos nucleicos – ver Figura 1). As contagens foram realizadas utilizando-se o programa Summit 4.2 da Dako. A partir destes sinais foram definidas diferentes áreas de contagem, que possibilitaram a determinação do número de esferas e de bactérias totais (Gasol & del Giorgio, 2000; Andrade *et al.*, 2003).

A quantificação citométrica da abundância bacteriana foi realizada com base na taxa entre as células marcadas com o fluorocromo e as microesferas adicionadas às amostras como padrão interno de calibração. Para isso, a fórmula [(número de bactérias contadas por citometria / número de esferas contadas por citometria) X número de esferas contadas por microscopia] foi utilizada. Os valores obtidos foram da ordem de  $10^4$  a  $10^6$  células de bactérias mililitro de água, sendo apresentados em forma logarítmica para normalizar os dados.

## **5.6. Material particulado em suspensão**

Para a quantificação do material particulado em suspensão foram utilizados os filtros de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e 0,7 $\mu$ m de porosidade (Macherey-Nagel). Este parâmetro foi quantificado gravimetricamente, ou seja, os filtros foram pesados anterior e posteriormente à filtração, este último procedimento foi feito após os filtros serem congelados e liofilizados, onde se obtém o peso seco constante das amostras. Os cálculos para a quantificação do seston foram baseados na diferença entre o peso (mg) do filtro com a amostra e o peso do filtro vazio (antes da filtração) dividida pelo volume de amostra filtrada (L). O resultado foi então multiplicado por 1000 e o valor resultante é expresso em mg.L<sup>-1</sup> (Strickland & Parsons, 1972).

A partir destes filtros foram feitas subamostras de pequenos círculos de aproximadamente, 5 mm de diâmetro e mantidos por 18 horas em atmosfera de HCl para remoção do carbono inorgânico e secos em estufa à 60°C por 6 horas e mantidos no dessecador para por fim, serem utilizados para as análises da composição elementar de carbono e nitrogênio e razões isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ , as metodologias serão descritas a seguir. A água filtrada foi destinada às análises de carbono orgânico dissolvido (DOC).

## **5.7. Carbono orgânico dissolvido**

A determinação de DOC foi realizada por oxidação catalítica em alta T°C (720°C), utilizando o analisador Shimadzu TOC-V CSN e 5000A. Este método consiste na acidificação da amostra com HCl 2M (pH 2-3) que ocasiona a liberação de carbono inorgânico. A quantidade total de carbono que permanece na amostra é espargida para então determinar o carbono orgânico não-purgável (Sugimura & Suzuki, 1988).

## **5.8. Composição Elementar**

Para quantificar os teores de COP e NP foi utilizado o método de combustão a seco no equipamento THERMO Scientific (modelo Flash 2000) para isto, as amostras foram previamente cortadas em círculos de cerca de 0,5 cm de diâmetro (subamostras) e então, descarboxatadas (retirada do carbono

inorgânico) a partir da exposição a vapores de ácido clorídrico fumegante concentrado por 18 horas, e secos em estufa a 60 °C por 6 horas. Foram utilizadas 2 subamostras em duplicata. O equipamento foi calibrado com o padrão de ácido aspártico (C = 36,09% p.s e N = 10,52% p.s) sendo aceitos somente valores de  $r=0,99$  ou superiores. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o equipamento foram calculados utilizando a menor quantidade possível do padrão que pode ser detectada  $n=7$ , de forma que o LD é 3 vezes o desvio padrão dos resultados obtidos. Como as medições foram realizadas com massa mínima, foi atribuído ao LQ o mesmo valor do LD (0,003 mg de C e 0,01 mg de N). Um padrão intermediário foi usado como amostra desconhecida a cada 10 amostras reais ao longo da leitura de todas as amostras a fim de assegurar a manutenção da calibração.

### **5.9. Composição isotópica**

Para a quantificação das razões isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  foi utilizado um analisador de carbono/nitrogênio Flash EA 1112 acoplado ao RIMS Delta V Plus ambos da THERMO Scientific (EA-IRMS), por possuir maior sensibilidade do detector foi utilizada metade da subamostra (descarbonatada) para o carbono e inteira para o nitrogênio ambas em duplicata, a fim de evitar que estourasse o pico. Para a calibração do Delta V Plus foi utilizado o material de referência certificado IAEA (USGS 40), ácido L-glutâmico, que possui valores de  $-26.389\text{‰} \pm 0.042$  para  $\delta^{13}\text{C}$  e  $-4.5 \text{‰} \pm 0.1$  para o  $\delta^{15}\text{N}$ . Os limites de detecção e quantificação do equipamento foram verificados através de testes realizados com o USGS 40. As massas do padrão utilizadas para o teste variaram de 0.020 – 0.100 mg. Verificou-se que o equipamento é capaz de detectar sinais com pulsos  $< 500$  mV, entretanto apenas os valores maiores que 500 mV para  $\delta^{13}\text{C}$  e 800 mV para  $\delta^{15}\text{N}$  são quantificados de forma inequívoca.

### **5.10. Compostos Orgânicos**

Para a determinação de contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos alifáticos em baixos níveis de concentração em amostras ambientais foram realizadas as etapas de extração dos analitos da matriz, a purificação dos extratos através da remoção de interferentes (*clean-up*), a pré-concentração dos extratos com fins de ajustar as concentrações dos analitos ao nível de detecção

dos equipamentos e a identificação e quantificação dos contaminantes presentes nas amostras. A metodologia utilizada para a extração dos compostos orgânicos das amostras de MPS foi baseada no método EPA 3540C. Os filtros com o MPS já anteriormente liofilizados e pesados foram colocados no Soxhlet e adicionado o padrão subrogado de recuperação (d-C16 e d-C30) e por fim realizou-se a extração por 24 horas com 250 ml de diclorometano. O volume final do extrato foi concentrado em evaporador com fluxo contínuo de nitrogênio fazendo a troca de solvente para n-hexano antes do fracionamento.

O fracionamento foi feito por cromatografia líquida em coluna de sílica/alumina. Foi empregada uma coluna de vidro (1,3 cm de diâmetro interno com 30 cm de comprimento), previamente descontaminada, adicionou-se algodão na extremidade da coluna e em seguida foi preenchida com diclorometano. Foram transferidos lentamente, 7 g de alumina desativada a 2% (p/v), 10 g de sílica-gel desativada a 5% (p/v) e 1 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), a fim de assegurar a remoção de água e evitar a ressuspensão da camada superficial. A fração dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) foi eluída com 35 ml de hexano e então concentrada a 1 mL em turbovap com o solvente hexano e transferida para vials acrescentando o padrão interno de quantificação (d-C24).

### 5.10.1. Hidrocarbonetos Alifáticos

Na fração F1 foram quantificados os n-alcenos individuais (n-C<sub>12</sub> ao n-C<sub>40</sub>), os isoprenóides (fitano e pristano), os picos resolvidos (PR) e a mistura complexa não resolvida (MCNR), como segue:

- n-alcenos: somatório de n-C<sub>12</sub> ao n-C<sub>40</sub> mais os isoprenóides pristano e fitano;
- Picos Resolvidos (PR): somatório de n-C<sub>12</sub> ao n-C<sub>40</sub>, pristano e fitano e mais todos os picos resolvidos;
- Mistura complexa não resolvida (MCNR);
- Hidrocarbonetos saturados: somatório do PR mais a MCNR.

Os hidrocarbonetos alifáticos foram identificados e quantificados, pelo método de padronização interna, utilizando-se como padrão interno o n-C<sub>24</sub>d (em concentração igual a 2500 ng/mL). A concentração da MCNR foi obtida com detector de ionização por chama (CG/DIC), segundo o método EPA-8015B, utilizando as condições resumidas na tabela 5.10.1-1.

**Tabela 5.10.1-1:** Condições cromatográficas para determinação de hidrocarbonetos alifáticos.

Equipamento	Cromatógrafo Termo Finnigan – Modelo Focus GC, com detector DIC - Estação de dados: ChromQuest 4.1
Coluna:	J&W DB 5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm)
Gases:	
Carreador:	Hélio: 2 mL·min <sup>-1</sup>
Make-up:	Nitrogênio: 25mL·min <sup>-1</sup>
Detector:	Ar: 175 mL·min <sup>-1</sup> ; Hidrogênio: 15 mL·min <sup>-1</sup>
Temperatura:	
Injetor:	250 °C
Detector:	290 °C
Coluna:	50 °C (0,75 min), taxa: 6 °C·min <sup>-1</sup> até 310 °C (20 min)

O limite de detecção e o de quantificação dos n-alcenos individuais, foi de 0,002 e 0,005 µg L<sup>-1</sup> respectivamente, considerando-se o volume médio extraído de cerca de 10 litros.

Os valores finais das concentrações de n-alcenos nas amostras são calculados após descontar as concentrações encontradas nos brancos analíticos.