



Jesica Paola Rada Arias

**Matéria orgânica natural e antrópica
em sedimentos na Ria de Aveiro,
Portugal: caracterização com base em
lipídios marcadores.**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Renato da Silva Carreira

Rio de Janeiro
Setembro de 2015



Jesica Paola Rada Arias

**Matéria orgânica natural e antrópica em
sedimentos na Ria de Aveiro, Portugal:
caracterização com base em lipídios
marcadores.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.
Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo
assinada.

Prof. Renato da Silva Carreira

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Marcelo Bernandes

UFF

Prof. Bastiaan Knoppers

UFF

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 10 de setembro de 2015

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Jesica Paola Rada Arias

Graduou-se em Química pela Universidad del Atlántico (Barranquilla-Colômbia) em 2012. Possui experiência em: análise fisioquímico de água residual minera e marinha, análise de PM10 e TSP; validação de métodos de determinação de cloretos e sulfetos em água; professora de ensino meio; e assistente nos laboratórios de química geral, analítica, orgânica e fisioquímica.

Ficha Catalográfica

Arias, Jesica Paola Rada

Matéria orgânica natural e antrópica em sedimentos na Ria de Aveiro, Portugal: caracterização com base em lipídios marcadores / Jesica Paola Rada Arias ; orientador: Renato da Silva Carreira. – 2015.

153 f.: il. (color.) ; 30 cm

1. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Química – Teses. 2. Matéria orgânica. 3. Sedimentos. 4. Ria de Aveiro. 5. Estuário do Mondego/Portugal. 6. Marcadores lipídicos. 7. Contaminação fecal. 8. GC-MS. I. Carreira, Renato da Silva. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Con el sonido de un pandero
una cumbia en el pecho
falta de tantos
y un mundo por delante.

Com o som de um pandeiro
uma cumbia no coração
saudades de tantos
e um mundo na frente.

Agradecimentos

Quero agradecer ao Grupo de investigação LABMAM e ao Ph.D. Renato Carreira, pela orientação desta pesquisa.

Ao professor Armado Duarte da Universidade de Aveiro, Portugal e seu grupo de pesquisa pela coleta e apoio.

Também agradeço pelo apoio e as valiosas sugestões aos Professores Arthur Scofield e Carlos Massone e as doutorandas Julianna Martins e Leticia Lazzari.

Aos meus professores do Departamento de Química que fortaleceram os meus conhecimentos no mundo da Química: Ricardo Aucélio, Aurora Pérez, Nicolás Rey, Camila Buarque e José Godoy.

Aos meus colegas e amigos colombianos: Jarol Miranda, Carlos Toloza, Luis Gutierrez, Maria Fernanda Cáceres e Johnny Cerón, A minhas amigas que fazem minha aventura no Brasil mais agradável: Stephanie Ortiz, Wendy Sandoval e Marlin Pedrozo. Aos meus amigos brasileiros que abriram seu coração a comunidade colombiana: Fatima Almeida, Jefferson Souza, Druval Santos de Sá, Maria Rosangela, Leonardo Melo, Veronica, Gláucia Soares, Joseany Almeida; e aos hondurenhos Oliver e Evelina.

Ao querido Antonio Pelé.

Um grande agradecimento aos meus pais Eduardo e Olga, e aos meus irmãos Mercedes e Eduardo. Aos meus sobrinhos Jesus David, Alejandro e Sara Sofia.

A todas as pessoas que usarem este documento como guia nos seus trabalhos de pesquisa.

Aos Profs. Marcelo Bernandes, Bastiaan Knoppers pelas contribuições neste trabalho e por formar a Comissão Examinadora.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa – CNPq, e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo financiamento concedido.

Resumo

Arias, Jesica Paola Rada; Carreira, Renato da Silva. **Matéria orgânica natural e antrópica em sedimentos na Ria de Aveiro, Portugal: caracterização com base em lipídios marcadores**. Rio de Janeiro, 2015. 153p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A matéria orgânica (MO) sedimentar de origem natural na Ria de Aveiro e no estuário Mondego foi caracterizada usando a composição elementar (C e N) e lipídios biomarcadores (esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides). A contribuição por esgotos foi avaliada através de coprostanol e outros esteróis fecais. Amostras de sedimento superficial foram coletadas em 22 estações ao longo das regiões. Os lipídios biomarcadores foram extraídos, purificação com sílica-gel e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. O carbono orgânico total (9,94 e 43,00 mg g⁻¹) teve uma correlação com o nitrogênio total ($r^2 = 0,86$). A razão C/N molar ($14,34 \pm 1,75$) foi um valor típico de MO continental. Existe uma contribuição maior de MO terrestre nas amostras, como mostra as evidências: a predominância de *n*-álcoois de cadeia longa ($\geq C_{22}$), maior abundância no somatório de sitosterol, estigmasterol e campesterol sobre outros fitoesteróis, como o colesterol e o brassicasterol; e a alta concentração de triterpenoides de plantas superiores, como β -amirina e α -amirina. A concentração de coprostanol (0,05 a 16,6 $\mu\text{g g}^{-1}$) indicou a presença de esgotos em sete estações localizadas no largo do Laranjo (S4, S5, S6, S7, S10), porto de Aveiro (S14) e no canal de Ílhavo (S16). Os aportes mais significativos foram no largo do Laranjo (S8 e S9) e no porto do Mondego (S19).

Palavras-chave

Matéria orgânica; sedimentos; Ria de Aveiro; estuário do Mondego/Portugal; marcadores lipídicos; contaminação fecal; GC-MS.

Abstract

Arias, Jesica Paola Rada; Carreira, Renato da Silva (Advisor). **Natural and anthropogenic organic matter in sediments in Ria de Aveiro, Portugal: characterization by lipid biomarkers**. Rio de Janeiro, 2015. 153p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The sedimentary organic matter (OM) of natural origin in the Ria de Aveiro and the estuary of Mondego River was characterized using elemental composition (C and N) and lipid biomarkers (sterols, alcohols and triterpenoids). In addition, the contribution by sewage was evaluated by coprostanol and other fecal sterols. Surface sediment samples were collected at 22 stations along the two regions. The lipid biomarkers was extracted, separated with silica-gel and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Concentrations of total organic carbon (9.94 and 43.00 mg g⁻¹) was highly correlated with total nitrogen ($r^2 = 0.86$). The C/N molar ratio: $14,34 \pm 1,75$ are typical values of OM of continental origin. There is a major contribution of terrestrially OM to the sediments, as suggested by proxies, including: predominance of long-chain ($\geq C_{22}$) alcohols, higher abundance of sitosterol, estigmasterol and campesterol over other phytosterols, like cholesterol and brassicasterol, and elevated concentrations of triterpenoids from higher plants, as β -amyirin and α -amyirin. The concentrations of coprostanol (0.05 to 16.6 $\mu\text{g g}^{-1}$) indicated the presence of sewage in seven stations located in the Largo do Laranjo (S4, S5, S6, S7, S10), Port of Aveiro (S14) and in Ílhavo Channel (S16). The more significant contribution of sewage was identified in the Largo do Laranjo (S8 and S9) and the Port of Mondego (S19).

Keywords

Organic matter; sediments; Ria de Aveiro; Mondego estuary/Portugal; lipid biomarkers; sewage contamination; GC-MS.

Sumário

1 Introdução	17
2 Objetivos	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3 Fundamentação Teórica	22
3.1. Sistemas Estuarinos	22
3.2. Matéria Orgânica	24
3.2.1. Características da matéria orgânica	24
3.2.2. Matéria orgânica sedimentar	25
3.2.3. Diagênese da matéria orgânica marinha	26
3.3. Caracterização da matéria orgânica	27
3.4. Biomarcadores Lipídicos	29
3.4.1. Esteróis	31
3.4.2. <i>n</i> -álcoois	37
3.4.3. Triterpenoides	39
3.5. Métodos de separação dos marcadores lipídicos.	40
3.5.1. Extração líquido-líquido	40
3.5.2. Cromatografia	41
3.6. Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de Massas.	43
4 Local de estudo	45
4.1. Ria de Aveiro	45
4.2. Rio Mondego	48
5 Metodologia	50

5.1. Amostragem	50
5.2. Métodos analíticos	53
6 Resultados e discussão	56
6.1. Composição elementar da MO sedimentar da Ria de Aveiro e Rio Mondego	56
6.2. Distribuição de biomarcadores lipídicos nos sedimentos	62
6.2.1. Esteróis	62
6.2.2. <i>n</i> -álcoois	66
6.2.3. Triterpenoides	69
6.3. Caracterização da MO usando lipídios biomarcadores	70
6.4. Aporte de MO de origem fecal	77
7 Conclusões	86
8 Referências Bibliográficas	88
9 Anexo I: Metodologia detalhada	99
9.1. Preparação da amostra	99
9.2. Tratamento de amostras	100
9.2.1. Extração dos lipídios das amostras	101
9.2.2. Análise de Lipídios Totais Extraíveis	103
9.2.3. Separação dos lipídios saponificáveis dos lipídios não saponificáveis por extração orgânica	103
9.2.4. Separação das classes de lipídios: cromatografia de coluna	105
9.3. Análise instrumental	108
9.3.1. Identificação e quantificação dos biomarcadores lipídicos	108
9.3.2. Curva de Calibração de esteróis, <i>n</i> -álcoois e triterpenoides e padrão interno	110
9.4. Materiais	112

9.4.1. Materiais	112
9.4.2. Solventes	114
9.4.3. Soluções e Reagentes	114
9.4.4. Padrões	114
9.4.5. Equipamentos.	115
10 Anexo II: Tabelas de Resultados	117
10.1. COT, N e TLE.	117
10.2. Recuperação de marcadores lipídicos.	119
10.3. Concentrações dos marcadores lipídicos	120
10.4. Porcentagens relativas dos marcadores lipídicos.	123
11 Anexo III: Cromatogramas e espectros de massas	127
11.1. Cromatograma das amostras	127
11.2. Espectro de Massas dos lipídios identificados	139
11.2.1. <i>n</i> -álcoois	139
11.2.2. Esteróis	144
11.2.3. Triterpenoides	150
11.2.4. Padrões subrogados e PI	152

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrando as diferenças das distintas abordagens para a caracterização da MO, a especificidade de sua fonte e na proporção que estas representam. Adaptado de Bianchi & Canuel (2011).	28
Figura 2. Estrutura básica dos esteróis.	32
Figura 3. Estruturas moleculares do <i>n</i> -álcool C ₁₈ (1-octadecanol). Adaptado de Cordeiro (2011).	37
Figura 4. Estruturas de triterpenoides comuns de plantas superiores. Adaptado de Bianchi & Canuel (2011).	39
Figura 5. Ilustração de um processo cromatográfico em batelada. Adaptado de Gao (2005). Fonte: Severo (2011).	42
Figura 6. Estações de amostragem de sedimentos e biota na Ria de Aveiro e no estuário do rio Mondego.	51
Figura 7. Gráfico de COT versus NT (mg g ⁻¹), incluindo a equação da reta e a correlação entre as variáveis r^2 . (b) perfil aproximado das concentrações de COT e NT das estações.	57
Figura 9. Gráfico de TLE das estações S1-S22.	60
Figura 10. Gráfico de COT versus TLE.	62
Figura 11. Razão entre sitosterol/(sitosterol+colesterol) para LCOH/(LCOH+SCOH).	72
Figura 12. Porcentagem relativa dos álcoois de cadeia longa na Ria de Aveiro e Rio Mondego.	73
Figura 13. Gráfico ternário relacionando os esteróis C ₂₇ , C ₂₈ e C ₂₉ nas estações.	74
Figura 14. Gráfico de estanois versus esteróis.	77
Figura 15. Mapa da Ria de Aveiro e Rio Mondego mostrado as concentrações de coprostanol nas estações S1-S22.	79
Figura 16. Resumo dos níveis de contaminação representado por cores das diferentes estações baseados nos índices (1) concentração de coprostanol, (2) porcentagem relativa de coprostanol e de (6) β -estanois, assim como as razões entre	

esteróis (3) coprostanol/colestanol, (4) 5 β /(5 β +5 α) e (5) 24-etilcoprostanol/sitosterol.	84
Figura 17. Esquema de extração de lipídios no ASE.	102
Figura 18. Montagem de separação das frações F1, F2 e F3 por cromatográfica de coluna para a fração SAP-N.	107
Figura 19. Histograma representado a recuperação dos padrões subrogados, mostrando uma distribuição Gaussiana normal.	119
Figura 20. Cromatograma de GC-MS para a amostra S1.	127
Figura 21. Cromatograma de GC-MS para a amostra S2.	128
Figura 22. Cromatograma de GC-MS para a amostra S3.	128
Figura 23. Cromatograma de GC-MS para a amostra S4.	129
Figura 24. Cromatograma de GC-MS para as amostra S5.	129
Figura 25. Cromatograma de GC-MS para a amostra S6.	130
Figura 26. Cromatograma de GC-MS para a amostra S7.	130
Figura 27. Cromatograma de GC-MS para a amostra S8.	131
Figura 28. Cromatograma de GC-MS para a amostra S9.	131
Figura 29. Cromatograma de GC-MS para a amostra S10.	132
Figura 30. Cromatograma de GC-MS para a amostra S11.	132
Figura 31. Cromatograma de GC-MS para a amostra S12.	133
Figura 32. Cromatograma de GC-MS para a amostra S13.	133
Figura 33. Cromatograma de GC-MS para a amostra S14.	134
Figura 34. Cromatograma de GC-MS para a amostra S15.	134
Figura 35. Cromatograma de GC-MS para a amostra S16.	135
Figura 36. Cromatograma de GC-MS para a amostra S17.	135
Figura 37. Cromatograma de GC-MS para a amostra S18.	136
Figura 38. Cromatograma de GC-MS para a amostra S19.	136
Figura 39. Cromatograma de GC-MS para a amostra S20.	137
Figura 40. Cromatograma de GC-MS para a amostra S21.	137
Figura 41. Cromatograma de GC-MS para a amostra S22.	138
Figura 42. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₁₆ OH, RT: 9,95.	139
Figura 43. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₁₈ OH, RT: 11,39.	139
Figura 44. Espectro de massas do fitol, RT: 11,81.	140
Figura 45. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₂₀ OH, RT: 14,15.	140
Figura 46. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₂₂ OH, RT: 17,68.	141

Figura 47. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₂₄ OH, RT: 22,17.	141
Figura 48. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₂₆ OH, RT: 27,27.	142
Figura 49. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₂₈ OH, RT: 32,65.	142
Figura 50. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₃₀ OH, RT: 38,14.	143
Figura 51. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₃₂ OH, RT: 41,83.	143
Figura 52. Espectro de massas do coprostanol, RT: 29,19.	144
Figura 53. Espectro de massas do epicoprostanol, RT: 29,64.	144
Figura 54. Espectro de massas do diidrocolesterol, RT: 30,51.	145
Figura 55. Espectro de massas da coprostanona (estanona padrão), RT: 30,67.	145
Figura 56. Espectro de massas do colesterol, RT: 31,60.	146
Figura 57. Espectro de massas do colestanol, RT: 31,89.	146
Figura 58. Espectro de massas do brassicasterol, RT: 32,69.	147
Figura 59. Espectro de massas do etilcoprostanol, RT: 34,23.	147
Figura 60. Espectro de massas do campesterol, RT: 34,39.	148
Figura 61. Espectro de massas do estigmasterol. RT: 35,09.	148
Figura 62. Espectro de massas do sitosterol, RT: 36,73.	149
Figura 63. Espectro de massas do sitostanol, RT: 36,98.	149
Figura 64. Espectro de massas do dinosterol, RT: 37,34.	150
Figura 65. Espectro de massas do lupeol, RT: 38,27.	150
Figura 66. Espectro de massas do β-taraxerol, RT: 36,21.	151
Figura 67. Espectro de massas do α-amirina, RT: 37,88.	151
Figura 68. Espectro de massas do β-amirina, RT: 36,82.	152
Figura 69. Espectro de massas do <i>n</i> -álcool C ₁₉ OH, RT: 12,77.	152
Figura 70. Espectro de massas do androstanol, RT:14,06.	153
Figura 71. Espectro de massas do colestano, RT: 23,93.	153

Lista de Tabelas

Tabela 1. Esteróis com a sua respectiva informação geoquímica.	32
Tabela 2. Esteróis majoritários em várias classes de microalgas, cianobactéria, bactéria, fungo e <i>thraustochytrids</i> (Os esteróis citados podem não ocorrer em todas as espécies).	35
Tabela 3. Estações de amostragem na Ria de Aveiro e estuário do rio do Mondego.	52
Tabela 4. Razões entre a concentração de alguns esteróis como indicadores de fonte de MO fecal: coprostanol, epicoprostanol, etilcoprostanol, colesterol e colestanol.	83
Tabela 5. Critérios que foram tidos em cada índice de aporte de esgoto.	84
Tabela 6. Tempo de retenção no GC-MS dos padrões (biomarcadores lipídicos).	108
Tabela 7. Tempo de retenção no GC-MS dos marcadores lipídicos identificados e o padrões que foram usados como referência em cada caso.	109
Tabela 8. Alíquotas tomadas da Solução Trabalho e concentração final dos padrões da curva calibração dos marcadores lipídicos.	111
Tabela 9. Os padrões certificados usados na pesquisa.	115
Tabela 10. Resultado da análise de COT e NT (valores médios).	117
Tabela 11. Lipídios extraíveis totais das amostras S1-S22 após extração com DCM-MeOH (9:1) no ASE.	117
Tabela 12. Porcentagem de recuperação do androstanol e do 1-nonadecanol.	119
Tabela 13. Concentração de esteróis não fecais em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório do total de esteróis.	120
Tabela 14. Concentração de esteróis fecais incluindo o colesterol e coprostanol em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório do total de esteróis.	120

Tabela 15. Concentração de <i>n</i> -álcoois de cadeia longa em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório destes.	121
Tabela 16. Concentração de <i>n</i> -álcoois de cadeia curta em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$), somatório destes e somatório total de <i>n</i> -álcoois.	122
Tabela 17. Concentração de triterpenoides em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório total destes.	122
Tabela 18. Porcentagem relativa de esteróis não fecais no somatório total de esteróis em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.	123
Tabela 19. Porcentagem relativa de esteróis fecais incluindo o colesterol e colestanol no somatório total de esteróis em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.	124
Tabela 20. Porcentagem relativa de <i>n</i> -álcoois de cadeia longa no somatório total de <i>n</i> -álcoois em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.	124
Tabela 21. Porcentagem relativa de <i>n</i> -álcoois de cadeia curta no somatório total de <i>n</i> -álcoois em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.	125
Tabela 22. Porcentagem relativa de triterpenoides no somatório total dos triterpenoides em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.	125

1

Introdução

As mudanças climáticas, o crescimento populacional, a contaminação por substâncias derivadas de efluentes domésticos e industriais são alguns dos fatores que causam alterações adversas nos ecossistemas costeiros (Bauer et al., 2013) e geram necessidade na pesquisa de métodos para auxiliar na caracterização destes sistemas. A geoquímica orgânica marinha tem um papel importante nesse sentido ao envolver o estudo da origem, transporte, alteração e destino final de compostos orgânicos, naturais e antropogênicos, em ambientes aquáticos, e se ter revelado uma importante ferramenta para a compreensão do ciclo do carbono nesses sistemas (Bianchi & Canuel, 2011).

A matéria orgânica (MO) é gerada principalmente por organismos autotróficos, que convertem o carbono inorgânico em orgânico através da fotossíntese, tornando-o disponível para outros níveis tróficos. A produção natural de MO é um processo altamente especializado e dependente do tipo de organismo (vegetal ou animal, marinho ou terrestre) considerado e das condições ambientais externas, tais como luz, disponibilidade de nutrientes, salinidade, entre outros (Killops & Killops, 2013). Já os compostos orgânicos de origem antropogênica englobam tanto a MO presente em esgotos domésticos como alguns contaminantes específicos, tais como hidrocarbonetos e compostos organoclorados (Bianchi & Canuel, 2011).

Os ecossistemas da interface continente-oceano desempenham um papel relevante no ciclo biogeoquímico global da MO, pois são áreas de grande diversidade biológica e respondem por percentual significativo da produção primária, além de representarem um filtro de materiais e energia provenientes destes reservatórios (Gattuso et al., 1998, Ver et al.,

1999, Hobbie, 2000, Fasham, 2003). Por outro lado, muitos desses ecossistemas estão localizados em áreas com crescente urbanização, o que os torna mais suscetíveis a alterações antrópicas (Rossi-Wongtschowski & Pastous Madureira, 2006), e que podem alterar, por exemplo, os ciclos hidrológicos e as taxas de remobilização e transporte de materiais que acontecem nesses sistemas, e dificulta a compreensão dos ciclos biogeoquímicos, sobrepondo às variabilidades naturais (GESAMP, 1993). Isto afeta todo o *continuum* rio/estuário/oceano-costeiro/oceano-aberto, o que exige que estudos realizados em escala local sejam integrados a uma visão regional dos processos envolvidos (Salomons, 2005).

Os ecossistemas costeiros são complexos e dinâmicos, o que se coloca como fatores complicadores para a compreensão do ciclo da MO em tais sistemas (Canuel et al., 2012). Neste ponto, situa-se a importância dos métodos de biomarcadores como ferramenta para identificar as fontes da MO neste tipo de sistemas. Os marcadores moleculares ou biomarcadores são moléculas cuja composição, ou a dos seus produtos de decomposição, pode ser atribuída a uma fonte específica (Bianchi & Canuel, 2011), interpretando-se de acordo com a sua origem biológica (Sohn Mary, 1986). Os biomarcadores são também definidos como compostos que caracterizam certas fontes de biota e que guardam seletivamente a informação de sua fonte, mesmo depois de estágios de decomposição e diagênese (Bianchi & Canuel, 2011).

Há diversos compostos em diferentes classes orgânicas que são usados como biomarcadores, incluindo: lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos, ligninas e outros. Este documento se concentra nos biomarcadores lipídicos (ou lipídios biomarcadores – LB), considerado como definição operacional de lipídios aos compostos que são extraídos por solventes orgânicos. Esses são moléculas estáveis e representam um componente significativo do fluxo de carbono através de vias tróficas em sistemas costeiros/estuarinos. No presente trabalho, são considerados como marcadores lipídios da MO esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides, já que esses compostos permitem traçar fontes de MO de origem autóctone

e alóctone, vegetação terrestres, plantas vasculares, assim como aportes antropogênicos de esgoto fecal.

A Ria de Aveiro, em Portugal, tem sido objeto de vários estudos sobre aspectos como a hidrologia e a qualidade da água e dos sedimentos, etc (Dias et al., 1999, Antunes & Gil, 2004, Lopes et al., 2005, Lopes & Silva, 2006, Lopes & Dias, 2007, Lopes et al., 2008, Figueiredo da Silva et al., 2009, Rodrigues et al., 2009, Valentim et al., 2013). Uma avaliação importante tem sido o estudo da contaminação por mercúrio em diferentes compartimentos ambientais. Embora menos industrializados, Mondego estuário é impactado pela agricultura. No entanto, até hoje não foi realizado um estudo detalhado, com base em marcadores moleculares, sobre a distribuição e a origem da MO nesses locais (Abreu et al., 2000, Almeida et al., 2005, Coelho et al., 2005, Ramalhosa et al., 2005, Coelho et al., 2006, Ramalhosa et al., 2006, Coelho et al., 2007). Este tipo de estudo é de grande importância, já que além de determinar as fontes de MO permite avaliar os processos naturais e antrópicos que acontecem nesses ecossistemas, por exemplo, a degradação dos compostos presentes e mostrando a eficiência da capacidade dos sistemas para suportar efluentes domésticos e industriais. Este tipo de pesquisa permite também comparar os tipos de organismos principais presentes num sistema com respeito a variação climática natural.

A realização desse trabalho teve como motivação o convênio entre Brasil e Portugal, através do projeto “*Transferência de MO na interface continente-oceano: investigação em dois sistemas aquáticos de áreas tropical e temperada com base em marcadores moleculares e isotópicos (TransIMO)*”, cujo objetivo central é investigar, através de diferentes indicadores, a natureza da MO presente em ambientes costeiros de área temperada (Ria de Aveiro) e tropical (Baía de Guanabara). Especificamente, serão considerados no presente trabalho sedimentos superficiais coletados na Ria de Aveiro e no estuário do Rio Mondego, em Portugal.

O presente trabalho contém a seguinte estrutura: uma parte introdutória que compreende os capítulos 1 a 4, na seguinte ordem, introdução, objetivos, fundamentação teórica e local de estudo; a segunda parte que corresponde ao desenvolvimento desta pesquisa. Esta se encontra distribuída nos capítulos 5 e 6 abordado as informações referentes à metodologia utilizada, resultados e discussões obtidas. Finalmente o trabalho apresenta às conclusões gerais, assim como as referências bibliográficas nos capítulos 7 e 8 , respectivamente.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo geral utilizar um conjunto de marcadores moleculares lipídicos – esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides – para caracterizar o aporte de MO natural e antrópica (fecal) em sedimentos de um ecossistema aquático na zona de transição continente-oceano em zona temperada, especificamente na Ria de Aveiro e o estuário do Rio Mondego, em Portugal.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Separar as frações dos diferentes tipos de marcadores lipídicos (esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides) e identificar os compostos presentes em cada uma das amostras.
- ✓ Quantificar os compostos identificados através de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).
- ✓ Compreender a influência dos aportes naturais e antrópicos sobre a distribuição de MO nesses ecossistemas e relacionar a ocorrência com as fontes.
- ✓ Caracterizar o aporte de matéria orgânica fecal presente na região de estudo utilizando coprostanol e outros esteróis como marcadores.

3

Fundamentação Teórica

Este capítulo detalha os principais assuntos relacionados com a presente pesquisa. Assim, desenvolvem-se os conceitos e características de sistemas estuarinos, matéria orgânica, biomarcadores lipídicos e alguns métodos para a realização deste tipo de estudo.

3.1.

Sistemas Estuarinos

O sistema contínuo aquático terra-mar é comumente definido como a interface, ou zona de transição, entre os ecossistemas terrestres e o oceano aberto. Este contínuo inclui águas interiores, estuários e águas costeiras, uma sucessão de sistemas biogeoquímica e fisicamente ativos que não só processam grandes quantidades de carbono e nutrientes durante a sua passagem natural de componentes continental para o oceano aberto, mas também troca verticalmente quantidades significativas de gases de efeito estufa com a atmosfera (Crossland, 2005, Liu et al., 2010).

Uma revisão recente define os estuários como regiões de transição que vão desde água predominantemente fluvial para água predominantemente marinha, e que geralmente exibem fortes gradientes em parâmetros biogeoquímicos (por exemplo, a salinidade, carbono orgânico e inorgânico) durante a mistura água do rio-água do mar (Bauer et al., 2013).

Estuários são áreas de grande importância para a humanidade, constituindo lugares de desenvolvimento de ocupações populacionais, indústrias, fontes para abastecimento de água e áreas de comunicação. Os estuários são áreas de reprodução, crescimento, alimentação e refúgio para inúmeras espécies de peixes, crustáceos e moluscos, capturados

pela pesca artesanal e industrial. Como consequência, eles são ambientes altamente explorados e que vêm sendo modificados, seja diretamente, devido à reivindicação de terras, ou indiretamente, com a utilização do sistema para a disposição de efluentes que serão descarregados no oceano, onde sofrem dispersão. Muitas vezes, no entanto, isso não acontece, pois muitos poluentes acabam permanecendo dentro do estuário, transformando-o em uma área de acúmulo de poluentes. Em estuários com alto índice de ocupação humana, a impermeabilização da superfície acentua gravemente o volume de água acompanhado de contaminantes e nutrientes que o atinge (French, 1997).

O sistema contínuo aquático terra-oceano é reconhecido por desempenhar um papel significativo nos ciclos biogeoquímicos globais (Gattuso et al., 1998, Mackenzie & Ver, 1998, Laruelle et al., 2013). Uma função chave dos estuários é a transferência, transformação e deposição de carbono e outros elementos biogênicos, os quais são trocados entre os sistemas terrestres e oceânicos. Estes são excelentes sistemas para o estudo da MO sedimentar, já que uma boa parte do carbono orgânico que vem a forma dissolvida nos rios precipita ao se encontrar com a água do mar, devido ao aumento de pH e presença de substâncias como grupos hidroxilos, entre outros fatores, o que ocasiona que o carbono orgânico seja acumulado nos sedimentos (Bianchi & Canuel, 2011).

A fixação fotossintética de carbono inorgânico e de nutrientes em biomassa vegetal é a melhor fonte de POC para estuários e sistemas costeiros. No entanto, essas fontes podem ser derivadas de uma vasta gama de produtores primários em ambientes aquáticos e terrestres, com um amplo espectro de composições bioquímicas, reatividade e tempos de permanência em ambientes terrestres antes da mobilização de estuários e águas costeiras (Bianchi et al., 2007).

A principal taxa de produtores primários (por exemplo, fitoplâncton, macroalgas bentônicas, microfitobentos, ervas marinhas, plantas do pantanal, e plantas lenhosas), suas abundâncias relativas e da reatividade das biomoléculas que cada um produz vontade em grande parte o controle de quantidades e formas de materiais orgânicos

persistem para compor a piscina pé POC (Wetzel, 1995, Bianchi et al., 2007).

Um estudo recente avalia os efeitos das mudanças climáticas sobre os estuários, no que diz respeito à qualidade da água e à ecologia destes sistemas (Wetz & Yoskowitz, 2013).

3.2. Matéria Orgânica

3.2.1. Características da matéria orgânica

A MO é, simplificada, produzida pelos organismos autotróficos e transformada e consumida pelos heterotróficos. Na fotossíntese, os produtores primários consomem água, dióxido de carbono e nutrientes (N, P, Si, entre outros) para, através da assimilação de luz e ação enzimática, produzir MO e oxigênio molecular. No sentido inverso desta equação, durante a remineralização, o oxigênio é consumido na respiração dos seres heterotróficos aeróbicos para oxidar a MO de volta aos componentes originais: dióxido de carbono, nutrientes e água. Assim, a MO é composta principalmente por carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. Outros elementos também encontrados são: sódio, potássio, cálcio, magnésio, silício, flúor, cloro, bromo e iodo, e os metais de transição ferro, cobre, cobalto, molibdênio, manganês, zinco, cromo e vanádio. Esses elementos, em proporções variadas, são utilizados pelos organismos vivos na formação de tecidos estruturais, na reprodução e nos processos de trocas de energia, entre outras funções fisiológicas (Bianchi et al., 1998, Cordeiro, 2011).

As principais classes de compostos orgânicos na biomassa viva são ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, pigmentos, carboidratos e compostos fenólicos correlatos, como ligninas e taninos. Após a morte dos organismos, a composição original da MO é alterada e a parte que não é totalmente consumida pelos organismos heterotróficos é transformada em

macromoléculas de alto peso molecular e estrutura complexa, conhecidas genericamente como substâncias húmicas ou MO detrítica (Libes, 1992).

A proporção relativa entre as frações vivas e detríticas na biomassa total irá variar significativamente dependendo do tipo de MO considerada. A matéria orgânica dissolvida (MOD) apresenta uma importante contribuição detrítica, entretanto mais de 80% da sua composição não pode ser caracterizada. Na matéria orgânica particulada, os carboidratos predominam no fitoplâncton e as proteínas são proporcionalmente mais representativas no zooplâncton e nas bactérias. Já nos reservatórios terrestres, há forte predomínio de carboidratos e compostos correlatos, em função da presença de celulose e ligninas (Bianchi et al., 1998).

3.2.2.

Matéria orgânica sedimentar

A fotossíntese realizada pelas plantas clorofiladas é a fonte primordial de todo o material orgânico presente nos sedimentos. A MO sedimentar consiste principalmente de macromoléculas insolúveis em água, derivadas diretamente de organismos ou geradas por polimerização ou condensação de moléculas orgânicas menores (Killops & Killops, 2013).

Sedimentos costeiros apresentam características de vegetação terrestre e biota marinha, que são estreitamente correlacionadas com parâmetros climáticos e processos oceanográficos, bem como influências antropogênicas. Em sedimentos costeiros ou sedimentos próximos a sistemas fluviais são assumidos que os mecanismos fluviais são os dominantes da origem de material proveniente de origem alóctone (Leeuw et al., 1995).

O material orgânico sedimentar presente em ecossistemas marinhos pode ser originado a partir de produção autóctone ou alóctone, sendo que neste último caso ela pode ser de origem natural ou antrópica. As fontes naturais de MO são difusas e numerosas, particularmente nas regiões costeiras, quando comparadas com as existentes nas regiões oceânicas.

Algumas das principais fontes de origem da MO para o ambiente marinho são: a produção primária, a biota heterotrófica (excretas, matéria viva e morta), a deposição atmosférica, a drenagem fluvial e urbana, os efluentes domésticos e industriais, a navegação marítima e a produção e a exploração de petróleo (Thoumelin et al., 1997, Hobbie, 2000).

A MO sedimentar, apesar de constituir uma fração pequena dos sedimentos marinhos, fornece importantes informações sobre os processos bióticos e abióticos predominantes no meio. Sua concentração nos sedimentos marinhos é bastante variável, geralmente decrescente da plataforma continental para a bacia oceânica (Calvert, 1987).

3.2.3.

Diagênese da matéria orgânica marinha

O termo diagênese em geoquímica orgânica refere-se às modificações que afetam os produtos da produção primária durante os primeiros estágios de deposição, excluindo alteração superficial e metamorfismo (que ocorre em condições de temperatura e pressão mais elevadas) (Neto & Madureira, 2000).

Os compostos de carbono provenientes de microrganismos não são muito estáveis. Quando expostos ao oxigênio, mesmo os mais resistentes, se decompõem em um período curto em termos geológicos, retornando a atmosfera como dióxido de carbono. Quando mantidos em ambientes pobres em oxigênio, como em águas estagnadas ou aterramentos, os compostos orgânicos não se decompõem completamente e acabam originando compostos de cadeias mais simples e mais estáveis que os progenitores (Harvey, 2006).

A quantidade e a qualidade da MO nos sedimentos marinhos dependem dos processos de preservação e de degradação atuantes sobre ela e dos componentes do ambiente de deposição. Tanto a MO autóctone como a alóctone está, em ambientes aquáticos, sujeitas a intensas reações diagenéticas que determinam o grau de preservação do carbono orgânico no ambiente sedimentar (Wakeham & Canuel, 2006).

Essa MO que se sedimenta nos ecossistemas ao longo dos anos, mesmo com a perda na diagênese e de alguns de seus componentes mais lábeis, apresentam vários parâmetros seguros para determinação de sua fonte. Essa fonte, assim como a qualidade da MO no sedimento vem sendo estudada através de diversos marcadores orgânicos geoquímicos (Killops & Killops, 2013).

A diagênese nos sedimentos pode ser medida comparando-se as taxas de degradação de várias classes de compostos. A resistência à degradação de grupos de lipídios em sedimentos anóxicos pode ser mostrada na seguinte ordem decrescente: alcanos, 2- alcanona, esteróis, ácido graxos, *n*-álcoois, ácidos carboxílicos monoinsaturados (Neto & Madureira, 2000).

3.3. Caracterização da matéria orgânica

A literatura tem relatado métodos diferentes para realizar estudos da MO. A escolha do método depende da informação a obter, esta pode ser desde a análise do carbono orgânico total até a determinação da origem do material orgânico, ou seja, para conhecer a fonte da MO em um sistema de água. Um desses métodos é a utilização de biomarcadores, definidos como compostos, que podem ser interpretados em termos da sua origem biológica (Sohn Mary, 1986) e, recentemente, também como compostos que caracterizam certas fontes de biota e retém seletivamente a sua informação de fonte, mesmo depois estágios de decomposição e diagênese (Bianchi & Canuel, 2011).

As maiorias dos estudos relatados demonstram uma combinação de métodos que geram uma informação mais completa e precisa do estudo. Assim, quando as concentrações de *bulk* de carbono orgânico particulado COP, são combinadas adicionalmente com a informação de composição elementar, pode-se inferir informação básica, por exemplo, de fontes de origem de alga e terrestres (Meyers, 1997).

A razão C/N (carbono/nitrogênio) é determinada a partir de análise elementar e é uma ferramenta bastante utilizada para determinação da origem da MO para o meio e de seus processos diagenéticos. 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 (Cordeiro, 2006).

Bianchi e Canuel (2011) têm organizado uma figura comparando a proporção da quantidade de informação que pode ser obtido entre os diferentes métodos para a caracterização de MO (Figura 1). Esta figura mostra que os biomarcadores são divididos em grupos de mais do que outros de maior especificidade na análise de OM.

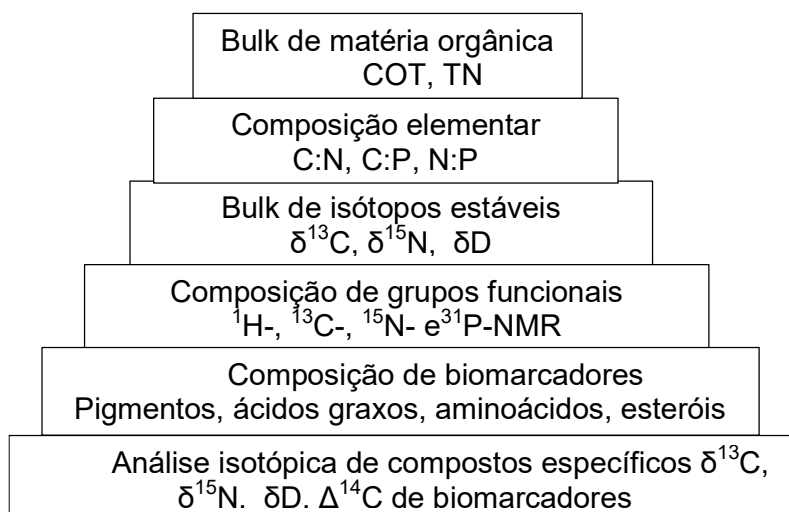


Figura 1. Esquema ilustrando as diferenças das distintas abordagens para a caracterização da MO, a especificidade de sua fonte e na proporção que estas representam. Adaptado de Bianchi & Canuel (2011).

3.4. Biomarcadores Lipídicos

Na geoquímica orgânica, lipídios englobam todos os compostos que são extraídos por solvente orgânicos (portanto, uma definição mais ampla do que a usada pela Química), e assim envolvem uma enorme gama de compostos orgânicos. Os lipídios biomarcadores são extensivamente utilizados como traçadores da MO devido à sua abundância, boa especificidade em relação à fonte e resistência à degradação bacteriana em comparação com outras moléculas mais específicas (Bianchi & Canuel, 2011).

Uma das aplicações básicas dos biomarcadores e MO associada são a detecção de fontes, determinação de concentração absoluta e quantificação de “paleoprodução” da MO associada (Hedges & Prahl, 1993). Em geoquímica, existem muitos estudos que utilizam biomarcadores para estabelecer fontes, transporte e disposição de MO em estuários e oceanos no Brasil (Edmond et al., 1981, Jennerjahn & Ittekkot, 1999, Costa et al., 2011, Koch et al., 2011).

Os marcadores moleculares são usados em estudos geoquímicos, devido à sua capacidade para resistir a variações e decomposição, como acontece com outros constituintes do material orgânico sedimentar. Esses marcadores fornecem informações importantes como a sua distribuição nos sedimentos sobre os processos biogeoquímicos no passado geológico e a resposta desses processos nas mudanças ambientais (Eglinton et al., 1993, Saliot & Méjanelle, 1994, Meyers, 1997).

Outra importante aplicação de marcadores moleculares é o uso destes como um marcador de poluição orgânica doméstica em sistemas aquáticos. Vários compostos naturais e sintéticos têm sido propostos para este propósito. Um dos marcadores lipídico mais utilizado para este fim é o coprostanol (Venkatesan & Kaplan, 1990, LeBlanc et al., 1992, Jeng & Han, 1996, Jeng et al., 1996, Mudge & Bebianno, 1997).

Os marcadores mais usados são os isótopos estáveis e radiocarbono, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos

fotossintéticos; lipídios: ácidos graxos, hidrocarbonetos, alcanonas, esteróis, hopanoides, triterpenóides, etc. Os lipídios são definidos como toda substância produzida por organismos que são insolúveis em água, mas pode ser extraído por solventes (por exemplo, clorofórmio, *n*-hexanos, tolueno, e acetona). Esta definição ampla inclui uma vasta gama de compostos, tais como pigmentos, ceras, gorduras, esteróis, e fosfolipídios. Alternativamente, lipídios podem ser definidos de forma mais delimitada como graxas, ceras, esteróis, e fosfolipídios. Esta segunda definição refere-se especificamente à sua função bioquímica em termos de armazenamento de energia, em vez de a sua hidrofobicidade (Bianchi & Canuel, 2011).

Os lipídios foram extensivamente utilizados como marcadores moleculares na caracterização da MO sedimentar, porque as moléculas de lipídios são estáveis e representam um componente significativo do fluxo de carbono através de vias tróficas em sistemas costeira/estuarinos (Sargent et al., 1977, Reuss & Poulsen, 2002).

Os compostos de biomarcadores lipídicos, tais como ácidos graxos e esteróis também têm sido amplamente utilizados em estudos destinados a elucidar fontes de MO em sistemas aquáticos. Um benefício dos LB é que estes compostos têm a capacidade de rastrear a MO proveniente de fitoplâncton, zooplâncton, bactérias, e plantas vasculares simultaneamente (Bianchi & Canuel, 2011). Estes são geralmente extraídos usando solventes orgânicos e isolados por cromatografia de fase sólida, variando-se a polaridade da fase-móvel. Esteróis apresentam grupo hidroxila, que interagem fortemente com a fase sólida. Por conseguinte, antes da análise destes por cromatografia em fase gasosa, é necessária a derivação desse grupo. Os dois métodos mais comuns para derivação são a conversão do grupo hidroxila em acetato, usando anidrido acético, e a conversão em éteres de trimetilsililo, utilizando bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Galli & Maroni, 1967, Brooks et al., 1968, Benfenati et al., 1994, Bianchi & Canuel, 2011). A identificação dos marcadores lipídicos é normalmente feita usando GC-MS, onde os tempos de retenção e os fragmentos específicos para cada tipo de

molécula podem ser utilizados para identificar os compostos. Os ácidos graxos, normalmente são identificados usando GC-FID (Galli & Maroni, 1967, Bianchi & Canuel, 2011).

Os lipídios são biomarcadores moleculares úteis para várias razões: (1) estes compostos ocorrem em distribuições únicas em diferentes fontes de MO; (2) as características estruturais fornecer informações sobre a sua origem; (3) os marcadores lipídicos fornecem uma ferramenta de diagnóstico para diferenciar entre fontes de MO autóctones (algas) e alóctones em ecossistemas costeiros (plantas vasculares); e (4) também, LB podem dar informações sobre as fontes não biogênicas de MO, tais como intemperismo de sedimentos antigos ou entradas provenientes de combustíveis fósseis. Comumente, os marcadores lipídios são analisados em conjunto com *bulk* MO e composição elementar (Bianchi & Canuel, 2011).

Os esteróis são uma série muito popular de marcadores bioquímicos com aplicações em estudos de origem e transformação da MO (Saliot et al., 1991), porque são onipresentes e um distintivo componente de organismos. Estes compostos são: (1) relativamente estáveis em sedimentos no ambiente, e (2) estes tem uma distribuição característica em diferentes organismos, neste sentido, as análises de esteróis podem proporcionar um meio para determinar a origem dos materiais orgânicos em sedimentos recentes. Além disso, as assinaturas de esteróis podem mostrar *inputs* de MO vegetal e animal (Wen-Yen & Meinschein, 1976, Nishimura & Koyama, 1977).

3.4.1. Esteróis

Os esteróis e os seus respectivos derivados provaram ser importantes biomarcadores que podem ser utilizados para estimar contribuições de algas e plantas vasculares, bem como *proxies* diagenéticas (Saliot & Tusseau, 1984, Volkman, 1986, Canuel &

Zimmerman, 1999). Estes compostos são *n*-álcoois classificados como triterpenos tetracíclicos (cinco unidades de isopreno) Figura 2.

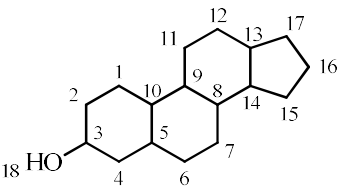


Figura 2. Estrutura básica dos esteróis.

Os esteróis de ambientes aquáticos encontram-se entre a faixa de átomos de carbono C₂₇ a C₂₉, mas também podem ser encontrados em um intervalo entre C₂₆ e C₃₁, dando informações sobre as fontes de MO natural e antropogênica (Peters et al., 2005). Algumas delas são mostradas na Tabela 1, com a sua respectiva informação geoquímica. Os esteróis como outros biomarcadores sofrem processos de degradação gerando subprodutos (Rontani et al., 2014).

As nomenclaturas XΔ^y ou C_xΔ^y são comumente utilizadas, como: x é o número total de átomos de carbono e y indica as posições das ligações duplas. Em geral, os esteróis C₂₈ têm um grupo metilo em C-24, e os esteróis C₂₉ têm um substituinte 24-acetato.

Tabela 1. Esteróis com a sua respectiva informação geoquímica.

Esteróis		xΔ ^y	Informação Geoquímica	Referência
Nome comum, Outro nome.	Estrutura			
24-nor-diidrocolesterol, 24-nor-colesta-5,22-dien-3β-ol.		26Δ ^{5,22}	Dinoflagelados e diatomáceas.	Leblond (2002), Volkman (2003).
Colestanol, 5α-colestan-3β-ol.		27Δ ⁰	Dinoflagelados, diatomáceas (menor contribuição) e redução bacteriana de colesterol.	Carreira (2000), Volkman (1998).

Esteróis			Informação Geoquímica	Referência
Nome comum, Outro nome.	Estrutura	$x\Delta^y$		
Coprostanol, 5 β -colestan-3 β -ol.		27 Δ^0	Contaminação fecal, contaminação (esgoto).	McCaffrey (1991), Takada (1998), Pocklington (1987).
Epicoprostanol, 5 β -colestan-3 α -ol.		27 Δ^0	Esgoto tratado.	Saliot (1994).
Colesterol, Colest-5-en-3 β -ol		27 Δ^5	Zooplâncton, fauna bentônica, fitoplâncton. Também é achado em animais e plantas.	Volkman (1986).
Diidrocolestanol, 5 α -colestan-22-en-3 β -ol.		27 Δ^{22}	Produto de degradação.	Volkman (2003).
Diidrocolesterol, Colest-5,22-dien-3 β -ol.		27 $\Delta^{5,22}$	Zooplâncton, fauna bentônica, diatomáceas, algas vermelhas e dinoflagelados.	Barrett (1995), Volkman (1986).
27-nor-diatomsterol, 27-nor-24-metilcolest-5,22E-dien-3 β -ol.		27nor- $\Delta^{5,22}$	Diatomáceas, dinoflagelados e <i>haptophytes</i> .	Bayona (1989), Volkman (1986).
C₂₈. O esterol predominante no fitoplâncton.				Volkman (1986).
Campestanol, 24-metil-5 α -colestan-3 β -ol.		28 Δ^0	Campesterol e produto de degradação.	Barrett (1995), Volkman (1998), Volkman (1986), Volkman (1989).
Campesterol, 24-metilcolest-5-en-3 β -ol.		28 Δ^5	Plantas superiores, diatomáceas e algas verdes.	Jaffé (1995).
Diatomastanol, 24-metil-5 α -colest-22-en-3 β -ol.		28 Δ^{22}	Produto de degradação.	Volkman (2003).
Brassicasterol, Diatomasterol, 24-metilcolest-5,22-dien-3 β -ol		28 $\Delta^{5,22}$	Diatomáceas, dinoflagelados e microalgas (<i>haptophytes</i> e <i>cryptophytes</i>).	Nichols (1984), Scheffé (2004), Volkman (1986), Volkman (1998), Volkman (1981).
Metilencolesterol, 24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol.		28 $\Delta^{5,24(28)}$	Marcadores de fitoplâncton: diatomáceas, dinoflagelados, e <i>Prasinophyte</i> .	Siere (1993), Volkman (1989), Volkman (1986).
C₂₉. Achado em plantas vasculares e certas cianobactérias epibentônicas. Também em espécies fitoplancônicas em quantidades significantes.				Volkman (1981), Jaffé (1995).
Sitostanol, 24-etil-5 α -colestan-3 β -ol		29 Δ^0	Sitosterol e também produto de degradação.	Volkman (1986).

Esteróis			Informação Geoquímica	Referência
Nome comum, Outro nome.	Estrutura	Δ^y		
sitosterol , 24-etilcolest-5-en-3 β -ol		29 Δ^5	Plantas superiores e algumas classes de fitoplâncton.	Gaskell (1976), Volkman (1986).
Estigmastanol , 24-etil-5 α -colest-22-en-3 β -ol		29 Δ^{22}	Produto de degradação.	Volkman (2003).
Estigmasterol , 24-etilcolest-5,22(E)-dien-3 β -ol		29 $\Delta^{5,22}$	Plantas superiores e fitoplâncton.	Gaskell (1976), Volkman (1986).
C₃₀				
Dinosterol , 4 α -23,24-trimetil-5 α -colest-22(E)-en-3 β -ol		29 Δ^{22}	Marcadores de fitoplâncton: dinoflagelados, algumas classes de diatomáceas (menor contribuição).	Volkman (2003).

Adaptado de Yoshinaga (2008).

Coprostanol é amplamente usado como um indicador de contaminação de águas residuais. Este é um dos principais esteróis de origem fecal (Pocklington & Leonard, 1987), sendo produzido por redução bacteriana do colesterol no intestino de animais de sangue quente. Uma das grandes vantagens de coprostanol é a sua capacidade de reconstituir a história da contaminação fecal. Existem outros esteróis que permitem definir alguns índices para determinar a contaminação e a distribuição da fonte de material fecal. Pode ser encontrados nas fezes (por exemplo, colesterol, colestanol, epicoprostanol, sitosterol, etc). Geralmente, considera-se que o colesterol é derivado de tecidos de crustáceos (por exemplo, zooplâncton e caranguejos) (Bergmann, 1949), assim como suas pelotas fecais.

As gramíneas marinhas também têm caracteristicamente elevadas concentrações de 29 Δ^5 (Nishimura & Koyama, 1977, Volkman et al., 1981, Nichols & Johns, 1985).

Além da utilização de esteróis para rastrear entradas de MO aquática proveniente de microalgas, esta classe de compostos

biomarcadores têm sido identificados nas bactérias metanotróficas, leveduras e fungos (Volkman, 2003), Tabela 2.

Tabela 2. Esteróis majoritários em várias classes de microalgas, cianobactéria, bactéria, fungo e *thraustochytrids* (Os esteróis citados podem não ocorrer em todas as espécies).

Microorganismo	Majoritário ou esteróis comuns.
Microalga	
<i>Bacillariophyceae</i>	$28\Delta^{5,22}$, $28\Delta^{5,24(28)}$, $27\Delta^5$, $29\Delta^5$, $27\Delta^{5,22}$
<i>Bangiophyceae</i>	$27\Delta^5$, $27\Delta^{5,22}$, $28\Delta^{7,22}$
<i>Chlorophyceae</i>	$28\Delta^5$, $28\Delta^{5,7,22}$, $28\Delta^{7,22}$, $28\Delta^{5,22}$, $28\Delta^5$
<i>Chrysophyceae</i>	$29\Delta^{5,22}$, $29\Delta^5$, $28\Delta^{5,22}$
<i>Cryptophyceae</i>	$28\Delta^{5,22}$
<i>Dinophyceae</i>	$4\text{Me-}\Delta^0$, dinosterol, $27\Delta^5$, $28\Delta^{5,24(28)}$
<i>Euglenophyceae</i>	$28\Delta^{5,7,22}$, $29\Delta^5$, $28\Delta^7$, $29\Delta^{5,7}$, $28\Delta^{7,22}$
<i>Eustigmatophyceae</i>	$27\Delta^5$ (marinho) or $29\Delta^5$ (água doce)
<i>Haptophyceae</i>	$28\Delta^{5,22}$, $27\Delta^5$, $29\Delta^{5,22}$, $29\Delta^5$
<i>Pelagophyceae</i>	$30\Delta^{5,24(28)}$, $29\Delta^{5,22}$, $29\Delta^5$, $28\Delta^{5,24(28)}$
<i>Prasinophyceae</i>	$28\Delta^5$, $28\Delta^{5,24(28)}$, $28\Delta^5$
<i>Raphidophyceae</i>	$29\Delta^5$, $28\Delta^{5,24(28)}$
<i>Rhodophyceae</i>	$27\Delta^5$, $27\Delta^{5,22}$
<i>Xanthophyceae</i>	$29\Delta^5$, $27\Delta^5$
Cianobacteria	$27\Delta^5$, $29\Delta^5$, $27\Delta^0$, $29\Delta^0$
Bactérias metilotróficas	$4\text{Me-}\Delta^8$
Outras bactérias	$27\Delta^5$
Leveduras e fungos	$28\Delta^{5,22}$, $28\Delta^7$, $28\Delta^{7,24(28)}$
<i>Thraustochytrids</i>	$27\Delta^5$, $29\Delta^{5,22}$, $28\Delta^{5,22}$, $29\Delta^{5,7,22}$

Adaptado de Volkman (2003).

Embora haja esteróis específicos para determinadas espécies de organismos a maioria deles são biossintetizados por mais de uma espécie. Portanto, caracterizações da origem de MO autóctone e alóctone apenas com base no estudo de esteróis individuais, devem ser feita com

cautela e devem ser complementadas geralmente com informações de outras classes de lipídios (como ácidos graxos, n-álcoois, lignina, etc).

As razões entre as concentrações de biomarcadores (como alguns esteróis) ajudam na interpretação de vários processos em um sistema aquático: (i) análise de *inputs* de MO terrestre e marinha, (ii) fornece informações sobre a contribuição de fito e zooplâncton proveniente da MO sedimentar; para distinguir entre fontes de MO naturais ou residuais, (iii) indica alteração da MO autóctone, a proliferação microbológica e a contaminação fecal, respectivamente, (IV) as contribuições relativas de dinoflagelados e zooplâncton à MO sedimentar em relação à contribuição de diatomáceas (Nishimura & Koyama, 1977, Gagosian & Nigrelli, 1979, Quemeneur & Marty, 1992, Mudge & Lintern, 1998, Fernandes et al., 1999 b, Zimmerman & Canuel., 2002, Tolosa et al., 2003).

É necessário que os compostos selecionados para as razões tenham reatividade semelhante para evitar de esta forma a interferência do efeito da diagénese na interpretação dos resultados. Assim, as razões entre dinosterol/metilenecolesterol e colesterol/metilenecolesterol indicam as contribuições relativas de dinoflagelados e zooplâncton da MO sedimentar em relação à contribuição de diatomáceas (Zimmerman & Canuel., 2002). As razões entre de 24-etilcoprostanol para sitosterol e colesterol para coprostanol podem ser usadas para distinguir entre fontes de MO natural ou residual (Quemeneur & Marty, 1992). Outros exemplos são as relações estanol/stenol e coprostanol/(coprostanol + colestanol), as quais indica alteração da MO autóctone, e a proliferação microbológica e contaminação fecal, respectivamente (Fernandes et al., 1999 b). Mais razões entre esteróis são também referidas na literatura (Nishimura & Koyama, 1977, Gagosian & Nigrelli, 1979, Mudge & Lintern, 1998, Tolosa et al., 2003).

A identificação de esteróis é normalmente verificada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, onde os fragmentos específicos podem ser utilizados para identificar cada composto (Galli & Maroni, 1967, Benfenati et al., 1994).

Os esteróis são geralmente extraídos usando solventes orgânicos e isolados por cromatografia de fase sólida, variando-se a polaridade da fase-móvel. Estes apresentam grupos hidroxilos, que interagem fortemente com a fase sólida da coluna cromatográfica do equipamento. Por conseguinte, antes da análise de esteróis por cromatografia em fase gasosa, é necessária a derivação dos grupos hidroxilos. Os dois métodos mais comuns para derivação são a conversão destes em acetatos, usando anidrido acético, e a conversão dos hidroxilos em éteres de trimetilsililo, utilizando bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Brooks et al., 1968).

3.4.2. *n*-álcoois

Os *n*-álcoois são caracterizados por estruturas saturadas e monoinsaturadas Figura 3. Estes apresentam cadeia carbônica variando entre C₁₄ a C₃₄ e possuem praticamente as mesmas funções dos ácidos graxos nos organismos—produção e acúmulo energético para o funcionamento metabólico. No entanto, os *n*-álcoois são encontrados em menores concentrações, quando comparados aos ácidos graxos. Em sedimentos aquáticos, os *n*-álcoois presentes foram sintetizados por vários organismos, principalmente do plâncton e de vegetais terrestres (Mudge & Norris, 1997, Baêta, 2008).

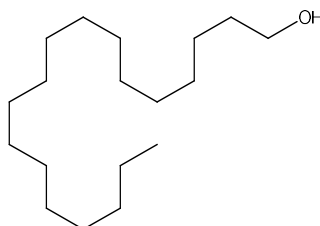


Figura 3. Estruturas moleculares do *n*-álcool C₁₈ (1-octadecanol). Adaptado de Cordeiro (2011).

De acordo com o tamanho da cadeia linear dos *n*-álcoois pode-se obter um indicativo sobre sua origem para os sedimentos (Mudge &

Norris, 1997, Volkman, 2006). Desta forma, os *n*-álcoois saturados de cadeia carbônica curta par ($< C_{20}$) são característicos de organismos planctônicos marinhos e dulcícolas. Os *n*-álcoois com cadeia curta, com predomínio do C_{16} , C_{20} e C_{22} são característicos de fitoplâncton e zooplâncton (Ogura et al., 1990, Volkman, 2006). Já os *n*-álcoois saturados de cadeia carbônica longa par ($\geq C_{22}$) são derivados principalmente de ceras epicuticulares de plantas terrestres. Assim, os *n*-álcoois C_{22} - C_{23} são característicos de ceras de plantas superiores, sendo que os compostos de cadeia carbônica ímpar (C_{27} , C_{29} e C_{31}) são os predominantes (Fernandes et al., 1999 b, Jeng & Huh, 2004, Volkman, 2006, Xu & Jaffé, 2007, Baêta, 2008).

O fitol é um diterpenóide acíclico oxigenado formado pela condensação de 2-metilbutil (Volkman, 1986). Este é o isoprenóide mais abundante em ambiente marinho, pois está presente como uma cadeia lateral na molécula da clorofila-*a*, além de ser encontrado em menores concentrações nas colorofilas *b*, *d* e bacterioclorofila; e é produzido por diversas classes de organismos autotróficos (Sun et al., 1998, Rontani & Volkman, 2003). No entanto, este é uma molécula relativamente lábil e deve ser considerado como indicador não-específico ao ser produzido por organismos autotróficos, tanto aquáticos quanto terrestres (Wakeham et al., 2002, Rontani & Volkman, 2003, Marchand et al., 2005).

Os *n*-álcoois graxos livres são encontrados no ambiente em quantidades traço, o que sugere que esses compostos estão ligados a estruturas lipídicas polares resistentes a hidrólise alcalina (Volkman, 2006).

A razão entre *n*-álcoois graxos de cadeia curta e os de cadeia longa pode indicar as fontes dessas espécies (marinha ou de água doce) (Fukushima & Ishiwatari, 1984).

A concentração dos *n*-álcoois marcadores também permite avaliar a influência de MO terrestre em sedimentos marinhos usando a razão entre as concentrações dos *n*-álcoois de origem terrestre e os *n*-álcoois de origem marinho (Mudge & Bebianno, 1997).

Na identificação dos diferentes biomarcadores, estes são separados dos outros compostos contidos nas amostras usando diferentes métodos como cromatografia de coluna, extração líquido-líquido e cromatografia gasosa. No seguinte item, descrevem-se estes métodos de separação.

3.4.3. Triterpenoides

Os triterpenoides de seis anéis são de origem de plantas superiores, onde esses funcionam como resinas (Figura 4). Como hopanoides, esses compostos podem ser encontrados no ambiente como álcoois, alquenos ou alcanos. Os triterpenoides são muitas vezes identificados usando a fração m/z 191 com CG-MS (Bianchi & Canuel, 2011).

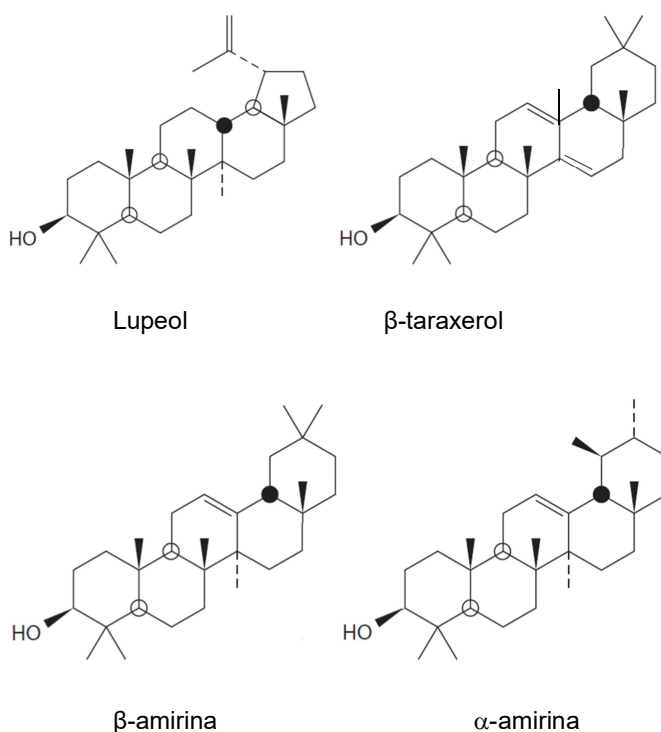


Figura 4. Estruturas de triterpenoides comuns de plantas superiores. Adaptado de Bianchi & Canuel (2011).

Os triterpenoides tem sido usados para identificar fontes de MO de origem terrestre em mangues (Koch et al., 2003) e sistemas tropicais rio-estuarío (Volkman et al., 2007).

Além desses marcadores moleculares serem usados como traçadores da matéria orgânica de origem terrestre, seus produtos diagenéticos podem ser usados para traçar MO no passado histórico e geológico. Similar aos esteróis, esses compostos sofrem defuncionalização durante a diagêneses recente e redução e aromatização durante os estágios depois da diagêneses recente ou catagenêsis (Bianchi & Canuel, 2011).

3.5.

Métodos de separação dos marcadores lipídicos.

3.5.1.

Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido consiste em uma etapa de separação na qual ocorre a transferência de um soluto presente em uma solução, chamada de alimentação, para outra fase líquida, a extratora, composta por um solvente imiscível (em alguns casos, parcialmente miscível) com o solvente da solução original. Se o soluto encontra-se originalmente em um meio aquoso, o solvente extrator é um composto orgânico, que deve possuir afinidade seletiva por este soluto. Esta seletividade é a essência da extração líquido-líquido, uma vez que o soluto de interesse é removido de uma solução contendo uma mistura de dois ou mais componentes (Blackadder & Nedderman, 2004).

Este processo de separação encontra aplicação especialmente em casos no qual a destilação não é adequada. Isto ocorre quando o soluto é termosensível, ou a volatilidade relativa de dois dos componentes da mistura é próxima à unidade. A baixa concentração do soluto na mistura e a formação de azeótropos também justificam a substituição da destilação pela extração líquido-líquido (Robbins & Cusack, 1999).

No processo de extração, a separação depende do equilíbrio termodinâmico de partição do componente de interesse entre as duas fases líquidas. Esta partição é quantificada pelo coeficiente de distribuição, K_D , definido pela razão entre as atividades desse componente nas fases orgânica e aquosa, no equilíbrio. O K_D é a razão entre as concentrações dos componentes de interesse nas fases orgânica e aquosa (Robbins & Cusack, 1999). *Tomado de Moraes, (2011).*

No caso da separação dos lipídios biomarcadores a extração líquido-líquido entre uma fase orgânica e uma fase aquosa ajuda na separação das moléculas que são saponificáveis (como os ácidos graxos) dos esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides, os quais são compostos não saponificáveis. Uma segunda extração após acidificação ajuda na separação dos compostos saponificáveis dos outras moléculas que pudessem estar presentes nas amostras.

3.5.2. Cromatografia

De forma geral, a cromatografia analítica visa à separação de misturas complexas, para identificar e quantificar os componentes presentes na mistura, enquanto a cromatografia preparativa visa a isolar uma determinada quantidade do componente purificado, para usá-lo em uma determinada aplicação (Guiochon, 2002).

A Figura 5 ilustra o princípio básico de um processo cromatográfico em batelada. Neste caso, uma mistura é inicialmente injetada na coluna, sendo arrastada pela fase móvel que percola o sistema. As moléculas presentes na mistura interagem com o meio sólido (a fase estacionária) de diferentes formas. Quase todos os processos relacionados à cromatografia líquida são baseados no equilíbrio de adsorção, com exceção da cromatografia de permeação em gel (Gao & Engell, 2005).

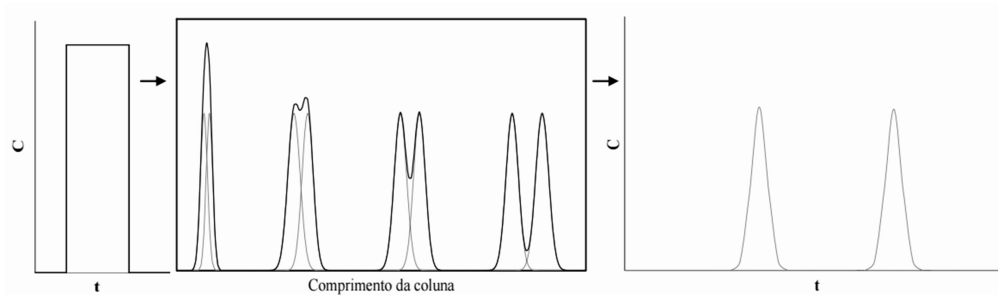


Figura 5. Ilustração de um processo cromatográfico em batelada. Adaptado de Gao (2005). Fonte: Severo (2011).

Como é mostrado na figura anterior, a diferença nos tempos de retenção dos diferentes compostos permite a separação destes. O tempo de retenção depende da afinidade do analito com a fase estacionária da coluna cromatográfica e com a fase móvel. Assim, se a fase estacionária é um material polar, como a sílica-gel, os compostos polares vão ficar mais tempo retidos na fase estacionária, enquanto que, os compostos menos polares vão sair em um tempo menor da coluna, conseguindo desta forma a separação destes. Uma metodologia comumente usada nas separações em coluna é a variação da polaridade do solvente, começando com solventes apolares (no caso das fases estacionárias polares) e aumentando a polaridade do solvente gradualmente. Desta forma obtém-se a separação de compostos com diferentes polaridades. Este tipo de metodologia permite a separação das frações dos diferentes tipos de marcadores lipídicos.

Cabe lembrar que, este tipo de cromatografia é apenas preparatório e não permite a identificação e quantificação dos compostos. Para este processo existem as técnicas de cromatografia instrumentais, nos quais a cromatografia apresenta uma definição mais complexa, como será mostrado embaixo:

A cromatografia é um método de separação física, em que os componentes a serem separados são distribuídos seletivamente entre duas fases imiscíveis: uma fase móvel flui através de um leito de fase estacionária. A técnica é nomeada dependendo da fase móvel:

cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), ou cromatografia supercrítica (SFC). O processo cromatográfico ocorre como resultado de passos de sorção/dessorção repetidos durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação é devido às diferenças nos coeficientes de distribuição dos analitos individuais na amostra. Aspectos teóricos e práticos da LC foram abordados em detalhes em outros lugares (Dolan & Snyder, 1989, Giddings, 1991, Poole & Poole, 1991, Venn, 2008, Meyer, 2010). A técnica usada para a identificação é quantificação dos marcadores lipídicos foi a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

3.6.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de Massas.

Espectrometria de massa (MS) baseia-se na produção de íons, que são, subsequentemente, separados e detectados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). O espectro de massa resultante é um gráfico de abundância (relativa) dos íons gerados como uma função do m/z . Excelente seletividade pode ser obtida, que é de extrema importância na análise de traços quantitativos (Chapman, 1993, De Hoffmann et al., 2007).

O uso do espectrômetro de massa consiste em basicamente cinco partes: introdução da amostra no equipamento, uma fonte de íon a qual é produzido um feixe de partículas provenientes da amostra (ionização), análise que separa partículas de acordo com a massa, detecção no qual os íons separados são recolhidos e caracterizados, e manipulação de dados (Wilfried, 2006).

A amostra pode ser inserida diretamente na fonte de ionização (amostras puras) ou através de cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas que pode ser Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), Cromatografia Gasosa (GC), ou eletroforese que entram sequencialmente no espectrômetro de massas, permitido assim a análise individual de cada um dos seus compostos (Baêta, 2008).

Em princípio, a cromatografia é apenas uma das possíveis técnicas para separar o analito, e o espectrómetro de massa apenas mais um detector para a cromatografia. No entanto, o sistema cromatografia-massas (GC-MS, GC-MS, etc) oferece um valor adicional, especialmente em termos de seletividade um detector (Wilfried, 2006).

Na cromatografia gasosa as separações cromatográficas podem ser avaliadas pelos picos cromatográficos do sistema. A isoterma que gera os picos cromatográficos descreve a relação entre a concentração de soluto na fase estacionária para a concentração do soluto no gás de transporte. Se as isotérmicas são lineares, os picos são gaussianos, se as isotérmicas são não-lineares, os picos tornam-se assimétrico. A área dos picos vai depender da concentração do analito o qual permite quantificação das espécies (Grob & Barry, 2004).

4

Local de estudo

O estudo foi realizado na Ria de Aveiro, uma lagoa costeira no norte de Portugal e no estuário do Rio Mondego (60 km ao sul da Ria de Aveiro). Esta é uma área muito importante da costa portuguesa, que tem estado sob uma crescente pressão antrópica durante várias décadas e, contribui para a degradação da qualidade das águas (Lopes et al., 2005).

4.1.

Ria de Aveiro

A Ria de Aveiro é uma laguna costeira pouco profunda, situada na costa atlântica de Portugal. Esta apresenta uma morfologia complexa onde se podem distinguir quatro braços principais: um canal longo, estreito e pouco profundo (Canal de Mira), que se prolonga para sul; um canal largo e profundo (Canal de Ovar/S. Jacinto), que se prolonga para norte pelo Canal de Ovar; o canal de Ílhavo, estreito e pouco extenso, correspondente à entrada do rio Boco no sistema estuarino; o canal do Espinheiro, correspondente à entrada dos rios Vouga e Antuã, com formação de um sistema de complexo de ínsulas e canais e onde estão situadas a maior parte das salinas ativas. A morfologia da laguna é complexa e favorece as trocas com o mar, principalmente devido à reduzida contribuição das águas continentais para o sistema estuarino (AMBIECO, 2011).

A Ria de Aveiro é fortemente influenciada pelo regime de marés, de tipo semidiurno, que é o responsável pelas principais características quer da água quer dos sedimentos. Para além da forte influência marinha, a Ria é também o local de entrada de quantidades variáveis de água de origem continental (bacia hidrográfica do Vouga) a que se adicionam as descargas domésticas e industriais de uma região fortemente povoada.

Com efeito, a população residente em volta da laguna e dos seus canais excede os 300 000 habitantes (Dias et al., 1999, Vaz et al., 2005).

A Ria de Aveiro está separada do mar por uma estreita faixa de areia. A comunicação do mar para o interior da laguna faz-se por intermédio de uma abertura artificial que serve de acesso ao porto de Aveiro. Durante a maré alta, a laguna apresenta uma área inundada de cerca de 83 km², que se reduz para cerca de 66 km² durante a maré baixa (Dias et al., 1999, Dias et al., 2000). A massa de água circulante entre os dois níveis de maré passa por um estreito canal com cerca de 1,3 km de comprimento, 350 m de largura e 20 m de profundidade (mantido a essa cota por intermédio de dragagens periódicas). Fora dos canais de navegação, a profundidade média da laguna é de 1 m (Vaz et al., 2005, Pereira et al., 2009); nas margens dos canais e esteiros ocorrem zonas entre-marés apreciáveis, caracterizadas pela existência de lodaçais e sapais salgados.

A circulação hidrológica na Ria é dominada pela influência marinha, variando o volume de água trocado durante um ciclo de maré entre 25 a 70×10⁶ m³, para marés com 1,0 a 2,5 m de altura, respectivamente (Cunha et al., 1999). Vaz e colaboradores (2005) indicam que, para o final do verão, uma contribuição total de água doce da ordem dos 1,8×10⁶ m³ durante um ciclo de maré, face aos valores de cerca de 34,9×10⁶ m³ e 136,7×10⁶ m³ de entrada de água marinha observados na barra em marés extremas (baixas e altas, respectivamente). A partir da entrada da barra irradiam 4 canais principais (Mira, Ovar/S. Jacinto, Ílhavo e Espinheiro), com comportamentos hidrológicos distintos (Vaz et al., 2005).

Gradientes longitudinais de temperatura e salinidade têm sido observados em todos os canais da laguna, com registo de valores mais baixos de salinidade e mais altos de temperatura no extremo montante destes. Na zona central da laguna, os valores registados para a temperatura e a salinidade são próximos dos característicos para águas oceânicas. Globalmente, os valores mais baixos de salinidade e mais altos para a temperatura têm sido observados na parte terminal do canal de Mira, na margem leste do canal do Espinheiro, e na baía do Laranjo, o

que reflete a importância da água doce no estabelecimento da estrutura térmica e salina (vertical e horizontal) da laguna (Dias et al., 1999). O canal de Mira apresenta o gradiente longitudinal mais acentuado; no canal de S. Jacinto/Ovar, a influência marinha não é tão forte, situando-se a isotérmica dos 16°C e a isohalina dos 35 mais próxima do oceano do que nos outros canais à superfície. Em todos os casos, desde que a profundidade dos canais o permita, desenvolve-se uma cunha salina em profundidade que influencia o fundo a uma distância superior à das águas superficiais (Dias et al., 1999).

No que diz respeito às temperaturas, verifica-se a existência de 2 regimes distintos, relacionados com a entrada de água oceânica, mais fria (regime semi-diurno) e com o aquecimento progressivo devido à exposição à radiação solar (regime diurno). A grande superfície da laguna, associada a uma profundidade média reduzida facilitam o estabelecimento de processos de estratificação térmica durante as marés altas diurnas, que se dissipam quando as correntes de maré se intensificam. No entanto, estes fenómenos apenas terão algum significado durante a época das chuvas, nunca se sobrepondo à variabilidade longitudinal, resultante do ciclo das marés (Moreira et al., 1993, Dias et al., 1999).

Na zona envolvente à laguna existem potenciais focos de poluição, destacando a zona industrial de Estarreja (poluição química na produção de cloro, soda, amoníaco entre outros), as fábricas de pasta de papel nas margens dos rios Antuã e Vouga, bem como a contaminação microbiológica com origem nos efluentes urbanos e zonas agrícolas (criação de gado, culturas anuais de sequeiro, como o trigo e o milho, e de regadio, como os arrozais).

A Ria de Aveiro é uma área de especial interesse para a conservação da natureza e da biodiversidade, pela diversidade de espécies que alberga e de habitats que abriga, lhe conferindo estatutos conservacionistas de importância nacional, comunitária e internacional o que é refletido pela sua designação como Zona de Proteção Especial

(ZPE) ao abrigo da Diretiva das Aves, motivo pelo qual faz parte da Rede Natura 2000.

Na Ria de Aveiro o desenvolvimento da indústria e da urbanização gera problemas de poluição através da emissão de efluentes de diversas atividades antrópicas para a lagoa. Embora menos industrializados, Mondego estuário é impactado pela agricultura (AMBIECO, 2011).

Os efluentes das empresas do complexo químico de Estarreja foram descarregados durante décadas em valas que conduziam à Ria de Aveiro. O Largo do Laranjo e o Largo da Coroa são duas zonas que poderão ter um registo dos contaminantes descarregados, uma vez que se tratam de bacias de sedimentação que recebem fluxos de água e partículas em suspensão provenientes de esteiros que receberam descargas das valas (AMBIECO, 2011).

4.2. Rio Mondego

O rio Mondego é o mais longo rio localizado exclusivamente em território português. O estuário Mondego (40°08'N 8°50'W) é um sistema temperado que se propaga ao longo de 21 km da costa centro-ocidental de Portugal perto da cidade Figueira da Foz (C.C.D.R.C, 2000, Ramos et al., 2012). Sua população excede os 680,000 habitantes (Mantas et al., 2013). A deposição de sedimentos perto da boca do estuário tem levado a formação duma ilha (Ilha Murraceira) de 7 km de largura e 2 km de comprimento, na qual se visualiza dois braços (norte e sul) (Marques et al., 1993).

O todo o estuário se encontra em permanente pressão antropogénica e muitos fatores determinam a sua sobrevivência e desenvolvimento como um sistema (Marques et al., 2003). O dia 10 de dezembro de 2007, as euhalinas do braço norte foi dragado para incrementar a capacidade do porto e conectar dois *berths* pré-existentes. A área dragada compreendia um corredor de 3 ha (300 × 100 m) localizadas perto da margem continental. As operações de dragado foram

levadas a cabo para aumentar a profundidade de 6 a 10 m, do canal de navegação e da zona dos cais da nova secção de descarga dos *berths*. O impacto físico desde procedimento foi a remoção do sedimento do fundo, a alteração da topografia do fundo (aumento da profundidade) e o deslocamento do material, o qual foi depositado dentro da boca do Rio Mondego, perto da costa provocando câmbios no sistema aquático natural (Ceia et al., 2013).

As alterações introduzidas pelo desenvolvimento do porto, a sua manutenção e regularização do canal fluvial levou a um rápido assoreamento na área onde era possível a comunicação artificial entre ambos os braços. Como consequência, enquanto que o braço norte recebe a maior parte das descargas do Mondego, o braço sul é mais controlado pelo pequeno rio Pranto e as influencia da maré. Estes dois subsistemas criados no início dos anos 90 estavam sujeitas a intentos de restauração experimental (Marques et al., 2007).

No geral, o estuário é afetado pela eutrofização e uma substituição das comunidades de algas originais e aumento da frequência de macroalgas verdes bentônicas (Marques et al., 2007).

O sistema é monitorado regularmente desde 1986 incluindo uma vasta gama de parâmetros físicos, químicos e biológico, incluindo salinidade, turbidez (que pode ser influenciada pelas atividades do porto e as mudanças na dinâmica dos dois braços e pode ter uma influência direta sobre as comunidades biológicas do estuário) e clorofila-a (Mantas et al., 2013).

5

Metodologia

O presente capítulo contém a metodologia resumida das diferentes etapas da pesquisa. No Anexo I, encontra-se a metodologia detalhada de todo os procedimentos desenvolvimentos na pesquisa, os materiais, solventes e reagentes utilizados e a descontaminação de alguns desses, assim como os equipamentos utilizados e as suas especificações.

5.1.

Amostragem

As amostras de sedimento superficial foram coletadas em 22 estações distribuídas entre a Ria de Aveiro e o estuário do Rio Mondego (Figura 6). A coleta foi realizada pelo grupo do prof. Armando C. Duarte da Universidade de Aveiro, Portugal; e enviadas já liofilizadas para o LabMAM da PUC-Rio. Braço

Os critérios de escolha dos locais de amostragem basearam-se nas potenciais fontes de contaminação de poluentes orgânicos persistentes e também na tentativa de fazer amostragem que incluísse os principais canais da Ria.

Em ambos os sistemas aquáticos, Ria de Aveiro e estuário do rio Mondego, a localização das estações de amostragem foi também escolhida de acordo com o compromisso entre a potencial distribuição de contaminantes e a máxima disponibilidade em cada local das matrizes procuradas. Coletaram-se sedimentos superficiais (0-5 cm de profundidade) em dezoito estações de amostragem de Ria de Aveiro lagoa e quatro do Mondego estuário.

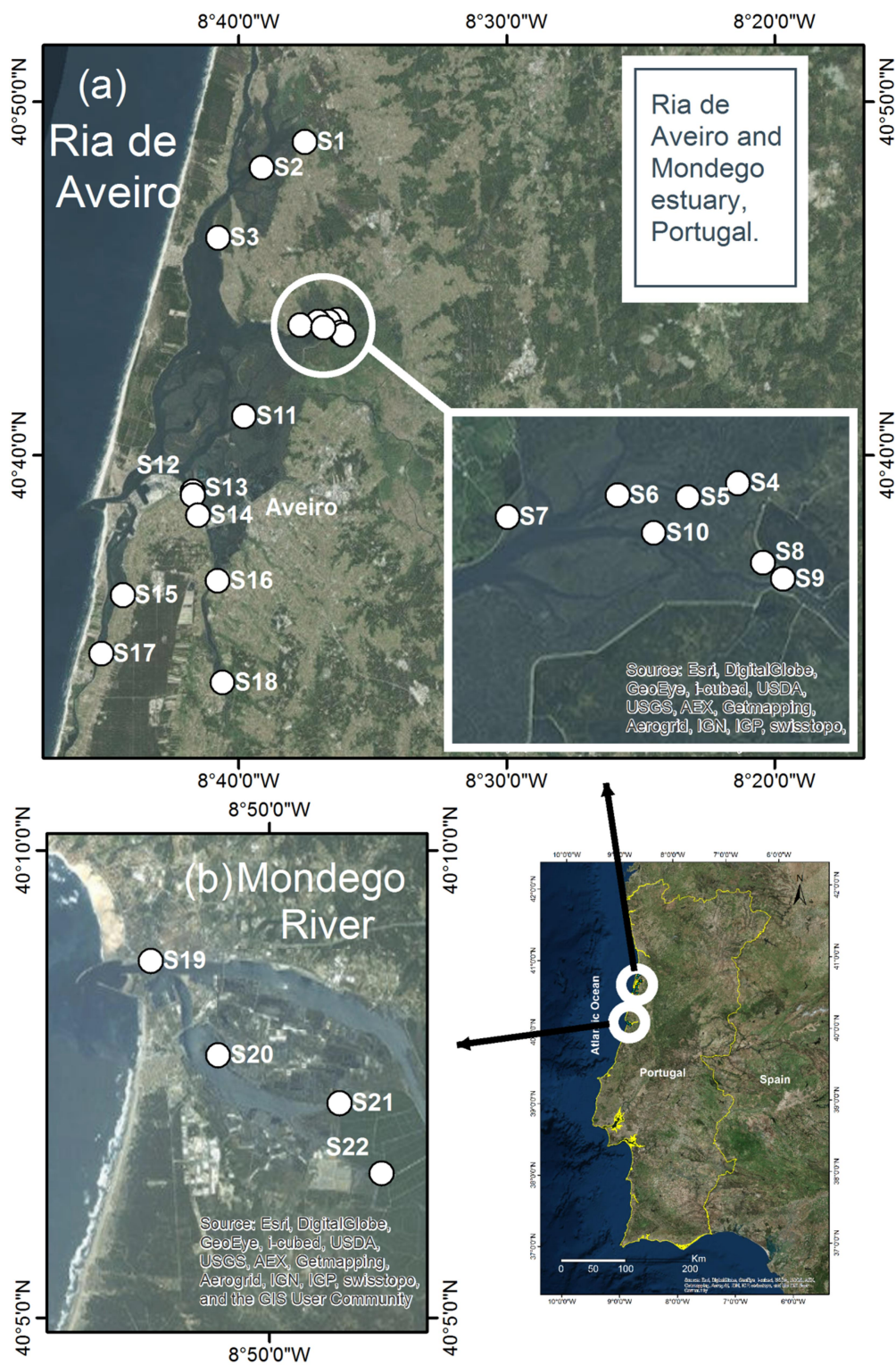


Figura 6. Estações de amostragem de sedimentos e biota na Ria de Aveiro e no estuário do rio Mondego.

Na Figura 6 apresenta-se a distribuição das estações de amostragem na Ria de Aveiro. Na Tabela 3 apresenta-se a descrição da localização das estações de amostragem em ambos os sistemas mostrados na Figura 6.

Um número maior de estações de amostragem foi selecionado para Ria de Aveiro, devido à sua área maior (66 km² na maré baixa) comparando com o estuário do Mondego (3,3 km²). Alguns dos motivos para a escolha dos pontos de amostragens apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 3. Estações de amostragem na Ria de Aveiro e estuário do rio do Mondego.

Estação	Ponto de amostragem	Escolha dos pontos
Ria de Aveiro		
S1	Largo da Coroa (cabedelo)	Influência do “esteiro da Ribeira Nova”.
S2	Norte da ponte da Varela (saída do esteiro do Amieiro)	
S3	Béstida	Caracterização do canal.
S4	Esteiro de Estarreja, Largo do Laranjo	Recepção de contaminantes.
S5	Saída do Antuã, Largo do Laranjo	
S6	Laranjo (Norte), Largo do Laranjo.	
S7	Largo do Laranjo (Oeste).	
S8	Largo do Laranjo	
S9	Largo do Laranjo	
S10	Laranjo (zona Sul), Largo do Laranjo	Indústria de pasta do papel perto.
S11	Saída do rio Vouga (rio Novo do Príncipe)	
S12	Gafanha (local no interior de marinha), Porto de Aveiro	Influência dessa atividade.
S13	Gafanha (local em praia de lama), Porto de Aveiro	
S14	Cais dos Bacalhoiros, Porto de Aveiro .	Canal de Mira
S15	Costa Nova	
S16	Ílhavo	
S17	Vagueira	
S18	Vagos	Canal de Ílhavo
Estuário do rio Mondego		
S19	Marina da Figueira da Foz	Influência dessa atividade.
S20	Gala	Cerca da população de Gava
S21	Braço sul do estuário	Caracterização do estuário.
S22	1km a jusante da comporta do rio Pranto	Rio Pranto: presença de pesticidas.

*No “esteiro da Ribeira Nova” desagua uma vala (Vala da Breja) que recebeu descargas de indústrias do Complexo Químico de Estarreja.

Considerando as actividades antropogénicas desenvolvidas em torno da Ria de Aveiro, as principais (e potenciais) fontes de contaminantes orgânicos são: (i) actividade portuária no Porto de Aveiro e estuário do rio Mondego, (ii) actividade industrial (complexo químico de Estarreja) e (iii) esgoto doméstico.

5.2. Métodos analíticos

Para quantificar os teores de carbono orgânico total (COT) e nitrogénio total (NT) foi utilizado o método de combustão a seco no equipamento THERMO Scientific (*modelo Flash 2000*). Os sedimentos foram descarboxados por adições sucessivas de ácido clorídrico (2 M) até não mais se observar reacção com o sedimento, e depois o sedimento foi novamente seco.

A determinação de lipídios biomarcadores seguiu procedimento já utilizado pelo LabMAM e publicado anteriormente (Carreira et al., 2004, Carreira et al., 2010, Carreira et al., 2011). Os sedimentos liofilizados foram extraídos usando o equipamento *Accelerated Solvent Extractor*, ASE-200 (Dionex), a 80 °C e 1500 Psi (2 x 8 min) com DCM:MeOH (9:1). Foram adicionados nas amostras aproximadamente 2500 mg dos padrões subrogados androstanol (esterol) e 1-nonadecanol (álcool). O volume do extrato bruto foi reduzido em evaporador rotativo. O teor de lipídios extraídos (TLE) foi calculado como a massa restante após evaporação até peso constante de cerca de 20 µL do extrato bruto e levando à secura (45 °C) até peso constante (precisão $\pm 0,01$ mg), sendo aceite resultado com desvio-padrão relativo $\leq 10\%$ de uma série de ao menos 3 leituras.

Uma alíquota do extrato bruto correspondente a cerca de 2 mg de TLE foi retirada do extrato bruto e levada à secura com N₂, visando à determinação de lipídios biomarcadores. Inicialmente, a fração do extrato passou por uma reacção de saponificação, na qual foram utilizados 3 mL de uma solução de NaOH 1 M em metanol e aquecendo-se a mistura a 110 °C por 2 horas. A reacção foi encerrada por banho de gelo. A fração

contendo compostos não-saponificáveis (SAP-N; *n*-álcoois, esteróis e triterpenoides) foram extraídas com *n*-hexanos (3x) e estocada em frasco de vidro. O resíduo foi acidificado com 3 mL de HCl 3 M e a fração contendo os ácidos, agora protonados (SAP-A; ácidos graxos), foi extraída da mesma forma que a SAP-N. No presente trabalho, apenas a fração SAP-N foi analisada, após remoção de traços de água usando sulfato de sódio anidro purificado (extração com solvente). A fração SAP-A foi armazenada a -20°C para análises posteriores.

As frações SAP-N foram concentradas até 500 µL e separadas por cromatografia em coluna com um grama de sílica-gel desativada a 5%, e descontaminada com *n*-hexanos. Usaram-se três fases moveis: F1: 5 mL de *n*-hexanos, F2: 5 mL de *n*-hexanos:diclorometano, (1:2) e F3: 5 mL de metanol:diclorometano, (1:1). As frações F3 que contem os biomarcadores de interesse (esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides) foram derivadas usando-se 100 µL de BSFTA e 100 µL de acetonitrila anidro a 70 °C durante uma hora.

As frações F3 derivadas foram levadas à secura com N₂ e redissolvidas em 500 µL de DCM e 500 ng de 5- α -colestano como padrão interno, PI.

Os lipídios foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), utilizando o equipamento Trace GC Ultra - ISQ com injetor automático TriPlus (*Thermo SCIENTIFIC*). Usou-se como fase estacionaria uma coluna de alta resolução DB-5MS, de 30 m de largura, com diâmetro de 0,250 mm e filme de 0,25 µm (*Agilent J&W GC Columns*). Como fase móvel foi usado hélio gasoso. Foram injetados 1,3 µL das amostras e padrões sob um fluxo de fenda de 80 mL min⁻¹ a 60 °C e 70 KPa. Usou-se uma programação em batelada até 50 min de tempo de retenção e temperatura progressiva de 60, 220, 280 e 300 °C com rampas de 20, 2 e 20 °C min⁻¹ respectivamente. Os resultados foram visualizados usando o software Thermo Xcalibur 2.1.0 SP1.1160 (*Thermo Fisher Scientific Inc*).

Os lipídios biomarcadores presentes nas amostras foram identificados e quantificados através de padrões autênticos no GC-MS. Para a quantificação dos *n*-álcoois, usou-se o pico gerado pelo m/z 103,3 no MS. Os triterpenoides, com a soma dos íons 204+218. Para os esteróis usaram-se diferentes íons na quantificação, incluindo íons confirmativos (Tabela 6 e 7, Anexo I). Foram feitas 16 curvas de calibração com padrões autênticos (Tabela 8, Anexo I) de concentrações de 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ng mL⁻¹.

Três brancos acompanharam as amostras desde o processo de extração. O valor médio da massa dos brancos foi descontado das amostras.

Prévio ao tratamento das amostras foi realizado um teste de recuperação em uma amostra (S1), analisada em quatro réplicas, para avaliar a reprodutibilidade do método.

A recuperação média dos padrões subrogados foi de 57,7 % \pm 14,8 % para os esteróis e de 53,3 % \pm 14,2 % para os álcoois. As concentrações dos biomarcadores não foram corrigidas com as porcentagens de recuperação. A tabela com os valores individuais das porcentagens de recuperação apresenta-se no capítulo dos Anexos II (Tabela 12).

6

Resultados e discussão

O presente capítulo contém os resultados obtidos das diferentes análises realizadas nesta pesquisa. Esta se encontra dividida em quatro partes: composição elementar da MO, distribuição de biomarcadores lipídicos nos sedimentos, caracterização da MO usando lipídios biomarcadores e, finalmente aporte de MO de origem fecal. A discussão dos resultados será apresentada ao longo do capítulo.

6.1.

Composição elementar da MO sedimentar da Ria de Aveiro e Rio Mondego

A concentração de COT oferece o indicador mais importante de MO, já que, aproximadamente mais do 50 % da MO está composta por C (Bianchi & Canuel, 2011). Na Ria de Aveiro o COT variou de 9,94 a 43,00 mg g⁻¹ e no Rio Mondego de 10,99 a 29,40 mg g⁻¹. De forma geral, o conteúdo de COT na Ria de Aveiro foi maior do que o Rio Mondego com valores médios de 24,80 ± 8,54 mg g⁻¹ e 20,88 ± 7,76 mg g⁻¹, respectivamente (Tabela 10, Anexo II). De forma geral, observa-se que o COT tem uma tendência crescente do sul ao norte da lagoa (Figura 7b). As estações no canal de Mira (S15 e S16), e no canal de Ílhavo (S17), na zona sul da Ria Aveiro apresentaram os menores aporte de material orgânico. A estação S18, localizada também no canal de Ílhavo, apresentou uma maior teor de COT no seu sedimento. Esse comportamento pode ser devido à influencia da entrada do Rio Boco. As estações no braço norte do estuário (S1 e S3) foram as que apresentam os valores maiores de COT (Figura 7).

As estações localizadas no Largo do Laranjo (S4, S5, S6, S7, S8, S9 e S10) apresentaram valores de COT entre 19,56 mg g⁻¹ (S16) e 39,29 μg

g^{-1} (S10). Observa-se que as estações localizadas mais para o norte do largo mostraram conteúdos do COT menores que aquelas localizadas no sul do largo. As estações do canal Espinheiro (S12, S13 e S14) apresentaram concentrações variadas de COT.

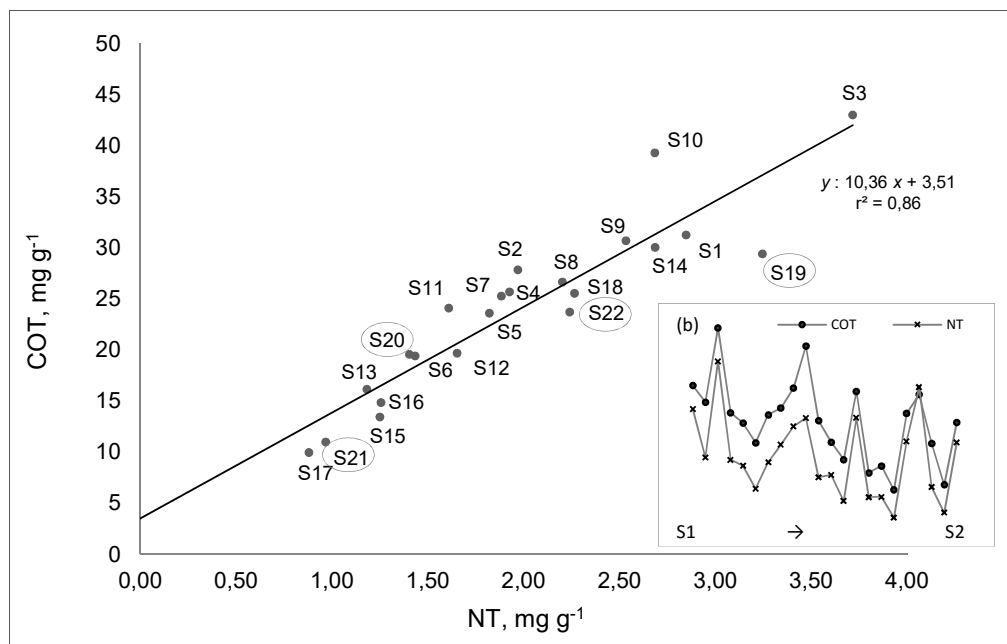


Figura 7. Gráfico de COT versus NT (mg g^{-1}), incluindo a equação da reta e a correlação entre as variáveis r^2 . (b) perfil aproximado das concentrações de COT e NT das estações.

Na determinação de nitrogênio, esse pode representar o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico. Por isso, esse é chamado de nitrogênio total ou NT. O nitrogênio inorgânico representa uma fração relativa pequena do NT associado à matéria orgânica particulada e sedimentar quando a contribuição de MO não é relativamente pequena (Meyers, 2003). Uma forma de estabelecer o aporte de N inorgânico e orgânico consegue-se com a construção de um gráfico de COT versus NT (Figura 7).

Observa-se na Figura 7 que o intercepto ($b: 3,5$) da equação da reta cruza no eixo y, o qual representa ao COT. Essa tendência sugere que, o

aporte de nitrogênio no *bulk* de MO é principalmente orgânico, já que, as concentrações de NT aparecem uma vez que se tem aporte de COT.

Os resultados do NT foram semelhantes nos dois locais variando de 0,88 a 3,72 mg g⁻¹ e média de 1,99 mg g⁻¹ para a Ria de Aveiro e de 0,97 a 3,25 mg g⁻¹ e média de 1,97 mg g⁻¹ no Rio Mondego (Tabela 10, Anexo II). A distribuição de NT ao longo da lagoa e o Rio Mondego seguiu a mesmo perfil do COT (Figura 7).

Uma análise importante obtém-se ao combinar o COT com o NT (mol mol⁻¹). Assim, pode-se inferir informação básica sobre fontes de algas e plantas vasculares (Meyers, 1997). A razão C/N (Figura 8) no Rio Mondego apresentou uma média de 12,99 ± 2,18 mol mol⁻¹ variando de 10,56 a 15,80 mol mol⁻¹. Na Ria de Aveiro, a média de C/N foi de 14,64 1,75 mol mol⁻¹, com uma variação de 12,52 a 17,45 mol mol⁻¹. A razão C/N tem sido bastante estudada por diversos autores, os quais estabelecem faixas associadas a um tipo de fonte de MO. Cloern et al. (2002) realizaram um estudo na baía de San Francisco, no qual observou uma alta variabilidade da razão C/N com faixa entre 4,3 e 196 (mol mol⁻¹), sugerido que as razões altas eram associadas a plantas vasculares e as razões mais baixas a plantas aquáticas.

A Figura 8 representa os valores de C/N de cada estação, assim como algumas faixas de razão C/N que são associadas a uma determinada fonte de MO. A Figura 8 permite observar que as fontes de MO poderia corresponder a fontes alóctones como plantas vasculares emergentes (12 a 108 mol mol⁻¹), assim como madeira terrestre (13 a 89 mol mol⁻¹) (Cloern et al., 2002).

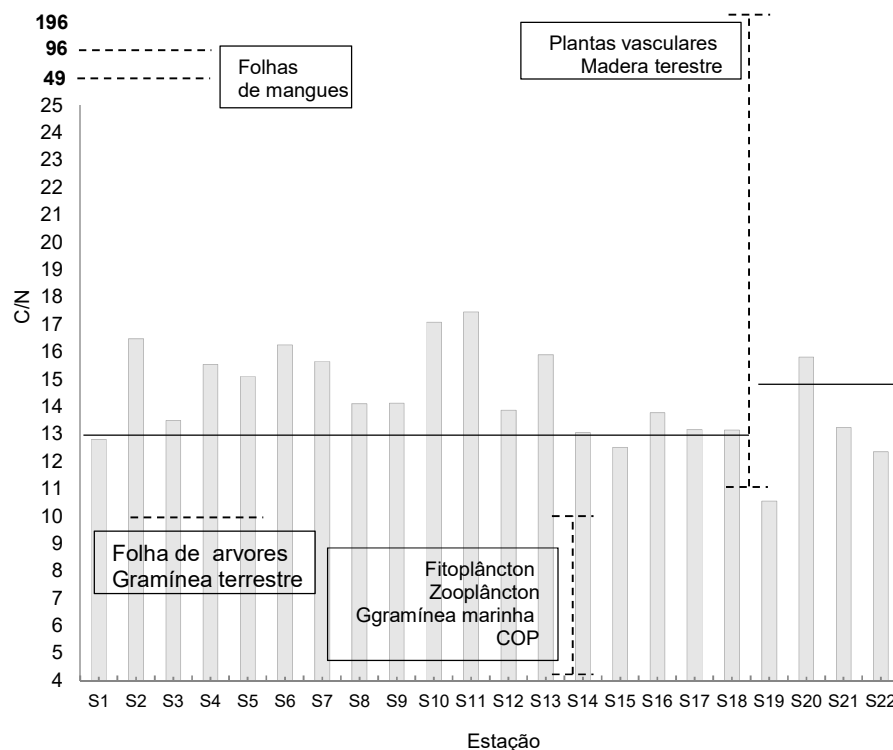


Figura 8. Razão C/N na Ria de Aveiro e Rio Mondego; e faixas de razão C/N associadas a uma determinada fonte de MO. Adaptado de Bianchi & Canuel (2011).

Observando os valores de C/N dos sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego não se relacionam com folha de mangues (49 e 96) (Benner et al., 1990). Este é um resultado esperado, já que nos locais não se encontra presente esse tipo de vegetação.

Cabe ressaltar que, ao se fazer esse tipo de análise tem que ser levado em conta as limitações do indicador C/N. Por um lado, o COT e o NT representam uma porcentagem alta no *bulk* total de matéria orgânica, por outro lado existem muitos fatores que podem influenciar nos valores da razão C/N. Esses incluem a composição bioquímica das espécies durante os ciclos anuais ou a contribuição de micróbios colonizadores de plantas, aportes de nitrogênio amoniacal, entre outros. Assim, a razão C/N deve ser estudada de forma cautelosa como uma forma de traçar fontes de matéria orgânica, mas, quando é usado esse deve ser acoplado com estudos de isótopos estáveis ou biomarcadores (Bianchi & Canuel, 2011).

O TLE na Ria de Aveiro variou de 0,64 a 4,80 mg g⁻¹ (Figura 9). A estação S8 foi a que teve a presença mais alta de lipídios no sedimento, seguindo as estações S9 e S3 com valores de 3,60 e 3,55 mg g⁻¹, respectivamente. Os locais com menor conteúdo de lipídios foram nas estações na zona sul do estuário S17, S16, S15 e S12. A Ria de Aveiro apresentou uma média de 2,06 mg g⁻¹ de TLE, sendo menor do que o Rio Mondego, o qual teve uma média de 2,49 mg g⁻¹ variando de 1,04 a 5,60 mg g⁻¹. Esse resultado sugere uma maior presença de lipídios nos sedimentos do rio do que na lagoa. No entanto, observa-se que, a estação que aumenta a média e TLE no Rio Mondego corresponde a estação S19 (5,60 mg g⁻¹), a qual corresponde a estação mais perto de oceano no estuário, o que favorece a precipitação do material particulado, e por tanto dos lipídios presentes no local. As estações S20, S21 e S22 apresentam valores de 1,40, 1,04 e 19,35 mg g⁻¹, respectivamente, os quais são menores do que a média de TLE na Ria de Aveiro. Os valores de TLE das estações são apresentados na Tabela 11 (Anexo II).

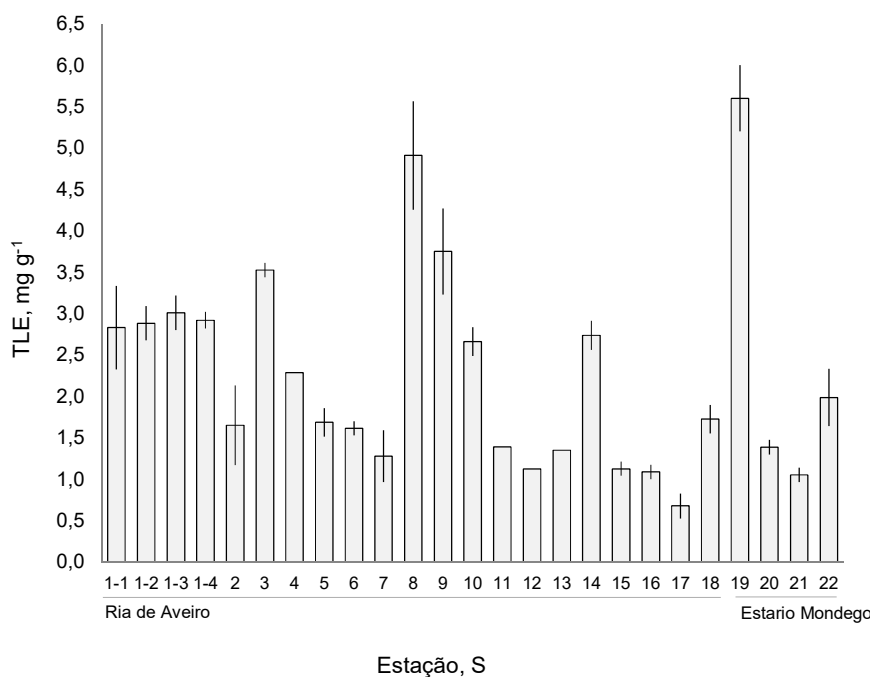


Figura 9. Gráfico de TLE das estações S1-S22. As linhas representam o desvio padrão de cada estação.

A análise de TLE permite determinar a quantidade em massa de lipídios extraíveis com solventes orgânicos presentes nos sedimentos. Os valores de TLE das réplicas da amostra S1 (S1-1, S1-2, S1-3, S1-4) foram semelhantes, com valor médio de $2,91 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$, mostrando que o método utilizado para a extração de lipídios apresenta uma excelente reprodutibilidade. Em nenhum dos casos as triplicatas das amostras tiveram um DPR maior aos 10 %, sendo esse o critério de aceitação dos resultados (Tabela 11, Anexo II). O valor médio do DPR das triplicatas foi de $2,41 \pm 1,99 \%$.

Observa-se no gráfico anterior que a zona sul da lagoa Ria de Aveiro apresentou os valores mais baixos de TLE (estações S15, S16 e S17, canal de Mira e Ílhavo), em quanto que as estações no centro da lagoa S8, S9 e S10 (sul Largo do Laranjo) mostrara valores maiores do total de lipídios.

O TLE representou uma porcentagem relativa no conteúdo de COT dos sedimentos de 8,65 %, variando de 4,79 (S7) a 19,04 (S19) %. Essa composição relativa concordam com a composição relativa (% sobre a matéria orgânica total) de alguns grupos de biomassa marinha e reservatórios terrestres (Saliot & Méjanelle, 1994).

O TLE apresentou uma correlação exponencial (r^2 : 0,77) com o COT (Figura 10). No entanto, é notável que as estações S8 e S19 mostraram uma posição no gráfico fora da tendência das outras estações. Essas não foram levadas em conta no cálculo de r^2 . Essas duas estações têm uma proporção maior de lipídios no COT do que as outras estações, sugerindo um aporte de material lipídico maior do que o comportamento médio na Ria de Aveiro e no Rio Mondego.

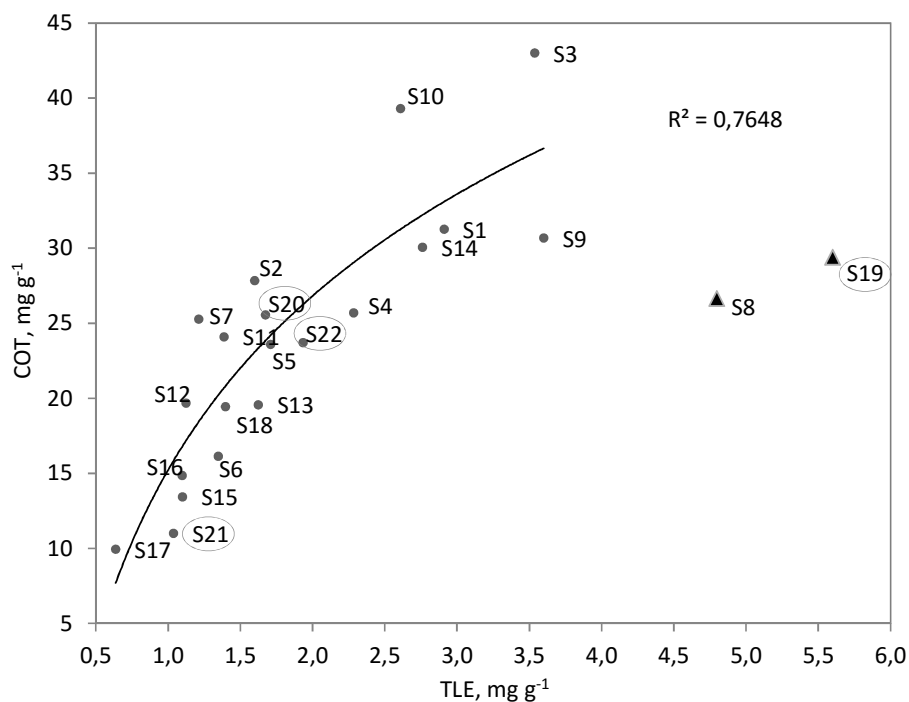


Figura 10. Gráfico de COT versus TLE.

6.2.

Distribuição de biomarcadores lipídicos nos sedimentos

Os esteróis foram os biomarcadores lipídicos mais abundantes nas amostras com um valor de 283, 21 $\mu\text{g g}^{-1}$ no total das estações, seguido dos triterpenoides com 235,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ e, finalmente os *n*-álcoois com um somatório de 135,02 $\mu\text{g g}^{-1}$.

6.2.1.

Esteróis

Os esteróis têm sido usados com êxito como traçadores da entrada de várias espécies de plantas e animais terrestres e marinhos, e seus processos de degradação como redução ou oxidação. Esses são melhores preservados nos sedimentos do ambiente do que outros

produtos biológicos, como amino ácidos ou carboidratos (Bianchi & Canuel, 2011)

No presente trabalho, foram identificados e quantificados 12 esteróis biomarcadores (Figura 52 - 64, Anexo III). Os esteróis de origem natural identificados foram: colesterol, diidrocolesterol, campesterol, brassicasterol, estigmasterol, sitosterol, dinosterol, e os esteróis saturados, colestanol e sitostanol. Além desses, os esteróis de origem fecal coprostanol, epicoprostanol e etilcoprostanol serão avaliados posteriormente.

A concentração total de esteróis teve uma média $11,04 \pm 9,55 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 1,99 (S2) - $39,56 \mu\text{g g}^{-1}$ (S8) na Ria de Aveiro. O Rio Mondego apresentou uma concentração total de esteróis de $21,12 \pm 25,73 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 6,41 (S21) - $59,62 \mu\text{g g}^{-1}$ (S19). Estudos em outro estuário no sul de Portugal (lagoa Ria Formosa) têm reportado uma concentração total de esteróis com valores máximos de $16,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mudge & Duce, 2005) e $27,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mudge et al., 1999). No somatório total de esteróis, foram incluídos os esteróis de origem fecal: coprostanol, epicoprostanol e etilcoprostanol.

O colesterol (colest-5-en-3 β -ol) foi o esteroide mais abundante na Ria de Aveiro (21,75 %) e no Rio Mondego (24,28 %), presente em todas as amostras com valores entre 14,01 - $45,12 \mu\text{g g}^{-1}$ e 20,72 - $25,80 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Dado que o colesterol representa variáveis fontes de MO incluindo animais e esgoto, seu uso como biomarcador independente é limitado (Mudge et al., 1999). No entanto, esse pode ser usado junto com outros esteróis na forma de razões, por exemplo, a razão coprostanol/colesterol para avaliar a contaminação por esgoto. Essa razão, assim como também a concentração de coprostanol, etilcoprostanol e epicoprostanol será avaliada no item de caracterização de MO de origem fecal. A concentração de colesterol teve uma boa correlação com a concentração total de esteróis nos sedimentos (r^2 : 0,80).

O esteroide sitosterol (24-etilcolest-5-en-3 β -ol) é típico de plantas vasculares (geralmente terrestres), embora esse se encontre presente em

certas espécies de microalgas (Volkman, 1986). O sitosterol foi o segundo esterol mais abundante nos dois locais com uma concentração relativa no total de esteróis de $20,83 \pm 6,61$ % na Ria de Aveiro e de $17,58 \pm 6,68$ % no Rio Mondego. Esse esterol apresentou uma concentração na Ria de Aveiro de $0,71 \pm 50$ $\mu\text{g g}^{-1}$ variando entre 0,34 a $6,15$ $\mu\text{g g}^{-1}$. No Rio Mondego os valores foram de $1,55 \pm 1,58$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de 1,11 a $5,70$ $\mu\text{g g}^{-1}$.

O terceiro esterol mais abundante nos estuários dos esteróis insaturados foi o estigmasterol (24-etil-5 α -colest-22-en-3 β -ol), outro esterol traçador de MO usualmente associado a aporte de origem terrestre e usado como um traçador de plantas superiores e também de fitoplâncton (Gaskell & Eglinton, 1976, Volkman, 1986). O estigmasterol teve com uma abundância relativa no total de esteróis de $7,25 \pm 2,62$ % na Ria de Aveiro, e de $7,40 \pm 3,16$ % no Rio Mondego. A concentração média desse esterol na Ria de Aveiro foi de $0,68 \pm 0,38$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,17 a $1,39$ $\mu\text{g g}^{-1}$, e de $1,02 \pm 0,60$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,47 a $1,88$ $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego.

Continuando com a ordem de abundância, segue o esterol brassicasterol (24-metilcolest-5,22(E)-dien-3 β -ol), o qual teve uma porcentagem relativa no total de esteróis de $6,77 \pm 2,22$ % na Ria de Aveiro, e de $8,47 \pm 1,52$ % no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $0,97 \pm 0,99$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,04 a $1,81$ $\mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $1,74 \pm 1,91$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,52 a $3,90$ $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. O brassicasterol é proeminente em muitas espécies de diatomáceas (Barrett et al., 1995) e dinoflagelados (Volkman, 1986). Esse esterol tem sido usado para atribuir contribuição de MO terrestre e de fitoplâncton em sistemas marinhos e sedimentos estuarinos (Mudge & Bebianno, 1997). O brassicasterol é chamado também de diatomasterol.

O campesterol (24-metilcolest-5-en-3 β -ol), um esterol traçador de MO de origem terrestre, teve uma abundância relativa no total de esteróis de $6,73 \pm 1,26$ % na Ria de Aveiro, e de $6,92 \pm 0,50$ % no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $0,52 \pm 0,36$ $\mu\text{g g}^{-1}$, variando de

0,16 a 1,65 $\mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e $0,61 \pm 0,63 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,43 a 3,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. Esse esterol pode ser atribuído a fontes de MO de plantas superiores, diatomáceas e algas verdes (Jaffé et al., 1995). Também, alguns estudos utilizam esse esterol como indicador autóctone de MO (Mudge & Duce, 2005).

O dinosterol um esterol traçador de MO de origem marinha, teve uma abundância relativa no total de esteróis de $9,46 \pm 11,17 \%$ na Ria de Aveiro, e de $6,43 \pm 5,55 \%$ no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $0,52 \pm 0,36 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,16 a 1,65 $\mu\text{g g}^{-1}$, e $0,61 \pm 0,63 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,43 a 3,84 $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. A abundância relativa desse esterol no total de esteróis foi maior que 20 % em três estações S15 (21,90 %), S17 (35,70%) e S18 (35,11%), o qual aumenta o valor da média. No entanto, em outras estações a abundância relativa foi muito pequena em comparação com os outros esteróis. Por exemplo, as estações S4, S12 e S13 apresentaram valores de 0,66, 0,14 e 0,10 %, respectivamente.

Finalmente o diidrocolesterol (colest-5,22-dien-3 β -ol), um esterol indicador de zooplâncton, fauna bentônica, diatomáceas, algas vermelhas e dinoflagelados (Volkman, 1986, Barrett et al., 1995) foi o esterol insaturado menos abundante nos dois locais, com uma abundância relativa no total de esteróis de $2,99 \pm 1,07 \%$ na Ria de Aveiro, e de $3,29 \pm 0,80 \%$ no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $0,26 \pm 0,14 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,10 a 0,72 $\mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $0,55 \pm 0,52 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,25 a 1,33 $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego.

Esteróis saturados estão presentes em ambientes aquáticos e são também produtos de degradação dos esteróis insaturados (Bianchi & Canuel, 2011). Ao longo dos estuários foram identificados o colestanol e o sitostanol. Esses esteróis se acharam em menor concentração nos estuários do que seus análogos insaturados, mas foram identificados em todas as amostras com valores acima do LQ.

O colestanol (5 α -colest-3 β -ol) foi o esterol saturado mais abundante nas estações (incluindo os de origem fecal). Esse apresentou

uma abundância relativa no total de esteróis de $8,45 \pm 1,62$ % na Ria de Aveiro, e de $8,98 \pm 1,99$ % no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $2,51 \pm 2,91 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,17 a $3,73 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $5,52 \pm 6,52 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,53 a $4,57 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. Esse esterol se encontra presente em dinoflagelados e diatomáceas (menor contribuição), e é também um produto de redução bacteriana de colesterol (Volkman et al., 1998, Carreira, 2000).

Por último, o sitostanol (24-etil-5 α -colestano-3 β -ol) apresentou uma abundância relativa no total de esteróis de $5,29 \pm 1,70$ % na Ria de Aveiro, e de $3,31 \pm 1,57$ % no Rio Mondego. A concentração média desse esterol foi de $0,68 \pm 0,44 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,08 a $1,58 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $1,40 \pm 1,63 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,12 a $1,50 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. Esse esterol ao igual que o sitosterol, se encontra em plantas superiores e algumas classes de fitoplâncton (menor proporção), e é também um produto de degradação sitosterol.

Os resultados completos são apresentados nas Tabelas 13, 14, 18 e 19 do Anexo II.

Os esteróis insaturados de origem fecal serão analisados no item de aporte de MO de origem fecal do presente trabalho.

Os esteróis metilencolesterol, diatomastanol, estigmastanol e campestanol, que estão incluídos no protocolo de análise utilizado, não foram encontrados nas amostras. O método não permitiu identificar a coprostanona nem a colestanona.

6.2.2. *n*-álcoois

O método permitiu identificar 10 *n*-álcoois de cadeia saturada (Fugira 42 - 51) e com número par de carbonos (C₁₆OH, C₁₈OH, C₂₀OH, C₂₂OH, C₂₄OH, C₂₆OH, C₂₈OH, C₃₀OH, C₃₂OH e o fitol). Os *n*-álcoois ou álcoois graxos biomarcadores são usados como indicadores para distinguir a contribuição entre MO marinhas e terrestres em sedimentos aquáticos

(Mudge & Bebianno, 1997). Os álcoois de cadeia longa ($\geq C_{22}$; LCOH) são indicadores muito utilizados para identificar a MO de origem continental. Já os *n*-álcoois de cadeia curta ($\leq C_{18}$; SCOH) são originados de fontes autóctones, como o plâncton aquático, ou podem ser produtos da decomposição do LCOH (Bianchi & Canuel, 2011).

A concentração total de *n*-álcoois teve uma média $6,14 \pm 4,70 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre $1,13$ (S17) - $17,34$ (S8) $\mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro e entre $3,62$ (S21) - $17,48$ (S19) $\mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. Um estudo em outro estuário no sul de Portugal (lagoa Ria Formosa) tem reportado uma concentração total de *n*-álcoois com valores entre $3,1$ - $14617 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo $C_{16}\text{OH}$ o mais abundante dessa lagoa (Mudge & Duce, 2005).

Os *n*-álcoois mais abundantes nas amostras foram os com 26 e 24 átomos de C, $C_{26}\text{OH}$ e o $C_{24}\text{OH}$. No entanto, ao analisar a abundância relativa dos dois estuários de forma independente, observa-se que esses apresentaram perfis diferentes na distribuição dos *n*-álcoois.

Assim, os *n*-álcoois mais abundantes na Ria de Aveiro foram os com 26, 24 e 22 átomos de C ($C_{26}\text{OH}$, $C_{24}\text{OH}$ e $C_{22}\text{OH}$). O $C_{26}\text{OH}$ com valor de $16,52 \pm 3,10 \%$, e concentração média de $1,14 \pm 0,99 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre $0,19$ - $4,05 \mu\text{g g}^{-1}$. Já o $C_{24}\text{OH}$ representou $16,52 \pm 3,10 \%$ no total dos *n*-álcoois, com uma concentração média de $0,90 \pm 0,62 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre $13,55$ - $21,71 \mu\text{g g}^{-1}$. O terceiro álcool mais abundante foi o $C_{22}\text{OH}$ com uma percentagem relativa de $13,18 \pm 9,06 \%$ e concentração média de $0,89 \pm 0,76 \%$, variando entre $<\text{LQ}$ - $2,28 \mu\text{g g}^{-1}$. OH

Os *n*-álcoois de cadeia longa $C_{28}\text{OH}$, $C_{30}\text{OH}$ e $C_{32}\text{OH}$ da Ria de Aveiro, apresentaram percentagens relativas menores que os *n*-álcoois de cadeia curta, com valores de $3,35 \pm 4,06 \%$, $4,03 \pm 2,97 \%$ e $3,51 \pm 2,09 \%$, respectivamente. As concentrações médias desses *n*-álcoois foram de $0,35 \pm 0,58 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $<\text{LQ}$ - $2,14 \mu\text{g g}^{-1}$), $0,31 \pm 0,39 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $<\text{LQ}$ e $1,46 \mu\text{g g}^{-1}$) e $0,20 \pm 0,17 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $<\text{LQ}$ - $0,65 \mu\text{g g}^{-1}$), respectivamente.

Os *n*-álcoois de cadeia curta na Ria de Aveiro C₁₆OH, C₁₈OH e C₂₀OH tiveram uma abundância relativa no somatório total de *n*-álcoois de 9,71 ± 4,81 %, 5,30 ± 1,39 % e 11,14 ± 3,70 %, respectivamente. Observa-se que o *n*-álcool de cadeia curta mais abundante na Ria de Aveiro foi o C₂₀OH, seguido do C₁₆OH e, finalmente o C₁₈OH. A concentração média desses *n*-álcoois foi de 0,48 ± 0,39 µg g⁻¹ (entre 0,15 - 1,69 µg g⁻¹) para o C₁₆OH, de 0,30 ± 0,28 µg g⁻¹ (entre 0,12 - 1,16 µg g⁻¹) para o C₁₈OH, e de 0,54 ± 0,28 µg g⁻¹ (entre 0,11 - 1,08 µg g⁻¹) para o C₂₀OH.

No Rio Mondego o *n*-álcool mais abundante foi o de cadeia longa C₂₂OH com uma percentagem relativa de 16,66 ± 1,62 % e concentração média de 1,93 ± 0,92 µg g⁻¹, variando entre 0,55 - 2,66 µg g⁻¹. Segue em abundância o *n*-álcool de cadeia curta C₁₆OH, o qual representou uma abundância relativa de 16,03 ± 1,34 % no total dos *n*-álcoois, com uma concentração média de 1,31 ± 0,98 µg g⁻¹, variando entre 0,52 - 2,74 µg g⁻¹.

Os seguintes em abundancia foram os *n*-álcoois de cadeia longa C₂₆OH e C₂₄OH. O C₂₆OH representou o 13,81 ± 2,94 % dos *n*-álcoois, com valor médio da concentração de 1,25 ± 1,19 µg g⁻¹, variando de 0,36 a 3,00 µg g⁻¹. Já o C₂₄OH representou o 14,02 ± 2,93 % no total dos *n*-álcoois, com uma concentração média de 11,16 ± 0,90 µg g⁻¹, variando entre 10,42 - 17,58 µg g⁻¹.

Da mesma forma que na Ria de Aveiro, os *n*-álcoois de cadeia longa C₂₈OH, C₃₀OH e C₃₂OH do Rio Mondego apresentaram percentagens relativas menores que os *n*-álcoois de cadeia curta, com valores de 1,90 ± 3,19 %, 2,05 ± 1,53 % e 2,24 ± 0,25 %, respectivamente. As concentrações médias desses *n*-álcoois foram de 0,30 ± 0,57 µg g⁻¹ (entre <LQ - 1,17 µg g⁻¹), 0,23 ± 0,31 µg g⁻¹ (entre <LQ e 0,69 µg g⁻¹) e 0,19 ± 0,15 µg g⁻¹ (entre 0,08 - 0,41 µg g⁻¹), respectivamente.

Os *n*-álcoois de cadeia curta no Rio Mondego C₁₈OH e C₂₀OH tiveram uma abundância relativa no somatório total de *n*-álcoois de 6,68 ± 1,00 %, e 9,45 ± 1,47 %, respectivamente. A concentração média desses

n-álcoois foi de $0,55 \pm 0,45 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $0,28 - 1,22 \mu\text{g g}^{-1}$) para o C_{18}OH , e de $0,71 \pm 0,40 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $0,37 - 1,27 \mu\text{g g}^{-1}$) para o C_{20}OH .

O fitol teve uma percentagem relativa nos *n*-álcoois de $13,42 \pm 8,83$ % na Ria de Aveiro e de $17,15 \pm 8,54$ % no Rio Mondego. A concentração do fitol teve uma média de $0,58 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $5,13 - 37,42 \mu\text{g g}^{-1}$) na Ria de Aveiro, e de $1,15 \pm 0,51 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $10,67 - 29,58 \mu\text{g g}^{-1}$) no Rio Mondego. Esse *n*-álcool é abundante em ambiente marinho (Sun et al., 1998, Rontani & Volkman, 2003). No entanto, esse é uma molécula relativamente lábil e deve ser considerado como indicador não-específico ao ser produzido por organismos autotróficos, tanto aquáticos quanto terrestres (Wakeham et al., 2002, Rontani & Volkman, 2003, Marchand et al., 2005). No somatório do total de *n*-álcoois inclui-se o fitol.

Os resultados das concentrações e percentagens relativas dos *n*-álcoois são apresentados nas Tabelas 15, 16, 20 e 21 do Anexo II.

Os *n*-álcoois C_{12}OH e C_{14}OH que estão incluídos no protocolo de análise utilizado, não foram encontrados nas amostras.

6.2.3. Triterpenoides

Foram identificados quatro triterpenoides: α -amirina, β -amirina, β -taraxerol e o lupeol (Figura 65 – 68). Esses compostos apresentaram uma concentração total média de $10,64 \pm 6,40 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $1,79 - 22,08 \mu\text{g g}^{-1}$) na Ria de Aveiro e de $11,10 \pm 2,82 \mu\text{g g}^{-1}$ (entre $7,48 - 14,04 \mu\text{g g}^{-1}$) no Rio Mondego. Os triterpenoides tem sido usados para identificar fontes de MO de origem terrestre em mangues (Koch et al., 2003) e sistemas tropicais rio-estuário (Volkman et al., 2007).

O triterpenoide mais abundante foi o lupeol (lup-20(29)-en-3 β -ol), o qual representou uma percentagem relativa no total de triterpenoides de $31,79 \pm 18,24$ % na Ria de Aveiro e de $42,74 \pm 5,69$ % no estuário do Rio Mondego. No entanto esse composto foi o único que não foi identificado em todas as amostras (ausente em S3, S7, S10, S11). A concentração de

lupeol teve uma média de $3,17 \pm 2,79 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre <LQ - $8,41 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro e $4,73 \pm 1,19 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 2,96 - $5,47 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego.

Segue em percentagem a β -amirina (olean-12-en- 3β -ol), representando o $29,60 \pm 6,60 \%$ no total de triterpenoides. A concentração média desse triterpenoide foi de $3,32 \pm 2,34 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 0,53 - $9,36 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $3,06 \pm 0,64 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 2,33 - $3,68 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. A α -amirina (urs-12-en- 3β -ol) teve uma percentagem relativa de $25,20 \pm 10,03 \%$, com concentração média de $2,93 \pm 2,25 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 0,41 - $9,73 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $2,22 \pm 1,23 \mu\text{g g}^{-1}$, variando entre 1,26 - $3,94 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego. A β -amirina e a α -amirina tiveram uma boa correlação (r^2 : 0,8266).

Finalmente o β -taraxerol (taraxer-14-en- 3β -ol) representou a menor percentagem do total de triterpenoides ($11,42 \pm 3,66 \%$). A concentração para esse marcador foi de $1,23 \pm 0,77 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,20 a $2,98 \mu\text{g g}^{-1}$ na Ria de Aveiro, e de $1,10 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$, variando de 0,69 a $1,47 \mu\text{g g}^{-1}$ no Rio Mondego.

6.3.

Caracterização da MO usando lipídios biomarcadores

Os esteróis biomarcadores mais comumente usados para estabelecer as fontes de MO são o colesterol (marcador marinho), o diidrocolesterol e brassicasterol (marcadores de fitoplâncton) e o sitosterol (marcador terrestre) (Mudge & Duce, 2005). Assim, um agrupamento que pode ser feito usando esteróis biomarcadores para distinguir entre MO de origem terrestre ou marinho, consegue-se com o somatório da abundância relativa de esteróis que representam cada fonte. Usando esse critério, observa-se que o somatório de sitosterol ($20,24 \pm 6,59 \%$), estigmasterol ($7,28 \pm 2,65 \%$) e campesterol ($6,77 \pm 1,15 \%$), esteróis usualmente associados com aportes de MO de origem terrestre é maior (34% no total de esteróis) quando comparado com o colesterol ($21,75 \pm 7,82 \%$) e o brassicasterol ($7,08 \pm 2,18 \%$), ambos de origem marinha.

Esses resultados sugerem que há um maior aporte relativo de MO derivado de vegetais superiores e terrestre nas áreas estudadas.

No entanto, surgem problemas com origem múltipla dos esteróis tratados individualmente, o qual faz necessário análises adicionais. Por exemplo, usando os dados obtidos de *n*-álcoois e triterpenoides nos sistemas.

Como foi mencionado anteriormente, é possível analisar a fonte da MO de acordo com a proporção entre os *n*-álcoois de cadeia longa (LCOH) (*long chain alcohol*) e os *n*-álcoois de cadeia curta (SCOH) (*short chain alcohol*). Observa-se na Figura 11 (eixo “x”) que os LCOH representam em 96 % das estações o 50 % ou mais do total dos *n*-álcoois, indicando uma presença dominante dos *n*-álcoois de origem terrestre.

No entanto, estudos anteriores tem sido estabelecido que os SCOH são degradados mais rapidamente do que os LCOH (Sargent et al., 1977). Essa degradação seletiva dos compostos pode alterar a proporção entre LCOH e SCOH. Os álcoois e esteróis biomarcadores têm sido muito usados na caracterização de sistemas aquáticos. Assim, uma comparação cruzada com outros marcadores de material terrestre pode ajudar aos *n*-álcoois nas interpretações. Na Figura 11 é plotado a razão entre sitosterol/(sitosterol+colesterol) para LCOH/(LCOH+SCOH). Na razão dos esteróis assume-se o sitosterol como um marcador exclusivo de MO terrestre e o colesterol como um marcador marinho. A importância dessa relação esteróis/*n*-álcoois não está focalizada a analisar a proporção de sitosterol no colesterol, mas a relação entre o perfil dessa razão comparado com o perfil da razão LCOH/(LCOH+SCOH). Observa-se na Figura 11 que existe uma relação ($r^2:0,5462$) na tendência das duas razões, pelo que é possível considerar a abundância maior dos *n*-álcoois de cadeia longa sobre os *n*-álcoois de cadeia curta como aporte de MO de origem terrestre. Observa-se na figura que a razão LCOH/(LCOH+SCOH) da estação S14 apresenta um perfil diferente das outras estações também localizadas no Porto de Aveiro (S12 e S13). Ao observar a concentração de colesterol presente nessa estação (13,12 μg

g^{-1}) pode-se observar que esta se situa muito acima do valor médio de colesterol no sedimento ($2,51 \pm 2,91 \mu\text{g g}^{-1}$). Esse comportamento pode afetar a razão analisada na Figura 11. O mesmo acontece com a estação S19 no Rio Mondego, a qual apresenta uma concentração de colesterol de $15,00 \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto que o valor médio do estuário corresponde a $5,25 \pm 6,52 \mu\text{g g}^{-1}$.

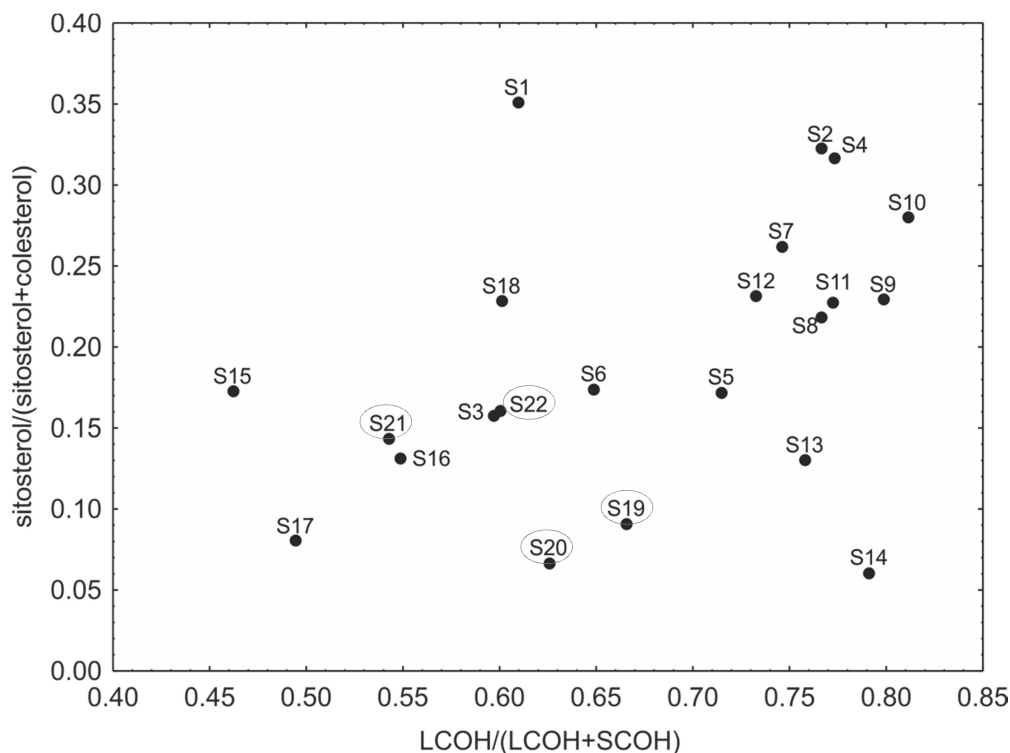


Figura 11. Razão entre sitosterol/(sitosterol+colesterol) para LCOH/(LCOH+SCOH).

A presença de quatro triterpenoides de origem terrestre (lupeol, β -taraxerol, β -amirina e α -amirina) em todas as estações mostra a presença de MO terrestre, o que sugere de igual forma que os indicativos mencionados anteriormente que a MO presente nos estuários tem uma forte influência continental.

Uma vez estabelecido a fonte da MO como terrestre, é possível tentar identificar a origem desse material baseando-se em diferentes análises (Costa et al., 2010).

Observam-se na Figura 12 as porcentagens relativas de cada LCOH, mostrando os diferentes perfis da Ria de Aveiro e do Rio Mondego. Na Ria de Aveiro o *n*-álcool predominante foi o C₂₆OH, seguido do C₂₄OH e C₂₂OH. Em quanto que, no Rio Mondego, o *n*-álcool predominante foi o C₂₂OH, seguido do C₂₄OH e C₂₆OH. Os LCOH C₂₂OH e C₂₄OH estão presentes nas ceras epicuticulares das folhas de plantas terrestres, onde são utilizados para reduzir a evaporação da água (Eglinton & Hamilton, 1967). Um estudo no Conwy Estuary no Reino Unido reporta também valores altos dos *n*-álcoois C₂₂OH, C₂₄OH e C₂₆OH. Os autores relacionam também a presença desses nas ceras de plantas superiores (Mudge & Norris, 1997).

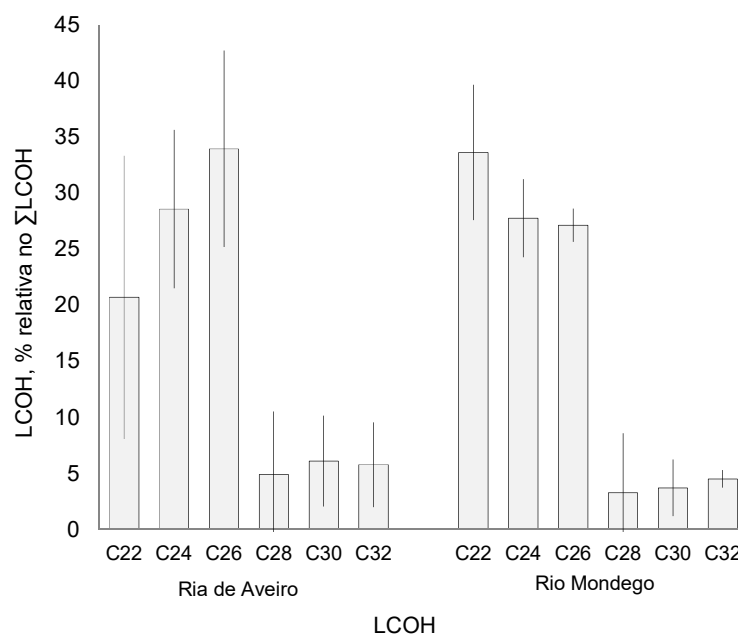


Figura 12. Porcentagem relativa dos álcoois de cadeia longa na Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Por outro lado, os esteróis têm sido agrupados por o número de carbono presente em cada biomarcador, assignando a cada um uma fonte principal de MO. Assim, o esterol C₂₇ predominante em dinoflagelados, diatomáceas, zooplâncton e fauna bentônica (Volkman, 1986, Barrett et al., 1995); o C₂₈ no fitoplâncton (Volkman, 1986); e o C₂₉

em plantas vasculares e certas cianobactérias epibentônicas, também em espécies fitoplanctônicas em quantidades significantes (Volkman et al., 1981, Jaffé et al., 1995). Baseando-se nessa informação, é possível analisar o somatório de esteróis baseado no seu número de carbono para tentar estabelecer a origem da MO presente nos estuários em estudo.

Os esteróis insaturados C_{27} identificados nas amostras foram o colesterol e o diidrocolesterol; os C_{28} , o campesterol e brassicasterol; e os C_{29} , o sitosterol e o estigmasterol. Usando essa separação e somatório foi construído a Figura 13, a qual relaciona a proporção dos esteróis C_{27} , C_{28} e C_{29} em todas as estações nos estuários. Um ponto importante nesse tipo de análise, é que, pode ser estabelecida a origem da MO de forma individual nas estações no local estudado.

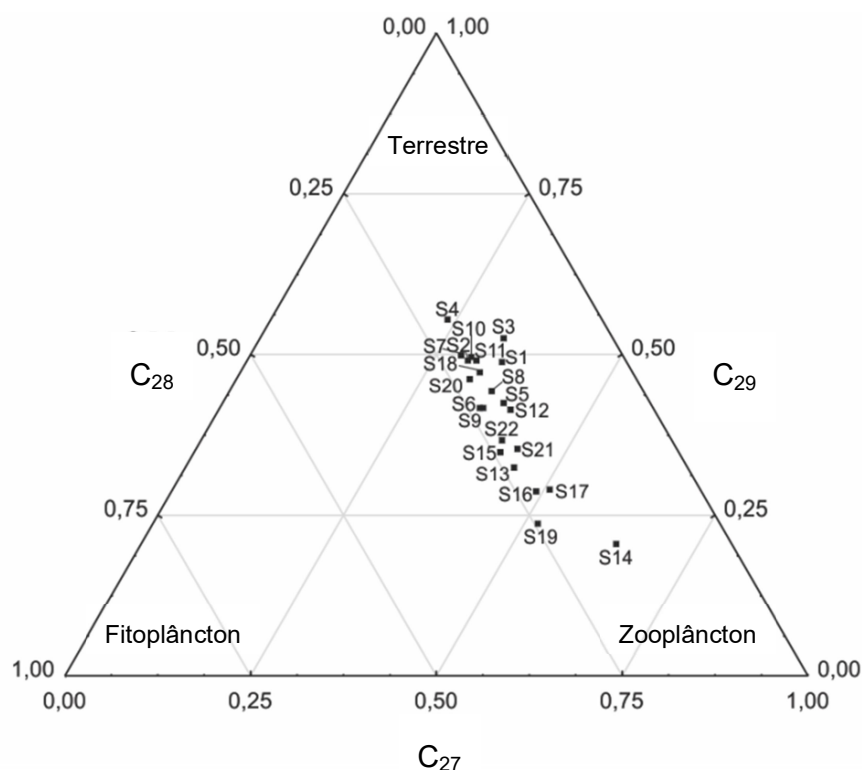


Figura 13. Gráfico ternário relacionando os esteróis C_{27} , C_{28} e C_{29} nas estações.

Uma tendência mostrada em todas as estações (Figura 13) nota-se no vórtice C_{28} , no qual esse esterol representa aproximadamente o 25 %

ou menos em todos os casos. Assim, esse marcador do fitoplâncton não representa em nenhuma das estações um aporte principal. No caso do C_{27} e C_{29} , as amostras apresentaram diferentes distribuições. Esses esteróis variam inversamente, assim, na medida em que a proporção de um vai aumentando o outro vai diminuindo (mantendo o C_{28} em ~25 %), tendo extremos na estação S19, na qual o C_{27} representa aproximadamente o 50 % da composição e o C_{29} o 25 %; e na estação S4, na qual o C_{29} representa aproximadamente um 50 % da composição e o C_{27} o 25 % restante.

A estação S14 tem um perfil um pouco diferente das outras estações, onde o C_{27} representa aproximadamente 70 % da composição e o C_{29} e C_{28} um 15 e 15 %.

Como foi mencionado no Capítulo 3 a salinidade é menor no canal de Mira e no Canal de Ílhavo (estações S15, S16 e S17) pelo se esperaria um aporte maior de C_{29} , mas, observa-se que o C_{27} é o esterol predominante, o qual representa principalmente o zooplâncton e fauna bentônica. As estações S15, S16 e S17 foram também as estações com menores valores da razão $LCOH/(LCOH+SCOH)$. En quanto que a estação S18 (também presente no canal de Ílhavo) apresenta uma razão $LCOH/(LCOH+SCOH)$ e $sitosterol/(sitosterol+colesterol)$ maior, assim como uma maior contribuição de esteróis C_{29} . Esse comportamento pode ser devido à entrada do Rio Boco que tem uma maior influência sobre essa estação. De igual forma, o C_{27} é predominante nas estações S13 e S14 localizadas também na zona sul da lagoa Ria de Aveiro (Porto de Aveiro). Já a estação S12 apresentou aportes significativos de C_{29} . No entanto, observando os aportes de triterpenoides nesses locais (Tabela 17, Anexo II), nota-se que as estações S14 e S13 apresentam conteúdos maiores de triterpenoides do que a estações S12, o que dificulta a determinação da origem de MO nesses locais. Observa-se que nas estações S21 e S22 no estuário Rio Mondego o C_{27} também é o esterol dominante. Estas estações correspondem à zona sul do estuário, enquanto que a estação S19 a zona norte. Esses valores aproximam-se ao perfil observado na Figura 11, onde as estações do Rio Mondego são,

depois das estações no canal de Mira e canal de Ílhavo, os que apresentam menores porcentagens relativas de LCOH.

Como foi mencionado anteriormente, os esteróis C_{29} são predominantes em plantas vasculares, certas cianobactérias epibentônicas e em espécies fitoplanctônicas. Aas estações S1, S2 e S3 no canal de Ovar/São Jacinto mostraram predominância desse esterol. Esse comportamento segue o perfil observado na Figura 11. Nas estações S4, S10 e S7 no Largo do Laranjo, a estação S11 na bacia de Vouga e S20 (braço sul do Rio Mondego) o C_{29} também é predominante. Essas estações são aquelas que apresentaram aportes altos de LCOH e de sitosterol (Figura 11), e maiores porcentagens relativos de triterpenoides (Tabela 22), o que confirma o aporte predominante de MO continental. As estações S5, S6 e S8 mostram proporções parecidas de C_{27} e C_{29} . Observa-se que estas estações localizam-se na parte central da Figura 11. No entanto, esses locais apresentam altas porcentagens relativas de triterpenoides, e maior porcentagem de LCOH do que SCOH, assim como uma diminuição da salinidade pelo que é possível estabelecer a forte influência de material terrestre, embora os locais tenham também aporte de MO de origem marinho.

Observando a distribuição dos esteróis presentes nos estuários é possível analisar alguns fatores como o grau de degradação da MO presente nos sistemas. Assim, a razão de estanois/esteróis pode ser utilizada como uma medida da redução diagenética. Valores altos mostram uma alta redução nos sedimentos. Por exemplo, a razão colestanol/colesterol apresenta valores comuns entre 0,1 e 0,5. Razões maiores desse limite indicam um alto nível de degradação devido aos estágios (Lajat et al., 1990, Canuel & Martens, 1993). A relação entre os estanois sitostanol e o colestanol e seus análogos insaturados são mostrados na Figura 14. Usando a faixa anterior, observa-se que existe uma degradação dos compostos, mais não muito elevada, observando-se que os estanois não representam uma contribuição maior do que os esteróis. No entanto, a estação S1 mostrou que a proporção de estanois foi ligeiramente maior do que os esteróis insaturados.

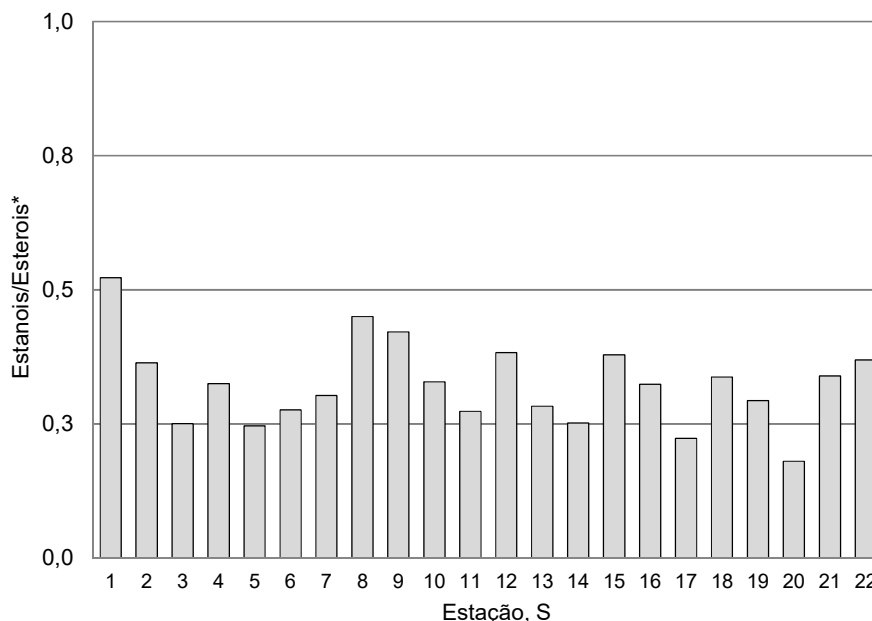


Figura 14. Gráfico de estanois versus esteróis. *Estanois: sitostanol+colestanol e Esteróis: sitosterol+colesterol.

6.4. Aporte de MO de origem fecal

Foram identificados nas amostras três esteróis traçadores de esgoto na matéria orgânica: coprostanol, epicoprostanol e etilcoprostanol. Estudos anteriores mostram que esses 5β -estanois usualmente representam o 50 % (até 60 % em poucos casos) dos esteróis de esgoto (Quemeneur & Marty, 1992).

O coprostanol (5β -colestano- 3β -ol) é formado no intestino humano por bactérias. Esse pode ser usado para traçar fezes de humanos e outros mamíferos em ambientes marinhos (Mudge & Seguel, 1999) e é o principal indicador de contaminação por esgoto (Mudge & Duce, 2005).

A concentração de coprostanol (Tabela 14) na superfície dos sedimentos da Ria de Aveiro variou de $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ (S17) a $11,51 \mu\text{g g}^{-1}$ (S8), com valor médio de $1,26 \pm 2,71 \mu\text{g g}^{-1}$. A variação no Rio Mondego foi de $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ (S21) a $16,62 \mu\text{g g}^{-1}$ (S19) e valor médio de coprostanol de $4,38 \pm 8,16 \mu\text{g g}^{-1}$. A estação S19 no Rio Mondego apresentou uma

concentração de coprostanol muito maior do que as outras estações do rio S20, S21 e S22, com valores de 0,30, 0,15 e 0,44 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

A concentração de coprostanol foi maior nas estações S8 (11,52), S9 (3,85), S10 (1,10) e S14 (1,64). As estações S6 (0,71) e S16 (0,65), S5 (0,61) e S4 (0,57) mostram níveis significativos de contaminação por esgoto, mais em menor proporção do que as estações anteriormente mencionadas. No Rio Mondego teve um pico de concentração de coprostanol na estação S19.

A Figura 15 mostra o mapa com a posição das estações de amostragem na Ria de Aveiro e Rio Mondego, como também, as concentrações de coprostanol representada por cores. A faixa entre 0,05 e 0,71 $\mu\text{g g}^{-1}$ representa-se com cor azul e entre 1,10 e 1,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ com cor verde. A cor laranja representa a concentração de 3,85 $\mu\text{g g}^{-1}$ e a faixa entre 11,5 e 16,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ representa-se com cor vermelha. Observa-se no mapa que, os sedimentos da área de Largo do Laranjo apresentaram níveis maiores de contaminação S8, S9, S10, S6 (menor proporção). A estação S14 (verde) representa o ponto de amostragem de Cais dos Bacalhoeiros, Porto de Aveiro. A estação S19 (vermelho) localiza-se na Marina da Figueira da Foz. A zona norte da Ria de Aveiro, estações S1, S2 e S3 apresentam níveis baixos de concentração de coprostanol em comparação com as outras estações, apresentando um comportamento similar na zona sul do Local.

Para analisar a distribuição da concentração de coprostanol nas diferentes estações, deve ser levado em conta que, os pontos de amostragens podem ter diferentes taxas de precipitação dos compostos dissolvidos na água e do material lipídico nos sedimentos, devido, por exemplo, a influência da corrente marinha (para uma análise mais detalhada da corrente na Ria de Aveiro pode-se consultar o estudo de Lopes et., al (2005)). Uma forma evitar esse tipo de influência na análise dos dados consegue-se analisando a porcentagem relativa do coprostanol na concentração total de esteróis. Lembrando que a concentração total dos esteróis inclui os esteróis de origem natural.

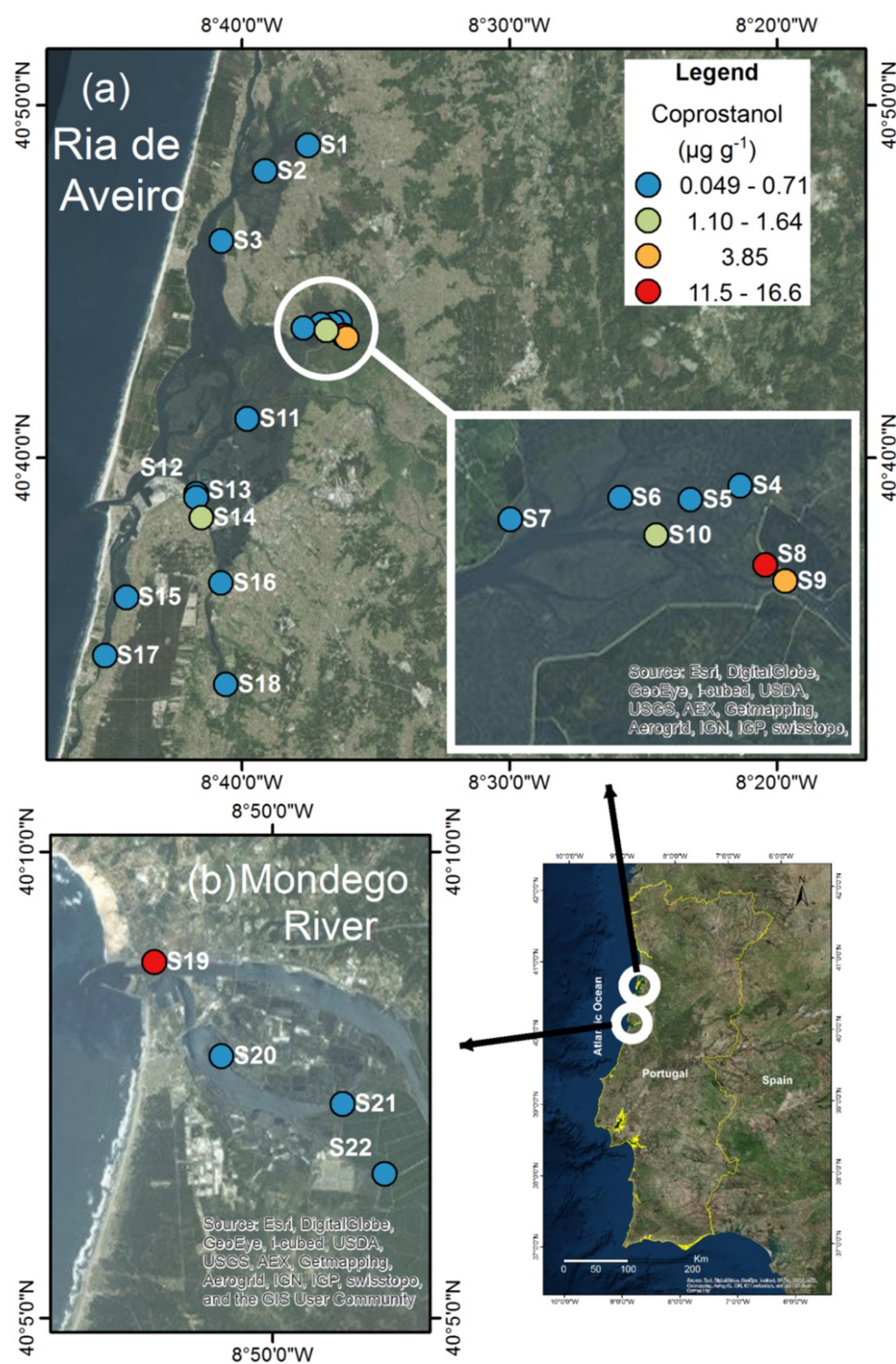


Figura 15. Mapa da Ria de Aveiro e Rio Mondego mostrando as concentrações de coprostanol nas estações S1-S22.

Na média, o coprostanol representa na Ria de Aveiro uma percentagem relativa na concentração total de esteróis de $6,9 \pm 7,0 \%$ e

9,5 ± 12,3 % no Rio Mondego. As estações S8, S9 e S19 mostraram níveis maiores das médias, com valores de 29,1 e 20,8 %, respectivamente (Ria de Aveiro) e 27,9 % (Rio Mondego). Esses dados sugerem contaminação por esgoto nessas estações. Observa-se que, se bem as estações S6, S14 e S16 apresentam níveis altos de concentração de coprostanol, a percentagem relativa do coprostanol na concentração total de esteróis encontra-se por embaixo da média com valores de 5,6, 5,7 e 6,3 %, respectivamente.

O etilcoprostanol (24-etil-5 β -colestano-3 β -ol) apresentou concentrações menores do que o coprostanol. Esse teve uma faixa entre <LQ e 4,27 μ g g⁻¹ na Ria de Aveiro e entre <LQ e 5,01 μ g g⁻¹ no Rio Mondego. A percentagem relativa desse esteroide no somatório de esteróis foi de 3,24 ± 3,10 % na Ria de Aveiro e de 3,74 ± 3,44 % no Rio Mondego.

O epicoprostanol (5 β -colestano-3 α -ol) foi o esteroide fecal menos abundante na região. Esse esteroide é um isômero do coprostanol e pode ser usado como indicador do nível de tratamento ou idade da matéria orgânica fecal, ao ser esse formado durante o tratamento de água residual e lamas de depuração. Assim, esse se encontra presente somente em descargas de esgoto tratado ou amostras antigas (McCalley et al., 1981). A razão epicoprostanol/coprostanol para coprostanol/colesterol pode ser usada para indicar o nível de tratamento ou a idade do sistema. No entanto, esse esteroide esteve embaixo do LQ na maioria das estações pelo que essa razão não será considerada no presente estudo como indicador de esgoto da MO. A concentração do epicoprostanol variou entre 0,02 ± 0,04 μ g g⁻¹, variando de <LQ a 0,14 μ g g⁻¹ na Ria de Aveiro e reportou valores <LQ nas estações do Rio Mondego.

A percentagem relativa de β -estanois no somatório total de esteróis tem uma média de 11 % e um máximo na estação S8 (40 %). As estações S9 e S19 apresentam da mesma forma valores elevados de percentagem com 30 e 33 %, respectivamente.

Outros esteróis que podem ser encontrados nas fezes são o colesterol, colestanol e o sitosterol. Lembrando que, geralmente, considera-se que o colesterol é derivado de tecidos de crustáceos (por exemplo, zooplâncton e caranguejos), assim como suas pelotas fecais (Bergmann, 1949). Esses esteróis serão usados na análise do aporte de MO de origem fecal no presente estudo. Na análise da contribuição de esgoto na MO existem vários critérios diferentes autores usam critérios relativos aos seus dados de coprostanol determinados em um sistema aquático (Martins et al., 2010, Carreira et al., 2011). Assim, ao estabelecer a concentração de coprostanol com alta, média ou baixa a definição é comparativa entre as diferentes concentrações determinadas num sistema, assim como as obtidas em estudos anteriores do mesmo sistema ou de sistemas com ambientes parecidos ao local de estudo. O mesmo acontece com a abundância relativa do coprostanol e β -estanois no somatório total de esteróis onde, não existe uma única faixa estabelecida, embora autores sugiram alguns valores.

Se bem alguns índices não tem um limite definido para estabelecer se um sistema apresenta contaminação por esgoto, ao se relacionar vários esteróis biomarcadores é possível analisar comportamentos sugestivos de contaminação por água residual. Uma relação que tem sido usada é a concentração de coprostanol com a razão coprostanol/(colesterol+colestanol) (Chan et al., 1998). A redução *in situ* do colesterol por bactérias anaeróbicas pode conduzir a formação do colestanol, um isômero do coprostanol (Chan et al., 1998).

Indicativos mais precisos conseguem-se analisando algumas razões dos esteróis fecais, as quais permitem a identificação de contaminação por esgoto em ambientes aquáticos. Por exemplo, a razão coprostanol/colesterol é considerada com um indicativo efetivo de contaminação crônica por esgoto (razões maiores de um) (Quemeneur & Marty, 1992, Quéméneur & Marty, 1994, Takada & Eganhouse, 1998). Esse foi o caso das estações S8 (2,0) e S9 (1,25) na Ria de Aveiro e S19 (1,11) no Rio Mondego (Tabela 14). Da mesma forma que a análise de concentração total de esteróis e a porcentagem relativa de coprostanol,

esse resultado sugere contaminação por esgoto nas estações S8, S9 e S19. Estudos anteriores sugerem que valores de coprostanol/colesterol maiores de 0,2 indica contaminação fecal (Grimalt et al., 1990). Observa-se que, as estações S1, S2, S4, S5, S6, S7, S11 e S16 mostram também contaminação por esgoto, mas em níveis menores. As outras estações não mostram níveis de contaminação significativa (menor de 0,2).

Outra análise que pode ser feita na caracterização de MO de origem fecal é a razão $5\beta/(5\beta+5\alpha)$ estanois. Um valor $<0,3$ dessa é normalmente reportado como não contaminação. Valores $>0,7$ são reportados como contaminados por esgotos (Grimalt et al., 1990). Considerando essas faixas, as estações S2, S3, S11, S12, S13, S15, S17, S18, S21, S22 não mostram índices de contaminação por esgoto com valores iguais o inferiores de 0,3 (Tabela 4). As estações S8, S9 (0,69 aproximado) e S19 apresentam o mesmo comportamento do que a razão coprostanol/colesterol+coletanol, indicando alta contaminação por esgoto. As demais estações tiveram valores entre 0,3 e 0,7.

Uma razão entre esteróis muito utilizada é a razão coprostanol/colesterol (Jeng & Han, 1994, Mudge & Seguel, 1999). Para este indicador, um valor da razão maior de um indica a presença significativa de MO proveniente de esgoto. Essa razão teve uma correlação com o índice $5\beta/(5\beta+5\alpha)$ estanois (r^2 : 0,75). Onde, as estações S8, S9 e S19 são suspeitas de contaminação por MO de origem fecal.

Outro índice que pode ser analisado corresponde à razão etilcoprostanol para sitosterol. Valores ≥ 1 são considerados como contaminação de água residual (Quemeneur & Marty, 1992). As estações que superaram esse limite foram as estações S8, S9, S16, S19 e S20.




Tabela 4. Razões entre a concentração de alguns esteróis como indicadores de fonte de MO fecal: coprostanol, epicoprostanol, etilcoprostanol, colesterol e colestanol.

Estação	β -estanois/ Σ esteróis (%)	Coprostanol/ Σ esteróis (%)	Coprostanol/ Colesterol	(5β / $5\beta+5\alpha$)*	Etilcoprostanol/ sitosterol
Ria de Aveiro					
S1	8,57	4,66	0,31	0,31	0,44
S2	4,28	3,65	0,23	0,30	0,04
S3	8,16	3,00	0,14	0,27	0,84
S4	10,48	6,28	0,41	0,43	0,58
S5	10,28	6,13	0,24	0,46	0,76
S6	9,45	5,62	0,24	0,42	0,76
S7	10,08	5,88	0,35	0,46	0,69
S8	39,91	29,10	2,04	0,76	2,71
S9	30,40	20,83	1,25	0,69	1,93
S10	13,73	8,69	0,52	0,53	0,76
S11	5,30	2,67	0,13	0,27	0,43
S12	3,44	3,17	0,12	0,22	0,01
S13	4,31	4,11	0,13	0,30	0,01
S14	7,66	5,65	0,13	0,33	0,68
S15	3,19	2,09	0,10	0,18	0,01
S16	13,74	9,27	0,35	0,52	1,10
S17	2,32	1,38	0,06	0,20	0,01
S18	3,28	2,53	0,18	0,29	0,01
Rio Mondego					
S19	36,30	27,88	1,11	0,78	3,32
S21	7,25	2,30	0,09	0,18	0,01
S20	2,50	3,84	0,19	0,36	2,23
S22	7,33	4,14	0,16	0,27	0,64

*(5β / $5\beta+5\alpha$): Coprostanol/(coprostanol+colestanol).

Uma forma de conseguir a visualização pratica e conjunta da avaliação da influência de MO de origem fecal em cada estação através dos índices usados no presente estudo, realizou-se com a construção de um gráfico que apresenta o nível de contaminação por esgoto como valores baixo (verde), médio (amarelo) ou alto (vermelho) representados por cores. Os índices que foram levados em conta foram: a concentração de coprostanol, porcentagem relativa de coprostanol e de β -estanois, assim como as razões entre esteróis coprostanol/colestanol, $5\beta/(5\beta+5\alpha)$ e 24-etilcoprostanol/sitosterol. A Tabela 5 apresenta os critérios que foram usados em cada caso.

Tabela 5. Critérios que foram tidos em cada índice de aporte de esgoto.

N	Índice	Critério			Referência
		Baixo, 	Médio, 	Alto, 	
1	Coprostanol, $\mu\text{g g}^{-1}$	<0,7	0,7 – <3,8	$\geq 3,8$	—
2	Coprostanol/ Σ esteróis, %	<5	5 – <20	≥ 20	(Takada & Eganhouse, 1998)
3	Coprostanol/Colesterol	<0,2	0,2 – <1	≥ 1	(Quemeneur & Marty, 1992, Quemeneur & Marty, 1994, Takada & Eganhouse, 1998)
4	$5\beta/(5\beta+5\alpha)$	<0,3	0,3 – <0,7	$\geq 0,7$	(Grimalt et al., 1990)
5	24-etilcoprostanol/Sitosterol	<0,5	0,5 – <1	≥ 1	(Grimalt et al., 1990, Quemeneur & Marty, 1992)
6	5β -estanois/ Σ esteróis, %	<10	10 – <30	≥ 30	(Quemeneur & Marty, 1992)





































































































































Estação	1	2	3	4	5	6	Estação	1	2	3	4	5	6
S1							S12						
S2							S13						
S3							S14						
S4							S15						
S5							S16						
S6							S17						
S7							S18						
S8							S19						
S9							S20						
S10							S21						
S11							S22						

Figura 16. Resumo dos níveis de contaminação representado por cores das diferentes estações baseados nos índices (1) concentração de coprostanol, (2) porcentagem relativa de coprostanol e de (6) β -estanois, assim como as razões entre esteróis (3) coprostanol/colestanol, (4) $5\beta/(5\beta+5\alpha)$ e (5) 24-etilcoprostanol/sitosterol.

Seguindo os critérios da tabela e a figura anterior, observa-se que as estações S2, S3, S11, S12, S13, S15, S17, S18, S20, S21 e S22 não apresentam valores significativos de esteróis fecais e são claramente não contaminadas por MO de origem fecal. A estação S1 na maioria dos casos níveis baixos de contaminação e em dois índices níveis

intermédios. As estações S4, S5, S6, S7, S10 e S16 têm níveis meios de contaminação por esgoto. En quanto que, as estações S8, S9 e S19 apresentam níveis elevados de contaminação por esgoto, já que, todos os índices analisados sugerem um alto aporte de MO de origem fecal.

A Figura 16 permite observar que os critérios relativos tidos em conta no estudo apresentam uma boa relação com os índices de faixas numéricas estabelecidas.

7 Conclusões

O uso dos marcadores moleculares lipídicos esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides permitiu a caracterização do aporte de MO natural e antrópica (fecal) em sedimentos dos ecossistemas aquáticos: Ria de Aveiro e o estuário do Rio Mondego, Portugal.

Existe indicação nos locais de uma contribuição maior de matéria orgânica natural derivada de origem terrestre, como mostra algumas evidências, incluindo:

- Predominância de *n*-álcoois de cadeia longa.
- Maior abundância no somatório de sitosterol, estigmasterol e campesterol sobre outros fitoesteróis.
- Alta concentração de triterpenoides de plantas superiores, como β -amirina e α -amirina.

No entanto, existe uma presença importante de *n*-álcoois e de esteróis de origem natural autóctone nos estuários, como o colesterol, o brassicasterol e os *n*-álcoois de cadeia curta depositados nos sedimentos.

Os esteróis predominantes no fitoplâncton não foram significativos no ambiente, em quanto que, os esteróis de zooplâncton e plantas superiores apresentaram maior dominância.

Os locais com maior aporte de material terrestre foram as estações localizadas no canal Ovar/São Jacinto (S1 e S3), seguido das estações no Largo do Laranjo (S5, S6, S7, S8, S9, S10 e S11), na bacia de Vouga (S11) e no Gala (S20) no Rio Mondego e, finalmente as estações ao sul da Ria de Aveiro nos canais Mira (S15 e S16) e Ílhavo (S17) e nos outros locais no estuário do Rio Mondego.

De forma geral, a matéria orgânica presente nos estuários não apresenta um nível alto de degradação.

O biomarcador β -taraxerol encontra-se presente em sistemas que não apresentam mangues no seu médio.

O estudo da distribuição de esteróis fecal ao longo dos sistemas permite concluir:

- As regiões na Ria de Aveiro e no estuário do Rio Mondego apresentam em algumas áreas de aportes significativos de MO proveniente de descargas de contaminantes antropogênicos, como no Largo Laranjo (S8 e S9), o qual recebe contaminantes; e a Marinha da Figueira da Foz (S19), influenciada por essa atividade.
- Todas as estações localizadas no Largo Laranjo apresentaram níveis significativos de contaminação por esgoto (S5, S6, S7, S8, S9, S10 e S11).
- Embora menos afetadas, as áreas no Porto de Aveiro (S14) e canal de Ílhavo também apresentam índices de aporte de MO de origem fecal.
- A contaminação por substâncias derivadas de efluentes domésticos e industriais tem causado alterações adversas nos ecossistemas costeiros Ria de Aveiro e estuário do Rio Mondego.

ABREU, S. N., et al. Accumulation of Mercury in Sea Bass from a Contaminated Lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 4, 293-297 p, 2000.

ALMEIDA, M. A., M. A. CUNHA & F. ALCÂNTARA. Relationship of bacterioplankton production with primary production and respiration in a shallow estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, 315-328 p, 2005.

AMBIECO. **Estudo da Caracterização da Qualidade Ecológica da Ria de Aveiro**. POLIS LITORAL - Requalificação e Valorização da Orla Costeira. Ria de Aveiro, Portugal, 226 p, 2011.

ANTUNES, P. & O. GIL. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. **Chemosphere**, v. 54, n. 10, 1503-1507 p, 2004.

BAÊTA, A. P. **Caracterização da matéria orgânica sedimentar no sistema de ressurgência de Cabo Frio**. Rio de Janeiro: PUC-Rio, 322 p, 2008.

BARRETT, S. M., et al. Sterols of 14 species of marine diatoms (bacillariophyta). **Journal of Phycology**, v. 31, n. 3, 360-369 p, 1995.

BAUER, J. E., et al. The changing carbon cycle of the coastal ocean. **Nature**, v. 504, n. 7478, p, 2013.

BAYONA, J. M., A. FARRAN & J. ALBAIGÉS. Steroid alcohols and ketones in coastal waters of the western Mediterranean: Sources and seasonal variability. **Marine Chemistry**, v. 27, n. 1-2, 79-104 p, 1989.

BENFENATI, E., et al. A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples. **Chemosphere**, v. 29, n. 7, 1393-1405 p, 1994.

BENNER, R., P. G. HATCHER & J. I. HEDGES. Early diagenesis of mangrove leaves in a tropical estuary: Bulk chemical characterization using solid-state ¹³C NMR and elemental analyses. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, n. 7, 2003-2013 p, 1990.

BERGMANN, W. Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates with special reference to the sterols. **Journal of Marine Research**, v. 8, n. 137-176 p, 1949.

BIANCHI, T., S., J. PENNOCK, R. & R. TWILLEY, R. **Biogeochemistry of Gulf of Mexico Estuaries**. 448 p, 1998.

BIANCHI, T. S. & E. A. CANUEL. **Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems**. Princeton University Press. Oxford, 396 p, 2011.

BIANCHI, T. S., et al. Temporal variability in terrestrially-derived sources of particulate organic carbon in the lower Mississippi River and its upper tributaries. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 71, n. 18, 4425-4437 p, 2007.

BLACKADDER, D. A. & R. M. NEDDERMAN. **Manual de Operações Unitárias**. Editora Hemus. Brasil., 276 p, 2004.

BROOKS, C. J. W., E. C. HORNING & J. S. YOUNG. Characterization of sterols by gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers. **Lipids**, v. 3, n. 5, 391-402 p, 1968.

C.C.D.R.C, C. C. E. D. R. D. C. **Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Mondego**. Análise Biofísica, Coimbra. 252 p, 2000.

CALVERT, S. E. Oceanographic controls on the accumulation of organic matter in marine sediments. **Geological Society, London, Special Publications**., v. 26, n. 137-151 p, 1987.

CANUEL, E. & A. ZIMMERMAN. Composition of particulate organic matter in the southern Chesapeake Bay: Sources and Reactivity. **Estuaries**, v. 22, n. 4, 980-994 p, 1999.

CANUEL, E. A., et al. Climate Change Impacts on the Organic Carbon Cycle at the Land-Ocean Interface. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 40, n. 685–711 p, 2012.

CANUEL, E. A. & C. S. MARTENS. Seasonal variations in the sources and alteration of organic matter associated with recently deposited sediments. **Organic Geochemistry**, v. 20, n. 5, 563- 577 p, 1993.

CARREIRA, R. S. **Investigação sobre o acréscimo da estocagem de carbono em ambientes fertilizados pela ação antropogênica: a Baía de Guanabara como modelo**. Rio de Janeiro. PUC-Rio, p, 2000.

CARREIRA, R. S., et al. Lipid biomarkers in deep sea sediments from the Campos Basin, SE Brazilian continental margin. **Organic Geochemistry**, v. 41, n. 9, 879-884 p, 2010.

CARREIRA, R. S., et al. Lipids in the sedimentary record as markers of the sources and deposition of organic matter in a tropical Brazilian estuarine–lagoon system. **Marine Chemistry**, v. 127, n. 1–4, 1-11 p, 2011.

CARREIRA, R. S., A. L. R. WAGENER & J. W. READMAN. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): Space-time variations. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 60, n. 4, 587-598 p, 2004.

CEIA, F. R., et al. Assessment of estuarine macrobenthic assemblages and ecological quality status at a dredging site in a southern Europe estuary. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, n. 80-92 p, 2013.

CLOERN, J. E., E. A. CANUEL & D. HARRIS. Stable carbon and nitrogen isotope composition of aquatic and terrestrial plants of the San Francisco Bay estuarine system. **Limnology and Oceanography**, v. 47, n. 713-729 p, 2002.

COELHO, J. P., et al. Macroalgae response to a mercury contamination gradient in a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 65, n. 3, 492-500 p, 2005.

COELHO, J. P., et al. Mercury contamination in invertebrate biota in a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 4, 475-480 p, 2007.

COELHO, J. P., et al. Pattern and annual rates of *Scrobicularia plana* mercury bioaccumulation in a human induced mercury gradient (Ria de Aveiro, Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 69, n. 3-4, 629-635 p, 2006.

CORDEIRO, L. G. M. S. **Esteróis como marcadores moleculares da contaminação fecal no sistema estuarino Iguaçu-Sarapuí, noroeste da Baía de Guanabara (RJ)**. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: PUC-Rio, 157 p, 2006.

CORDEIRO, L. G. M. S. **Lipídios como indicadores de processos biogeoquímicos em sedimentos da margem continental do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: UERJ, 141 p, 2011.

COSTA, A. B., et al. Characterization of organic matter in sediment cores of the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil, by elemental analysis and ¹³C NMR. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, 1883-1890 p, 2011.

COSTA, T. F., M. A. ARAUJO & R. S. CARREIRA. Lipids as markers of the sources and distribution of particulate organic matter in a tropical estuarine-lagoon system (mundaú-manguaba, al). **Química Nova**, v. 33, n. 9, 1915-1922 p, 2010.

CROSSLAND, C. J., BAIRD, D., DUCROTOY, J.-P., LINDEBOOM, H.J. The coastal zone: a domain of global interactions, in: Crossland, C.J., Kremer, H.H., Lindeboom, H.J., Crossland, J.I.M., Le Tissier, M.D.A. (Eds.), *Coastal fluxes in the antropocene*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-38. v. n. p, 2005.

CUNHA, M. R., J. C. SORBE & M. H. MOREIRA. Spatial and seasonal changes of brackish peracaridan assemblages and their relation to some environmental variables in two tidal channels of the Ria de Aveiro (NW Portugal). **Inter Research. Marine Ecology Progress Series**, v. 190, n. 69-87 p, 1999.

CHAN, K.-H., et al. Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters. **Water Research**, v. 32, n. 1, 225-235 p, 1998.

CHAPMAN, J. R. **Practical Organic Mass Spectrometry, 2nd Ed.** A guide for chemical and biochemical analysis. Wiley, London, 352 p, 1993.

DE HOFFMANN, E., J. CHARETTE & V. STROOBANT. **Mass Spectrometry, Principles and Applications. 3a Ed.** Wiley, London, 502 p, 2007.

DIAS, J. M., J. LOPES & I. DEKEYSER. Hydrological characterisation of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. **Oceanologica Acta**, v. 22, n. 5, 473-485 p, 1999.

DIAS, J. M., J. F. LOPES & I. DEKEYSER. Tidal propagation in Ria de Aveiro Lagoon, Portugal. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere**, v. 25, n. 4, 369-374 p, 2000.

DOLAN, J. W. & L. R. SNYDER. **Troubleshooting LC Systems**. Humana Press, Clifton, NJ, 515 p, 1989.

EDMOND, J. M., et al. The chemical mass balance in the Amazon plume I: The nutrients. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 28, n. 11, 1339-1374 p, 1981.

EGLINTON, G. & R. J. HAMILTON. Leaf epicuticular waxes. **Science**, v. 156, n. 3780, 1322-1335 p, 1967.

EGLINTON, G., R. J. PARKES & M. ZHAO. Lipid biomarkers in biogeochemistry: Future roles? **Marine Geology**, v. 113, n. 1-2, 141-145 p, 1993.

FASHAM, M. J. R. **Ocean biogeochemistry: The role of the ocean carbon cycle in global change**. Springer, Berlin, 301 p, 2003.

FERNANDES, M. B., et al. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 231, n. 1, 1-16 p, 1999 b.

FIGUEIREDO DA SILVA, J., R. W. DUCK & J. B. CATARINO. Nutrient retention in the sediments and the submerged aquatic vegetation of the coastal lagoon of the Ria de Aveiro, Portugal. **Journal of Sea Research**, v. 62, n. 4, 276-285 p, 2009.

FRENCH, P. W. **Coastal and Estuarine Management**. Paperback, London, Routledge, 268 p, 1997.

FUKUSHIMA, K. & R. ISHIWATARI. Acid and alcohol compositions of wax esters in sediments from different environments. **Chemical Geology**, v. 47, n. 1-2, 41-56 p, 1984.

GAGOSIAN, R. B. & G. E. NIGRELLI. Transport and Budget of Sterols in the Western North-Atlantic Ocean. **Limnology and Oceanography**, v. 24, n. 5, 838-849 p, 1979.

GALLI, G. & S. MARONI. Mass spectrometric investigations of some unsaturated sterols biosynthetically related to cholesterol. **Steroids**, v. 10, n. 3, 189-197 p, 1967.

GAO, W. & S. ENGELL. Estimation of general nonlinear adsorption isotherms from chromatograms. **Computers & Chemical Engineering**, v. 29, n. 10, 2242-2255 p, 2005.

GASKELL, S. J. & G. EGLINTON. Sterols of a contemporary lacustrine sediment. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 40, n. 10, 1221-1228 p, 1976.

GATTUSO, J. P., M. FRANKIGNOULLE & R. WOLLAST. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 405-434 p, 1998.

GESAMP. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. v. n. p, 1993.

GIDDINGS, J. C. **Unified Separation Science**. Wiley & Sons Ltd, New York, NY, 352 p, 1991.

GRIMALT, J. O., et al. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. **Environmental Science & Technology**, v. 24, n. 3, 357-363 p, 1990.

GROB, R. L. & E. F. BARRY. **Modern Practice of Gas Chromatography, 4 Ed.** John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey and Canada, 1064 p, 2004.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, n. 1–2, 129-161 p, 2002.

HARVEY, H. R. Sources and Cycling of Organic Matter in the Marine Water Column. **Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA**, v. 2N, n. 1-25 p, 2006.

HEDGES, J. I. & F. G. PRAHL. Organic geochemistry principles and applications. **Plenum Press.**, v. n. 237-253 p, 1993.

HOBBIE, J. E. **Estuarine Science: a synthetic approach to research and practice**. Island Press. Covelo, 338 p, 2000.

JAFFÉ, R., et al. The biogeochemistry of lipids in rivers of the Orinoco Basin. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 59, n. 21, 4507-4522 p, 1995.

JENG, W.-L. & B.-C. HAN. Sedimentary coprostanol in Kaohsiung Harbour and the Tan-Shui Estuary, Taiwan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, n. 8, 494-499 p, 1994.

JENG, W.-L. & B.-C. HAN. Coprostanol in a Sediment Core from the Anoxic Tan-Shui Estuary, Taiwan. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 42, n. 6, 727-735 p, 1996.

JENG, W.-L. & C.-A. HUH. Lipids in suspended matter and sediments from the East China Sea Shelf. **Organic Geochemistry**, v. 35, n. 5, 647-660 p, 2004.

JENG, W.-L., J. WANG & B.-C. HAN. Coprostanol distribution in marine sediments off southwestern Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 94, n. 1, 47-52 p, 1996.

JENNERJAHN, T. C. & V. ITTEKKOT. Changes in organic matter from surface waters to continental slope sediments off the São Francisco River, eastern Brazil. **Marine Geology**, v. 161, n. 2–4, 129-140 p, 1999.

KILLOPS, S. D. & V. J. KILLOPS. **Introduction to Organic Geochemistry**. Wiley-Blackwell, 408 p, 2013.

KOCH, B. P., et al. Triterpenols in mangrove sediments as a proxy for organic matter derived from the red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Organic Geochemistry**, v. 42, n. 1, 62-73 p, 2011.

LAJAT, M., A. SALIOT & A. SCHIMMELMANN. Proceedings of the 14th International Meeting on Organic Geochemistry Free and bound lipids in recent (1835–1987) sediments from Santa Barbara Basin. **Organic Geochemistry**, v. 16, n. 4, 793-803 p, 1990.

LARUELLE, G. G., H. H. DURR & R. LAUERWALD. Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 17, n. 2029-2051 p, 2013.

LEBLANC, L. A., et al. The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, n. 5, 439-458 p, 1992.

LEBLOND, J. D. & P. J. CHAPMAN. A survey of the sterol composition of the marine dinoflagellates *karenia brevis*, *karenia mikimotoi*, and *karlodinium micrum*: distribution of sterols within other members of the class dinophyceae. **Journal of Phycology**, v. 38, n. 4, 670-682 p, 2002.

LEEuw, J. W., et al. Organic carbon as a palaeoenvironmental indicator in the marine realm. **Special Publication, Geological Society of London**, v. 83, n. 43-71 p, 1995.

LIBES, S. **An introduction to marine biogeochemistry**. J. Wiley & Sons. New York, 289 p, 1992.

LIU, K.-K., et al. Carbon and Nutrient Fluxes in Continental Margins. v. n. 741 p, 2010.

LOPES, J. F. & J. M. DIAS. Residual circulation and sediment distribution in the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. **Journal of Marine Systems**, v. 68, n. 3-4, 507-528 p, 2007.

LOPES, J. F., et al. The water quality of the Ria de Aveiro lagoon, Portugal: From the observations to the implementation of a numerical model. **Marine Environmental Research**, v. 60, n. 5, 594-628 p, 2005.

LOPES, J. F. & C. SILVA. Temporal and spatial distribution of dissolved oxygen in the Ria de Aveiro lagoon. **Ecological Modelling**, v. 197, n. 1-2, 67-88 p, 2006.

LOPES, J. F., C. I. SILVA & A. C. CARDOSO. Validation of a water quality model for the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. **Environmental Modelling & Software**, v. 23, n. 4, 479-494 p, 2008.

MACKENZIE, F. T. & L. M. VER, AND LERMAN, A. **Coupled biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur in the land-ocean-atmosphere system**. Asian Change in the Context of Global Change, 42-100 p, 1998.

MANTAS, V. M., et al. Monitoring estuarine water quality using satellite imagery. The Mondego river estuary (Portugal) as a case study. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, n. 13-21 p, 2013.

MARCHAND, D., et al. Lipids and their oxidation products as biomarkers for carbon cycling in the northwestern Mediterranean Sea: results from a sediment trap study. **Marine Chemistry**, v. 95, n. 1-2, 129 p, 2005.

MARQUES, J. C., P. MARANHÃO & M. A. PARDAL. Human Impact Assessment on the Subtidal Macrobenthic Community Structure in the Mondego Estuary (Western Portugal). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 37, n. 4, 403-419 p, 1993.

MARQUES, S. C., et al. Climate variability and planktonic communities: The effect of an extreme event (severe drought) in a southern European estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 73, n. 3–4, 725-734 p, 2007.

MARTINS, C. C., et al. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, 2137-2143 p, 2010.

MCCAFFREY, M. A., J. W. FARRINGTON & D. J. REPETA. The organic geochemistry of Peru margin surface sediments: II. Paleoenvironmental implications of hydrocarbon and alcohol profiles. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 55, n. 2, 483-498 p, 1991.

MCCALLEY, D. V., M. COOKE & G. NICKLESS. Effect of sewage treatment on faecal sterols. **Water Research**, v. 15, n. 8, 1019-1025 p, 1981.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, 5 Ed. Wiley & Sons, New York, NY., 426 p, 2010.

MEYERS, P. A. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. **Organic Geochemistry**, v. 27, n. 5–6, 213-250 p, 1997.

MEYERS, P. A. Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 2, 261-289 p, 2003.

MORAES, L. D. S. **Extração líquido-líquido de ácido succínico usando contactores com membranas de fibra oca**. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 90 p, 2011.

MOREIRA, M. H., et al. Environmental gradients in a southern Europe estuarine system: Ria de Aveiro, Portugal implications for soft bottom macrofauna colonization. **Netherland Journal of Aquatic Ecology**, v. 27, n. 2-4, 465-482 p, 1993.

MUDGE, S. M. & M. J. BEBIANNO. Sewage contamination following an accidental spillage in the Ria Formosa, Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 3, 163-170 p, 1997.

MUDGE, S. M., et al. Sterols in the Ria Formosa lagoon, Portugal. **Water Research**, v. 33, n. 4, 1038-1048 p, 1999.

MUDGE, S. M. & C. E. DUCE. Identifying the source, transport path and sinks of sewage derived organic matter. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 2, 209-220 p, 2005.

MUDGE, S. M. & D. G. LINTERN. Comparison of Sterol Biomarkers for Sewage with other Measures in Victoria Harbour, B.C., Canada. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 48, n. 1, 27-38 p, 1998.

MUDGE, S. M. & C. E. NORRIS. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. **Marine Chemistry**, v. 57, n. 1–2, 61-84 p, 1997.

MUDGE, S. M. & C. G. SEQUEL. Organic Contamination of San Vicente Bay, Chile. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 11, 1011-1021 p, 1999.

NETO, R. R. & L. A. S. MADUREIRA. Caracterização de biomarcadores nos sedimentos da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, SC. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 12, n. 113-125 p, 2000.

NICHOLS, P. D. & R. B. JOHNS. Lipids of the tropical seagrass *Thalassia hemprichii*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, 81-84 p, 1985.

NICHOLS, P. D., et al. The fatty acid and sterol composition of two marine dinoflagellates. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, 1043-1047 p, 1984.

NISHIMURA, M. & T. KOYAMA. The occurrence of stanols in various living organisms and the behavior of sterols in contemporary sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 41, n. 3, 379-385 p, 1977.

OGURA, K., T. MACHIHARA & H. TAKADA. Diagenesis of biomarkers in Biwa Lake sediments over 1 million years. **Organic Geochemistry**, v. 16, n. 4-6, 805-813 p, 1990.

PEREIRA, M. E., et al. Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 155, n. 1-4, 39-49 p, 2009.

PETERS, K. E., C. C. WALTERS & J. M. MOLDOWAN. **The biomarker guide: biomarkers and isotopes in the environment and human history**. Cambridge University Press., 471 p, 2005.

POCKLINGTON, J. D. R. & N. F. C. LEONARD. Le coprostanol comme indicateur de la contamination fécale dans l'eau de mer et les sédiments marins. **Department of Fisheries and Oceans, Bedford Institute of Oceanography**, v. 10, n. 1, 83-89. p, 1987.

POOLE, C. F. & S. K. POOLE. **Fundamental relationships of chromatography**. Chromatography Today. Amsterdam. 1-103 p, 1991.

QUEMENEUR, M. & Y. MARTY. Sewage influence in a macrotidal estuary: Fatty acid and sterol distributions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, n. 4, 347-363 p, 1992.

QUÉMÉNEUR, M. & Y. MARTY. Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. **Water Research**, v. 28, n. 5, 1217-1226 p, 1994.

RAMALHOSA, E., et al. Accumulation versus remobilization of mercury in sediments of a contaminated lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 3, 353-356 p, 2006.

RAMALHOSA, E., et al. Distribution of mercury in the upper sediments from a polluted area (Ria de Aveiro, Portugal). **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 6, 682-686 p, 2005.

RAMOS, A. M., et al. The River Mondego terraces at the Figueira da Foz coastal area (western central Portugal): Geomorphological and sedimentological characterization of a terrace staircase affected by differential uplift and glacio-eustasy. **Geomorphology**, v. 165-166, n. 107-123 p, 2012.

REUSS, N. & L. POULSEN. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. **Marine Biology**, v. 141, n. 3, 423-434 p, 2002.

ROBBINS, L. A. & R. W. CUSACK. **“Liquid-Liquid Extraction Operations and Equipment”**. Perry, R. H., Green, D. W. (eds), Perry's Chemical Engineers' Handbook, 7 Ed. McGraw-Hill. New York, p, 1999.

RODRIGUES, M., et al. Three-dimensional modeling of the lower trophic levels in the Ria de Aveiro (Portugal). **Ecological Modelling**, v. 220, n. 9–10, 1274-1290 p, 2009.

RONTANI, J.-F., et al. Degradation of sterols and terrigenous organic matter in waters of the Mackenzie Shelf, Canadian Arctic. **Organic Geochemistry**, v. 75, n. 0, 61-73 p, 2014.

RONTANI, J.-F. & J. K. VOLKMAN. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 1, 1-35 p, 2003.

ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. & L. S. PASTOUS MADUREIRA. **O Ambiente Oceanográfico Da Plataforma Continental E Do Talude Na Região Sudeste-Sul Do Brasil**. São Paulo: USP, 472 p, 2006.

SALIOT, A., et al. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. **Marine Chemistry**, v. 36, n. 1–4, 233-248 p, 1991.

SALIOT, A. & L. MÉJANELLE. Marine organic biogeochemistry. **Oceanis**, v. 20, n. 1-2, 1-197 p, 1994.

SALIOT, A. & D. TUSSEAU. Sterols in interstitial waters of marine sediments. **Organic Geochemistry**, v. 7, n. 1, 53-59 p, 1984.

SALOMONS, W., KREMER, H.H., TURNER, R.K. **The catchment to coast continuum**. in: Crossland, C.J., Kremer, H.H., Lindeboom, H.J., Crossland, J.I.M., Le Tissier, M.D.A. (Eds.). Coastal fluxes in the antropocene. Springer-Verlag, Berlin, 146-200 p, 2005.

SARGENT, J. R., R. R. GATTEN & R. MCINTOSH. Wax esters in the marine environment — their occurrence, formation, transformation and ultimate fates. **Marine Chemistry**, v. 5, n. 4–6, 573-584 p, 1977.

SCHEFUß, E., et al. Lipid biomarkers as major source and preservation indicators in SE Atlantic surface sediments. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 51, n. 9, 1199-1228 p, 2004.

SEVERO, J. J. B. **Avaliação de Técnicas de Planejamento de Experimentos no Reconhecimento do Equilíbrio de Adsorção em Sistemas Cromatográficos**. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 291 p, 2011.

SIERE, M. A., et al. Aquatic distribution of 4-desmethyl sterols in the Chang Jiang Estuary, China. **Marine Chemistry**, v. 42, n. 1, 11-24 p, 1993.

SOHN MARY, L. Organic Marine Geochemistry. **Organic Marine Geochemistry**, v. 305, n. 305, 1-8 p, 1986.

SUN, M.-Y., et al. Impact of seasonal hypoxia on diagenesis of phytol and its derivatives in Long Island Sound. **Marine Chemistry**, v. 62, n. 1-2, 157-173 p, 1998.

TAKADA, H. & R. P. EGANHOUSE. **Molecular markers of anthropogenic waste**. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation. New York, John Wiley & Sons., 2883-2940. p, 1998.

THOUMELIN, G., L. BODINEAU & M. WARTEL. Origin and transport of organic matter across the Seine estuary: Fatty acid and sterol variations. **Marine Chemistry**, v. 58, n. 1-2, 59-71 p, 1997.

TOLOSA, I., et al. Distribution of sterol and fatty alcohol biomarkers in particulate matter from the frontal structure of the Alboran Sea (S.W. Mediterranean Sea). **Marine Chemistry**, v. 82, n. 3-4, 161-183 p, 2003.

VALENTIM, J. M., et al. Tagus estuary and Ria de Aveiro salt marsh dynamics and the impact of sea level rise. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 130, n. 0, 138-151 p, 2013.

VAZ, N., et al. Horizontal patterns of water temperature and salinity in an estuarine tidal channel: Ria de Aveiro. **Ocean Dynamics**, v. 55, n. 5-6, 416-429 p, 2005.

VENKATESAN, M. I. & I. R. KAPLAN. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica basin, southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 24, n. 2, 208-214 p, 1990.

VENN, R. F. **Principles and practice of bioanalysis**. 2 Ed. Taylor & Francis, London, UK., 340 p, 2008.

VER, L. M. B., F. T. MACKENZIE & A. LERMAN. Carbon cycle in the coastal zone: effects of global perturbations and change in the past three centuries. **Chemical Geology**, v. 159, n. 1-4, 283-304 p, 1999.

VOLKMAN, J. Sterols in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, 495-506 p, 2003.

VOLKMAN, J. K. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 9, n. 2, 83-99 p, 1986.

VOLKMAN, J. K. **Lipid markers for marine organic matter**. Handbook of Environmental Chemistry. Reactions and Processes 2 (N). Berlin: Springer, 27-70 p, 2006.

VOLKMAN, J. K., et al. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. **Organic Geochemistry**, v. 29, n. 5-7, 1163-1179 p, 1998.

VOLKMAN, J. K., et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 128, n. 3, 219-240 p, 1989.

VOLKMAN, J. K., et al. Sources of organic matter in sediments from the Ord River in tropical northern Australia. **Organic Geochemistry**, v. 38, n. 7, 1039-1060 p, 2007.

VOLKMAN, J. K., et al. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 61, n. 02, 509-527 p, 1981.

WAKEHAM, S. & E. CANUEL. Degradation and Preservation of Organic Matter in Marine Sediments. **Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA**, v. 2N, n. 295-321 p, 2006.

WAKEHAM, S. G., et al. Lipid biomarker fluxes in the Arabian Sea, with a comparison to the equatorial Pacific Ocean. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 49, n. 12, 2265-2301 p, 2002.

WEN-YEN, H. & W. G. MEINSCHEN. Sterols as source indicators of organic materials in sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 40, n. 3, 323-330 p, 1976.

WETZ, M. S. & D. W. YOSKOWITZ. An 'extreme' future for estuaries? Effects of extreme climatic events on estuarine water quality and ecology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, n. 1-2, 7-18 p, 2013.

WETZEL, R. G. Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 33, n. 83-89 p, 1995.

WILFRIED, M. A. N. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 3 Ed.** CRC Press. Taylor and Francis Group, LLC. USA., 632 p, 2006.

XU, Y. & R. JAFFÉ. Lipid biomarkers in suspended particles from a subtropical estuary: Assessment of seasonal changes in sources and transport of organic matter. **Marine Environmental Research**, v. 64, n. 5, 666-678 p, 2007.

YOSHINAGA, M. Y., P. Y. G. SUMIDA & S. G. WAKEHAM. Lipid biomarkers in surface sediments from an unusual coastal upwelling area from the SW Atlantic Ocean. **Organic Geochemistry**, v. 39, n. 10, 1385-1399 p, 2008.

ZIMMERMAN, A. R. & E. A. CANUEL. Sediment geochemical records of eutrophication in the mesohaline Chesapeake Bay. **Limnology and Oceanography**, v. 47, n. 4, 1084-1093. p, 2002.

9

Anexo I: Metodologia detalhada

O Anexo I corresponde à metodologia detalhada usada na presente pesquisa, para a separação, identificação e quantificação de esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides biomarcadores da MO; e análise de lipídios totais extraíveis. No final deste capítulo apresentam-se os materiais, solventes e reagentes utilizados durante o desenvolvimento da metodologia, assim como o tratamento e descontaminação de alguns desses. Nesta parte do capítulo encontram-se também os equipamentos utilizados e as suas especificações.

Todas as amostras analisadas no presente trabalho seguiram a mesma metodologia nas diferentes etapas analíticas, incluindo os brancos.

9.1.

Preparação da amostra

Após a coleta, os sedimentos foram liofilizados, peneirado para <1mm, homogeneizada e congelado (-20 °C) embrulhados em papel alumínio. A fração fina de sedimentos foi determinada por gravimetria por peneiramento úmido seco sedimentos através de uma peneira de 63 mm.

No processo de secagem as amostras foram liofilizadas. Uma fina camada de sedimento semi-descongelado foi aplicada nas paredes de tubos de vidro descontaminados, e o conjunto mergulhado em uma mistura de gelo seco e acetona para rápido congelamento. Em seguida, os tubos foram acoplados ao aparelho e a liofilização prosseguiu durante 18 a 24 horas, dependendo da umidade da amostra e da camada de sedimento aplicada. Ao longo do processo os sedimentos eram novamente congelados na mistura gelo seco/acetona. A liofilização prosseguia até obtenção de peso constante.

Após a liofilização, os sedimentos foram macerados em grau e pistilo de ágata até passarem em peneira de 0,88 μm de malha. As amostras peneiradas foram guardadas em frascos secos de vidro âmbar e mantidas ao abrigo da luz.

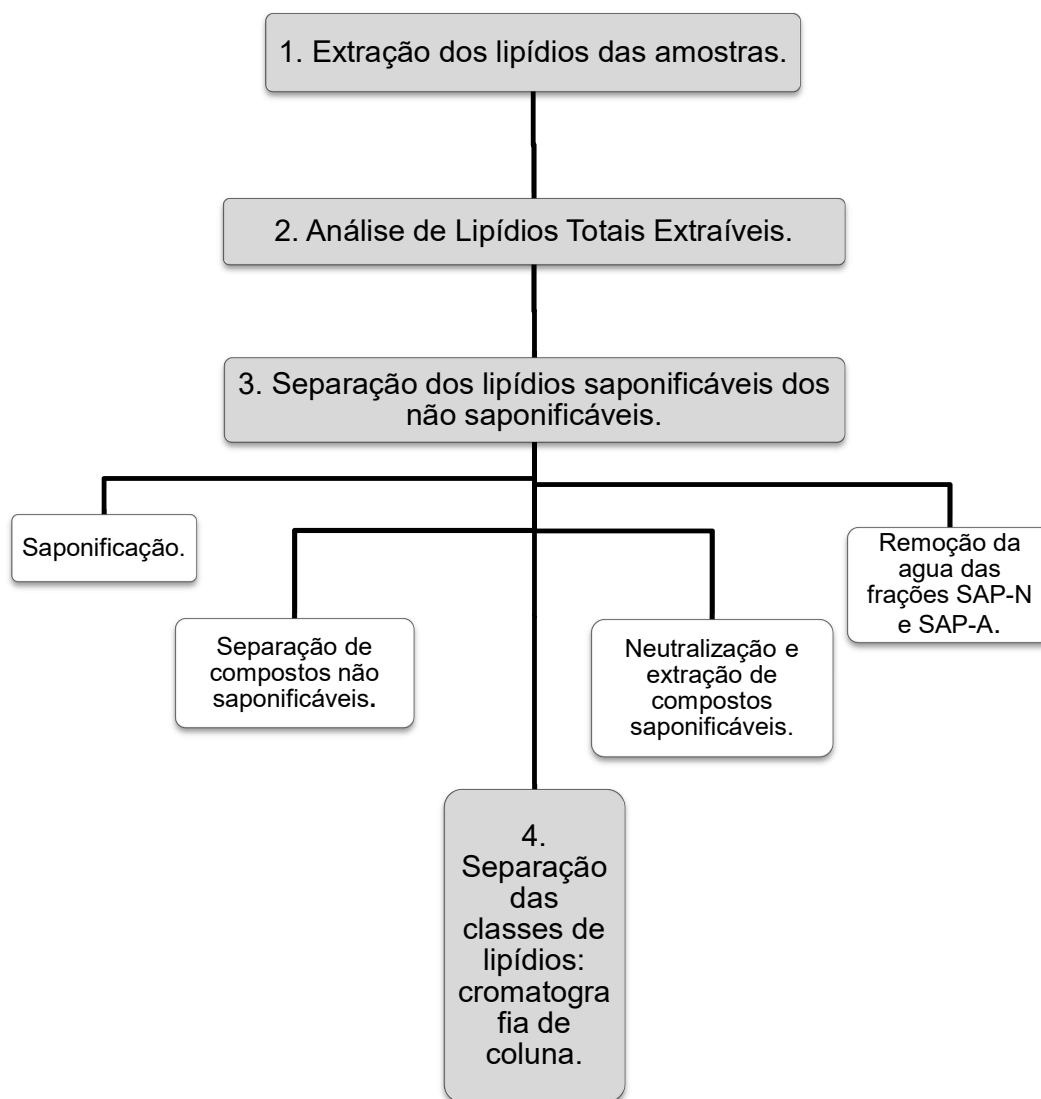
9.2.

Tratamento de amostras

Esta parte da metodologia descreve as etapas experimentais desde a extração de lipídios do sedimento até a injeção das mesmas no GC-MS. O Esquema apresenta as etapas principais desta parte da metodologia.

Prévio ao tratamento das amostras foi realizado um Teste de Recuperação Preliminar, escolhendo uma amostra com uma porcentagem alta de carbono orgânico para realizar o teste, que no caso a amostra escolhida foi S1. Desta amostra foram pesadas quatro quantidades de sedimento: uma de 5 gramas e três de 3 gramas. Estas amostras foram identificadas como S1-1, S1-2, S1-3 e S1-4, respectivamente. Estas seguiram todas as etapas descritas neste capítulo prévio a análise das outras amostras. Após análise dos resultados das replicas continuou-se com o tratamento das outras amostras.

Para quantificar os teores de COT e nitrogênio total (NT) 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, descarbonatadas (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 NT = 10,52% p.s) sendo aceitos somente valores de $r=0,99$ ou superiores. 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.



Esquema. Etapas do tratamento das amostras.

9.2.1.

Extração dos lipídios das amostras

Os lipídios presentes nas amostras foram extraídos do sedimento com solventes orgânicos, usando o equipamento *Accelerated Solvent Extractions*, ASE-200 da seguinte forma:

Após secagem, foram pesados (precisão de $\pm 0,1$ mg) aproximadamente quatro gramas do sedimento na microbalança. Cada

amostra foi colocada entre dois filtros de acetato-celulosa e embaixo de uma peça de acero dentro das células do ASE. Os padrões subrogados foram adicionados nas células junto com as amostras para acompanhá-las desde esta etapa analítica (Figura 17). A porcentagem de recuperação será calculada a partir deste ponto da metodologia. Os padrões subrogados utilizados foram Androstanol (esterol), 1-nonadecanoato (acido graxo) e 1-nonadecanol (álcool).

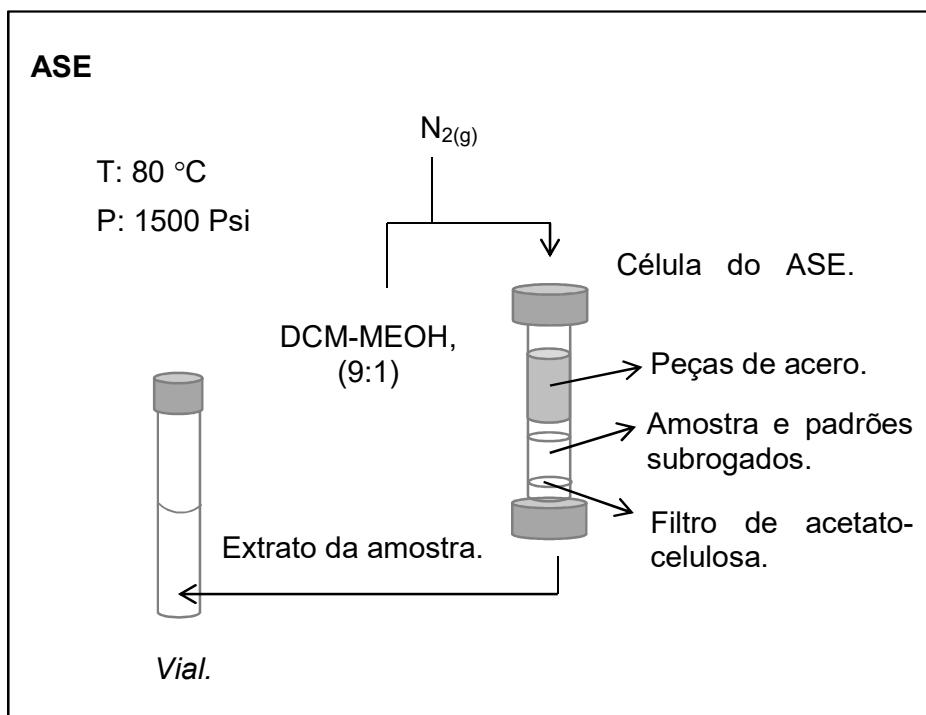


Figura 17. Esquema de extração de lipídios no ASE.

As células fechadas foram colocadas no equipamento e extraídas sob as seguintes condições: T: 80.0 °C, pressão: 1500, Psi Ciclos: Dois x 8 min e volume de extração: 30-50 mL.

Após extração as amostras tinham um volume entre 30 e 50 mL. Estas foram concentradas fazendo uso de um evaporador rotatório. Para assegurar o volume, as amostras foram levadas à secura usando nitrogênio gasoso e redissolvidas quantitativamente em DCM-MeOH (1:1).

Assumiu-se o volume adicionado de dissolvente como o volume total da amostra. Os extratos das amostras foram guardados a -20°C.

9.2.2.

Análise de Lipídios Totais Extraíveis

Para a determinação de lipídios totais extraíveis, TLE (*total lipids extractables*) tomou-se uma pequena alíquota de cada amostra (20 µL na maioria dos casos) e depositou-se em um casquinho feito com dobro papel alumínio previamente levado a 45 °C durante 30 min, resfriado em dessecador por 15 min e pesado uma microbalança. Esta alíquota foi levada à mesma temperatura (45 °C) por 15 min, resfriada no dessecador e pesada; determinando assim a diferença da massa. Este processo foi feito por triplicata, aceitando-se um DPR $\leq 10\%$ entre as massas determinadas para cada amostra.

A análise de TLE além de quantificar em massa os lipídios solúveis em dissolventes orgânicos presentes em uma amostra ajuda também na estimação da alíquota que será tomada do extrato para as análises posteriores. Isto é necessário levado em conta que a metodologia inclui a separação de compostos usando cromatografia em fase sólida, o qual implica guardar uma razão entre massa sílica na coluna e massa da amostra na sílica. Na metodologia usada pelo LABMAM esta razão é estabelecida como 2 mg de TLE/ uma grama de sílica desativada ao 5%.

9.2.3.

Separação dos lipídios saponificáveis dos lipídios não saponificáveis por extração orgânica

O processo de saponificação além de ser utilizado na identificação dos ácidos graxos (biomarcadores), também ajuda na separação desses grupos de outros compostos presentes nas amostras. Já que, os compostos com grupos esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides não sofrem saponificação a diferença dos ácidos graxos, permitindo dessa maneira a utilização da seguinte metodologia:

Saponificação. Foi tomada uma alíquota das amostras (2 mg de TLE) e levada à secura usando nitrogênio gasoso. Depois adicionado 3 mL de hidróxido de sódio 1 M em cada amostra, enchendo o recipiente com N₂ para retirar o oxigênio e tampando de forma rápida para evitar a entrada do mesmo; e levando a 110 °C. O tempo de reação de saponificação foi de duas horas para garantir que esta acontecesse no maior número possível de moléculas saponificáveis. Logo as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 15 minutos antes de continuar com a separação descrita abaixo.

A separação dos lipídios saponificáveis (ácidos graxos) dos não saponificáveis (esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides) foi feita usando extração líquido-líquido entre uma fase orgânica e uma aquosa, da seguinte forma:

Separação de compostos não saponificáveis. Foi adicionado nas amostras saponificadas 3 mL de água deionizada e 5 mL de *n*-hexanos seguindo agitação vigorosa durante um minuto e deixadas no repouso durante quarenta e cinco minutos, conseguindo assim a separação das fases e a migração das moléculas para sua devida fração. Logo, utilizando uma pipeta Pasteur separou-se a fase orgânica (sobrenadante) da fase aquosa, a qual foi submetida a mais duas extrações seguindo o mesmo tempo e procedimento. Esta primeira fração (a qual continha as espécies de esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides) será chamada no presente trabalho de fração não saponificável, SAP-N.

Neutralização e extração de compostos saponificáveis. Logo da extração dos compostos não saponificáveis, o restante da fase aquosa foi neutralizada com a adição de 3 mL de HCl 3 M, conseguindo assim que os ácidos graxos fossem agora mais compatíveis com a fase orgânica do que a fase aquosa. Após a neutralização descrita as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de extração líquido-líquido dos compostos não saponificáveis. O restante da fase aquosa foi descartado após a terceira extração. A fração saponificável será chamada de SAP-A.

Remoção da água das frações SAP-N e SAP-A. A água foi removida adicionando-se sulfato de sódio sólido diretamente aos balões como agente hidrofílico, em quantidade suficiente para cobrir a fase líquida. Após agitação vigorosa por cerca de 2 minutos, os balões foram tampados e deixado no escuro sob refrigeração de um dia para o outro. Cumprido este tempo, a fase líquida das amostras foram transferidas quantitativamente utilizando a pipeta Pasteur para outros balões, deixando o sulfato de sódio sólido no fundo. Adicionaram-se pequenos volumes de *n*-hexanos para extrair os compostos que pudessem estar retidos no sólido. Esta extração foi feita três vezes e os extratos foram juntados com o resto da fração. As pequenas partículas sólidas que ficaram na fase líquida foram separadas das amostras na etapa de separação dos compostos por cromatografia em coluna, já que estas ficam retidas na sílica da fase estacionária.

As frações SAP-A foram concentradas até aproximadamente 1 mL e armazenados a -20°C. Esta pode ser usada para a análise de ácidos graxos biomarcadores.

9.2.4.

Separação das classes de lipídios: cromatografia de coluna

As diferentes classes de lipídios presentes na fração SAP-N (esteróis e os *n*-álcoois) foram separadas dos outros compostos utilizando o método de separação por cromatografia de coluna. Para este procedimento foi usada uma coluna cromatográfica de vidro e sílica-gel como fase estacionária. Usou-se uma pequena quantidade de lã de vidro no fundo da coluna para evitar a saída da sílica. Adicionou-se um grama de sílica-gel desativada ao 5% (descrito nos materiais) utilizando *n*-hexanos para o empacotamento desta na coluna (Figura 18). Logo foram adicionados 10 mL de *n*-hexanos para garantir a descontaminação da sílica e da coluna. As amostras foram previamente concentradas até aproximadamente 500 µL e transferidas para um *vial* de 4 mL, com *n*-hexanos como solvente.

Uma etapa importante na separação por cromatografia de coluna é a deposição da amostra na fase estacionária. Esta foi feita no momento exato aonde o menisco do solvente de lavagem que vai saindo da coluna chega até a fase estacionária. Neste momento, utilizando uma pipeta Pasteur foram adicionadas gota a gota as frações SAP-N concentradas na fase estacionária da coluna, assegurando assim que as amostras ficassem depositadas na fase estacionária e não a fase móvel da coluna. A adição das amostras gota a gota foi feita de forma constante e rápida para evitar que a sílica ficasse seca, já que isso produziria a entrada do ar e quebra da sílica empacotada, impedindo a boa separação dos compostos. Imediatamente depois foi adicionada a primeira fase móvel para a separação. Os *vials* que continham as amostras foram “lavadas” três vezes com pequenas quantidades da fase móvel, adicionando-se o lavado na coluna.

Como se mostra na Figura 18 foram usadas três fases moveis com diferentes dissolventes aumentando a polaridade entre estas sequencialmente.

As frações F1 e F2 da SAP-N não foram usadas no presente trabalho, já que a identificação dos compostos presentes nestas não faz parte dos objetivos desta pesquisa. Estas dois frações foram concentradas e armazenadas a -20 °C para possíveis estudos posteriores.

Na fração F3 estão os esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides presentes nas amostras. Estes compostos contêm grupos hidroxilos (-OH) os quais interagem fortemente com a fase estacionária, ocasionando uma baixa resolução dos picos do cromatograma, dificultando a identificação de compostos, sobre tudo, aqueles com um tempo de retenção semelhante porque estes poderia se sobrepor. Para conseguir uma melhor resolução nos picos cromatográficos os grupos hidroxilos são substituídos por um radical que interaja com menos força com a fase estacionária da coluna. Como foi explicado na fundamentação teórica, esse processo é conhecido como derivação, e a metodologia para sua realização é explicada em seguida.

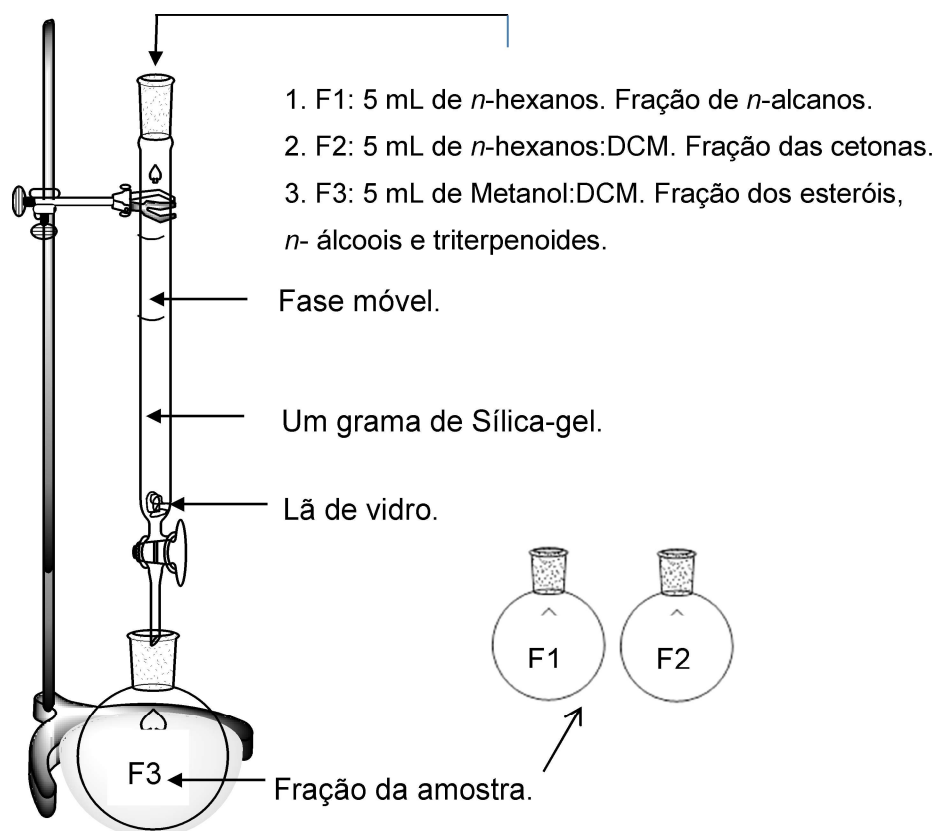


Figura 18. Montagem de separação das frações F1, F2 e F3 por cromatografia de coluna para a fração SAP-N.

Derivação usando BSFTA. Sinalização. Após a separação das frações F3, estas foram concentradas no evaporador rotatório, levadas à secar com fluxo constante de nitrogênio gasoso e tampado de forma rápida para evitar a entrada de oxigênio. Logo adicionou-se 100 μL de BSFTA e 100 μL de acetonitrila como solvente. O tempo de reação foi de uma hora a 70 °C usando um termoreator. A temperatura foi conferida adicionalmente usando um termômetro. Terminado o tempo de reação as frações foram rapidamente secadas com fluxo de nitrogênio gasoso para evitar possíveis precipitações e adicionaram-se quantitativamente 500 μL de DCM como solvente e 500 ng de 5- α -colestano (10 μL da solução $\sim 50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) como padrão interno.

O tratamento de amostras finaliza neste ponto onde estas são levadas para injeção no GC-MS. Antes disso, foram realizadas diferentes curvas de calibração de vários esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides para a quantificação desses compostos presentes nas amostras seguindo a metodologia do próximo item.

9.3. Análise instrumental

A parte instrumental do presente trabalho mostra como foram realizadas as curvas de calibração para a quantificação dos compostos de interesse. Assim como as especificações instrumentais estabelecidas na análise por GC-MS.

9.3.1. Identificação e quantificação dos biomarcadores lipídicos

Os lipídios biomarcadores presentes nas amostras foram identificados e quantificados com a injeção de padrões certificados no GC-MS. Assim, foi feita a comparação dos tempos de retenção dos padrões conhecidos com os tempos de retenção dos compostos nas amostras. Esta identificação foi conferida com os espectros de massas de cada composto.

A Tabela 6 mostra os tempos de retenção dos padrões certificados usados para a identificação e quantificação dos compostos. Para a quantificação dos *n*-álcoois, usou-se o íon m/z 103,3 no MS. Para os esteróis e triterpenoides usaram-se diferentes íons na quantificação, incluindo íons confirmativos.

Tabela 6. Tempo de retenção no GC-MS dos padrões (biomarcadores lipídicos).

Marcador	RT dos Padrões.	Pico m/z	Conf. m/z
C ₁₈ OH	11,65	103.3	327

Marcador	RT dos Padrões.	Pico m/z	Conf. m/z
C ₁₉ OH	12,77	103.3	341
C ₂₄ OH	22,17	103.3	411
C ₂₆ OH	27,30	103.3	439
Coprostanol	29,19	370.5	
Colesterol	31,60	129.3	
Colestanol	31,89	215.5	
Estigmasterol	35,09	83.4	
Sitosterol	36,73	129.3	
Androstanol	14,06	333.5	
Campesterol	34,42	129.3	
Brassicasterol	32,69	69.4	
Coprostanona	30,70	231.5	
Colestano	23,96	217,3	
Lupeol	38,27	189	
β-taraxerol	36,21	204	

Na identificação de compostos nas amostras que não se tinha padrão certificado, usaram-se os tempos de retenção e os espectros de massas reportados na literatura para conferir a estrutura das moléculas. Para a quantificação desses compostos, usou-se um padrão certificado com estrutura molecular semelhante para a realização das curvas de calibração e os picos do MS que são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Tempo de retenção no GC-MS dos marcadores lipídicos identificados e o padrões que foram usados como referência em cada caso.

Marcador	RT dos Compostos	Composto Referência	Pico m/z	Conf. m/z
Fitol	11,81	C ₁₈ OH	103.3	
C ₁₄ OH	Não presente	C ₁₈ OH	103.3	271
C ₁₆ OH	9,95	C ₁₈ OH	103.3	299
C ₂₀ OH	14,15	C ₁₈ OH	103.3	355
C ₂₂ OH	17,68	C ₂₄ OH	103.3	383
C ₂₈ OH	32,62	C ₂₆ OH	103.3	467
C ₃₀ OH	38,14	C ₂₆ OH	103.3	495
C ₃₂ OH	41,83	C ₂₆ OH	103.3	523
Epicoprostanol	29,61	Coprostanol	370.5	
Diidrocolesterol	30,50	Colesterol	129.3	
Metilenocolesterol	Não presente	Colesterol	129.3	
Campestanol	Não presente	Colesterol	215.5	

Marcador	RT dos Compostos	Composto Referência	Pico m/z	Conf. m/z
Sitostanol	36,98	Colesterol	215.5	
Etilcoprostanol	34,23	Coprostanol	215.5	
Dinosterol	37,34	Sitosterol	69,3+129,3	
Colestanona	Não presente	Coprostanona	231.5	
β -amirina	36,82	β -taraxerol	204+218	
α -amirina	37,88	β -taraxerol	204+218	

9.3.2.

Curva de Calibração de esteróis, *n*-álcoois e triterpenoides e padrão interno

A reação de metilação dos grupos hidroxilos usando BSFTA é uma reação reversível. Como a identificação dos marcadores moleculares é feita baseada na massa molecular das espécies derivadas, as amostras devem ser injetadas no GC-MS no menor tempo possível, garantindo assim que as moléculas estejam ainda na forma de ésteres. Pelo anteriormente dito, as curvas de calibração dos diferentes biomarcadores lipídicos foram feitas previas a metilação dos compostos, conseguindo desta forma a injeção das amostras no GC-MS no mesmo dia.

Em seguida se mostra como foi a preparação das distintas curvas de calibração para a quantificação das espécies forma. Assim como a preparação do padrão interno. As massas e concentrações exatas dos padrões de marcadores lipídicos se mostram no capítulo dos resultados e discussão da presente dissertação.

Padrão interno, PI. Foram pesados ~5 mg de 5- α -colestano e levado quantitativamente em um volume de 5 mL. Esta solução é chamada de Solução Estoque PI, com concentração ~1000 ng μL^{-1} . A partir da Solução Estoque PI foi prepara a Solução Trabalho PI, transferido 250 μL da primeira e avolumando a 5 mL. Esta solução tinha uma concentração ~50 ng μL^{-1} .

Soluções para as curvas de calibração. Foram pesados em uma microbalança quantitativamente ~5 mg dos distintos padrões de marcadores lipídicos e preparada uma solução estoque com diferentes.

Estas massas foram levadas a um volume de 5 mL obtendo assim uma solução de $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Foi tomada uma alíquota de $25 \text{ } \mu\text{L}$ da Solução Estoque e avolumado a 5 mL. Esta solução é chamada de Solução Trabalho, com concentração $\sim 5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Tomaram-se alíquotas da Solução Trabalho para fazer as soluções padrões dos diferentes pontos da curva, como se mostra na Tabela 8.

Estas soluções padrões foram submetidas à reação de derivação com BSFTA usando a mesma metodologia que a usada para as amostras descrita anteriormente. Após os padrões foram secados com fluxo de nitrogênio gasoso e adicionaram-se quantitativamente $500 \text{ } \mu\text{L}$ de DCM como solvente e $10 \text{ } \mu\text{L}$ de $5\text{-}\alpha\text{-colestano}$ $\sim 50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ como padrão interno.

Tabela 8. Alíquotas tomadas da Solução Trabalho e concentração final dos padrões da curva calibração dos marcadores lipídicos.

Padrão	Solução Trabalho, (μL)	Concentração*, (ng mL^{-1})
1	10	100
2	25	250
3	50	500
4	100	1000
5	200	2000
6	300	3000
7	400	4000
8	500	5000

*, O volume final de todos os padrões foi de $500 \text{ } \mu\text{L}$.

As soluções de *n*-álcoois e esteróis foram preparadas juntas. Os triterpenoides foram preparados de forma separada.

Os lipídios foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), utilizando o equipamento

Trace GC Ultra - ISQ com injetor automático TriPlus (*Thermo SCIENTIFIC*). Usou-se como fase estacionária uma coluna de alta resolução DB-5MS, de 30 m de largura, com diâmetro de 0,250 mm e filme de 0,25 μm (*Agilent J&W GC Columns*). Como fase móvel foi usado hélio gasoso. Foram injetados 1,3 μL das amostras e padrões sob um fluxo de fenda de 80 mL min^{-1} a 60 $^{\circ}\text{C}$ e 70 KPa. Usou-se uma programação em batelada até 50 min de tempo de retenção e temperatura progressiva de 60, 220, 280 e 300 $^{\circ}\text{C}$ com rampas de 20, 2 e 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ respectivamente. Os resultados foram visualizados usando o software Thermo Xcalibur 2.1.0 SP1.1160 (*Thermo Fisher Scientific Inc*).

9.4. Materiais

Nesta parte do presente capítulo apresentam-se os materiais, equipamentos, soluções, solventes e reagentes utilizados durante o desenvolvimento de toda a metodologia e a redação do presente trabalho escrito, assim como suas especificações.

Todos os solventes e reagentes utilizados foram grau cromatográfico.

9.4.1. Materiais

Os materiais utilizados foram os seguintes:

- Sílica gel. Sílica gel 60, (0.063-0.200 mm), *Merck KgaA*.
- Lã de vidro. (15-25 μm). *Merck KgaA*.
- Filtros de acetato-celulosa.
- Coluna cromatográfica de vidro.
- Balões volumétricos de 1 e 5 mL.
- Vial de 1.5, 4, 8 e 12 mL.
- Balões fundo redondo de 250 mL.
- Beacker de 10, 50, 100, 250 e 400 mL.

- Espatulas metálicas.
- Microseringa de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 μL .
- Pisseta para solventes e água.
- Pipeta Pasteur e pera da pipeta.
- Papel alumínio.
- Fita de teflon.
- Pinças metálicas.

Descontaminação dos materiais. Como a MO é o objeto de estudo neste trabalho, todo o material utilizado que entrasse em contato com a amostra passou por processo de lavagem usando solução de Detertec 10% e água corrente, rinsando três vezes com água destilada e Milli-Q; e descontaminação usando solventes orgânicos ou muflados dependendo do tipo de material.

Os materiais metálicos e plásticos foram descontaminados com diclorometano. As células de extração do ASE foram sonicadas na lavagem e descontaminadas com acetona rinsando três vezes.

A vidraria utilizada foi descontaminada em mufla à 450° C por 12 horas. A lâ de vidro, o sulfato de sódio anidro p.a e os filtros de acetato-celulosa foram descontaminados em mufla a 450° C durante 8 horas. O sulfato de sódio era levado em estufa a 170 °C e resfriado em dessecador antes de ser utilizado.

A sílica foi descontaminada usando DCM. A sílica era ativada a 200°C durante 8 horas, permanecendo em dessecador até esfriar. Depois desativada adicionando água Milli-Q correspondente ao 5% em massa da sílica, seguido de rotação em um balão no evaporador rotatório durante 1 hora a temperatura ambiente; e guardada no dessecador durante 24 horas antes do uso. Estabeleceu-se a validade da desativação da sílica de 48 horas.

9.4.2. Solventes

Os solventes utilizados foram os seguintes:

***n*-hexanos.** 95% pureza. *Macron, fine chemicals.*

Diclorometano. *Macron, fine chemicals.*

Metanol. 99.96% pureza. *J.T.Baker.*

Acetado de etila. 99.7% pureza. *SIGMA-ALDRICH.*

Acetona. 99,5% pureza. *Macron, fine chemicals.*

Acetonitrila. 99.8% pureza. *SIGMA-ALDRICH.*

Tolueno. 99.8% pureza. *J.T.Baker.*

9.4.3. Soluções e Reagentes

Os soluções e reagentes utilizados foram os seguintes:

Acido clorídrico. HCl 3 M.

Hidróxido de sódio. NaOH 1 M.

BSFTA + TMCS, (9:1). *N*-O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com trimetilclorosilano. *SIGMA-ALDRICH.*

Metanol.

Detergente. Detertec Faixa Neutra. *SIGMA-ALDRICH.*

Na₂SO₄. Sulfato de sódio anidro sólido. *Merck KgaA.*

9.4.4. Padrões

Os padrões usados no desenvolvimento da pesquisa se mostram a seguinte tabela.

Tabela 9. Os padrões certificados usados na pesquisa.

Compostos	Outro Nome
C ₁₈ OH	(1-octadecanol / álcool estearílico)
C ₁₉ OH	(1-nonadecanol / álcool nonadecílico)
C ₂₄ OH	(1-tetracosanol / álcool lignocérico)
C ₂₆ OH	(1-hexacosanol / álcool cerótico)
Coprostanol	(5 β -colestano-3 β -ol)
Colesterol	27d5, (colest-5-en-3 β -ol)
Colestanol	27d0, (5 α -colestano-3 β -ol)
Estigmasterol	29d5,22, (24-eticolesta-5,22-dien-3 β -ol)
Sitosterol	29d5, (24-eticolest-5-en-3 β -ol)
Androstanol	(androstan-3 β -ol)
Campesterol	28d5, (24-metilcolest-5-en-3 β -ol)
Brassicasterol	28d5,22, (24-metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol)
Coprostanona	
Colestano	5 α -colestano
1-nonadecaoato	
Lupeol	lup-20(29)- en-3 β -ol
β -taraxerol	taraxer-14-en-3 β -ol

9.4.5. Equipamentos.

Accelared Solvent Extractor. ASE 200. *Dionex*.

Evaporador Rotatório. Evaporador rotatório com controlador de vácuo e bomba de vácuo. Modelo: R-215 com V-850 e V-700. *Buchi*.

Cromatógrafo de gases acoplado a Massas, CG-MS. GG: Trace GC Ultra, MS: ISQ com Automatic Sampler (injector PTV) e TriPlus. *Thermo SCIENTIFIC*. Com Coluna para cromatografia gasosa de alta resolução DB-5MS, largura de 30 m, diâmetro de 0,250 mm, filme de 0,25 μ m e limites de temperatura entre 60 e 350 °C. *Agilent J&W GC Columns, Agilents Technologies*. Programa: Thermo Xcalibur 2.1.0 SP1.1160. *Thermo Fisher Scientific Inc*.

Estufa. Estufa de secagem e esterilização. Modelo: SL-100/27. *SOLAB*.

Termoreator. Reacti-Vap Evaporator (27-port). Modelo: 18826. *Thermo SCIENTIFIC.*

Microbalança. Precisão: $\pm 0,01$ mg. AT261. *METTLER TOLEDO.*

Balança analítica. Precisão: $\pm 0,001$ g. AE 200. *METTLER.*

Freezer. Freezer Flex. Modelo: BVR28/220. *Whirlpool S. A. Brastemp.*

Ultrassom. Ultrassom 5210. *Branson.*

10

Anexo II: Tabelas de Resultados

Este capítulo contém os resultados numéricos obtidos tais como, COT, TLE, NT, porcentagem de recuperação dos lipídios, concentração de lipídios biomarcadores, somatórios desses e a porcentagem relativa de cada biomarcador.

10.1. COT, N e TLE.

Tabela 10. Resultado da análise de COT e NT (valores médios).

Estação	Massa (mg)	NT (%)	COT (%)	Estação	Massa (mg)	NT (%)	COT (%)
S1	10,366	0,283	3,116	S12	10,015	0,162	1,905
S1	10,210	0,286	3,136	S12	10,024	0,168	2,028
S2	10,207	0,199	2,809	S13	10,051	0,121	1,640
S2	10,111	0,195	2,756	S13	10,074	0,115	1,586
S3	10,011	0,369	4,300	S14	10,203	0,266	3,050
S3	10,084	0,374	4,299	S14	10,162	0,272	2,960
S4	10,356	0,203	2,710	S15	10,345	0,128	1,353
S4	10,301	0,183	2,426	S15	10,144	0,123	1,331
S5	10,048	0,184	2,427	S16	10,111	0,128	1,485
S5	10,305	0,180	2,290	S16	10,035	0,124	1,482
S6	9,996	0,131	1,978	S17	10,224	0,082	0,926
S6	10,047	0,150	1,935	S17	10,298	0,094	1,061
S7	10,139	0,179	2,547	S18	10,089	0,231	2,540
S7	10,144	0,198	2,507	S18	10,103	0,222	2,569
S8	10,205	0,222	2,674	S19	10,060	0,224	2,356
S8	10,088	0,218	2,656	S19	10,141	0,224	2,385
S9	10,001	0,259	3,072	S20	10,187	0,097	1,092
S9	10,287	0,248	3,064	S20	10,143	0,097	1,106
S10	10,219	0,282	4,297	S21	10,035	0,143	1,961
S10	10,525	0,255	3,560	S21	10,122	0,144	1,923
S11	10,476	0,165	2,496	S22	10,119	0,318	2,914
S11	10,179	0,157	2,322	S22	10,267	0,331	2,965

Tabela 11. Lipídios extraíveis totais das amostras S1-S22 após extração com DCM-MeOH (9:1) no ASE.

Estação	TLE (mg g ⁻¹)			DP	TLE (mg g ⁻¹)	TLE/COT (%)
S1-1	2,629	2,709	2,829	0,503	2,722	-
S1-2	3,013	2,914	2,881	0,208	2,936	-
S1-3	3,106	2,974	3,007	0,208	3,029	-
S1-4	2,952	2,985	2,919	0,100	2,952	-
S1					2,910	9,3
S2	1,686	1,462	1,649	0,482	1,599	5,7
S3	3,524	3,562	3,524	0,087	3,537	8,2
S4	2,284	2,284	2,284	0,000	2,284	8,9
S5	1,760	1,685	1,685	0,173	1,710	7,2
S6	1,612	1,649	1,612	0,087	1,624	8,3
S7	1,124	1,237	1,274	0,312	1,212	4,8
S8	4,609	4,872	4,909	0,654	4,797	18,0
S9	3,525	3,525	3,750	0,520	3,600	11,7
S10	2,585	2,585	2,659	0,173	2,609	6,6
S11	1,387	1,387	1,387	0,000	1,387	5,8
S12	1,124	1,124	1,124	0,000	1,124	5,7
S13	1,348	1,348	1,348	0,000	1,348	8,4
S14	2,811	2,736	2,736	0,173	2,761	9,2
S15	1,087	1,087	1,124	0,087	1,099	8,2
S16	1,086	1,124	1,086	0,087	1,099	7,4
S17	0,600	0,637	0,675	0,150	0,637	6,4
S18	1,650	1,650	1,724	0,173	1,674	6,6
S19	5,498	5,698	5,598	0,400	5,598	19,0
S20	1,423	1,386	1,386	0,087	1,398	7,2
S21	1,050	1,012	1,050	0,087	1,037	9,4
S22	1,985	1,835	1,985	0,346	1,935	8,2

10.2.

Recuperação de marcadores lipídicos.

Tabela 12. Porcentagem de recuperação do androstanol e do 1-nonadecanol.

Amostra	% Recup. Androstanol	% Recup. 1-nonadecanol	Amostra	% Recup. Androstanol	% Recup. 1-nonadecanol
S1-1	82,4	50,0	S8	66,6	72,8
S1-2	88,9	46,8	S9	66,8	70,9
S1-3	62,8	39,7	S10	60,7	73,2
S1-4	89,7	40,3	S11	50,7	62,9
Média	80,9	44,2	S12	50,0	59,8
DesP	12,5	5,0	S13	63,8	65,4
BR-1	42,4	29,4	S14	67,0	71,0
BR-3	47,8	53,3	S15	49,1	62,4
BR-4	49,6	56,7	S16	54,1	56,3
S1 médio	80,9	44,2	S17	50,0	55,2
S2	20,3	21,7	S18	48,1	48,4
S3	28,5	39,4	S19	86,0	82,0
S4	59,1	55,3	S20	51,1	65,6
S5	58,9	61,4	S21	62,7	74,6
S6	77,9	65,1	S22	62,4	64,8
S7	43,9	46,6	Média	57,7	53,3
			DesP	14,8	14,2

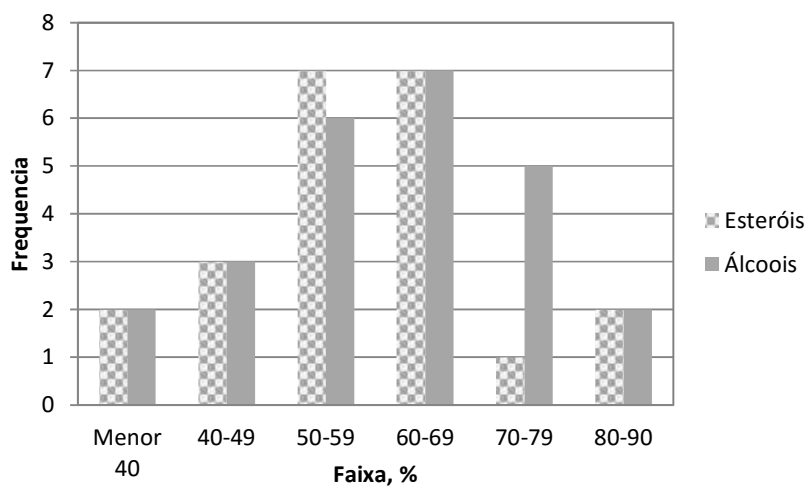


Figura 19. Histograma representando a recuperação dos padrões subrogados, mostrando uma distribuição Gaussiana normal.

10.3.**Concentrações dos marcadores lipídicos**

Tabela 13. Concentração de esteróis não fecais em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório do total de esteróis.

Estação	Diidrocolest.	Brassicaster.	Campesterol	Sitosterol	Sitostanol	Estigmaster.	Dinosterol
S1	0,12	0,04	0,20	0,51	0,20	0,19	0,34
S2	0,10	0,15	0,16	0,56	0,15	0,17	0,14
S3	0,35	0,31	0,62	2,13	0,32	1,21	0,08
S4	0,19	0,70	0,68	2,87	0,64	0,81	0,06
S5	0,26	0,70	0,76	2,48	0,53	0,71	0,16
S6	0,38	1,23	1,00	2,82	0,63	1,18	0,23
S7	0,17	0,48	0,49	1,83	0,42	0,42	0,90
S8	0,33	1,81	1,65	6,15	1,58	1,39	1,48
S9	0,29	1,17	1,03	3,13	0,92	0,85	0,72
S10	0,29	0,80	0,88	3,39	0,83	0,68	0,92
S11	0,30	0,72	0,68	2,59	0,55	0,85	0,52
S12	0,16	0,34	0,36	1,11	0,37	0,36	0,01
S13	0,25	0,73	0,48	1,18	0,31	0,50	0,01
S14	0,72	1,78	1,63	3,29	0,86	1,17	1,00
S15	0,21	0,50	0,36	0,87	0,26	0,38	1,28
S16	0,21	0,54	0,40	0,84	0,28	0,37	1,00
S17	0,10	0,22	0,17	0,34	0,08	0,21	1,26
S18	0,27	0,56	0,62	1,88	0,47	0,87	3,97
S19	1,33	3,90	3,84	5,70	1,51	1,88	0,23
S20	0,30	0,78	0,59	2,00	0,12	0,82	0,42
S21	0,25	0,52	0,43	1,11	0,28	0,47	0,89
S22	0,33	0,99	0,75	1,89	0,52	0,91	0,65

Tabela 14. Concentração de esteróis fecais incluindo o colesterol e coprostanol em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório do total de esteróis.

Estação	Coprostanol	Epicopros.	Etilcopros.	Colesterol	Colestanol	Σ esteróis
Ria de Aveiro						
S1	0,11	<LQ	0,09	0,37	0,26	2,42
S2	0,07	<LQ	<LQ	0,31	0,17	1,97
S3	0,24	0,14	0,27	1,73	0,64	8,04
S4	0,57	<LQ	0,37	1,39	0,74	9,02
S5	0,61	<LQ	0,40	2,56	0,71	9,88
S6	0,71	<LQ	0,48	2,96	0,97	12,58
S7	0,42	<LQ	0,29	1,19	0,49	7,10
S8	11,51	<LQ	4,27	5,64	3,73	39,55
S9	3,85	<LQ	1,76	3,07	1,70	18,48
S10	1,10	<LQ	0,63	2,12	0,98	12,61
S11	0,25	<LQ	0,24	1,85	0,67	9,21

Estação	Coprostanol	Epicopros.	Etilcopros.	Colesterol	Colestanol	Σ esteróis
S12	0,15	<LQ	<LQ	1,23	0,52	4,60
S13	0,26	<LQ	<LQ	2,03	0,60	6,34
S14	1,64	<LQ	0,58	13,12	3,27	29,06
S15	0,12	0,06	<LQ	1,25	0,54	5,82
S16	0,65	<LQ	0,31	1,85	0,59	7,06
S17	0,05	0,03	<LQ	0,87	0,20	3,53
S18	0,29	0,08	<LQ	1,58	0,70	11,30
Rio Mondego						
S19	16,62	<LQ	5,01	15,00	4,57	59,61
S21	0,15	<LQ	<LQ	1,65	0,66	6,40
S20	0,30	<LQ	0,26	1,60	0,53	7,71
S22	0,44	<LQ	0,34	2,74	1,19	10,75

Tabela 15. Concentração de *n*-álcoois de cadeia longa em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório destes.

Estação	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH	C ₃₂ OH	Σ LCOH
Ria de Aveiro							
S1	0,01	0,21	0,32	0,01	0,01	0,05	0,60
S2	0,01	0,44	0,70	0,01	0,18	0,14	1,47
S3	0,01	0,33	0,44	0,01	0,08	0,19	1,06
S4	1,44	1,16	1,51	0,57	0,55	0,33	5,55
S5	0,96	0,83	0,87	0,19	0,28	0,20	3,33
S6	0,97	0,86	1,15	0,39	0,40	0,22	3,99
S7	0,85	0,88	0,83	0,01	0,16	0,14	2,86
S8	1,89	2,18	4,05	2,14	1,46	0,65	12,39
S9	1,82	1,91	2,68	1,24	0,98	0,51	9,13
S10	2,28	1,80	1,79	0,51	0,51	0,24	7,13
S11	0,91	0,93	1,06	0,21	0,25	0,13	3,49
S12	0,59	0,66	0,69	0,01	0,05	0,08	2,08
S13	1,27	0,76	0,61	0,01	0,02	0,08	2,76
S14	2,01	1,75	2,09	1,00	0,55	0,31	7,72
S15	0,13	0,26	0,25	0,01	0,01	0,01	0,66
S16	0,31	0,51	0,53	0,01	0,02	0,09	1,46
S17	0,01	0,17	0,19	0,01	0,01	0,01	0,38
S18	0,50	0,54	0,67	0,01	0,07	0,16	1,96
Rio Mondego							
S19	2,66	2,46	3,00	1,17	0,69	0,41	10,39
S20	0,95	0,92	0,73	0,01	0,11	0,13	2,86
S21	0,55	0,38	0,36	0,01	0,01	0,08	1,38
S22	1,14	0,89	0,89	0,04	0,13	0,13	3,21

Tabela 16. Concentração de *n*-álcoois de cadeia curta em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$), somatório destes e somatório total de *n*-álcoois.

Estação	C ₁₆ OH	C ₁₈ OH	C ₂₀ OH	Fitol	Σ SCOH	Σ C-OH
Ria de Aveiro						
S1	0,15	0,08	0,14	0,22	0,38	1,20
S2	0,22	0,12	0,11	0,10	0,45	2,03
S3	0,18	0,13	0,40	0,23	0,72	2,01
S4	0,58	0,42	0,64	0,87	1,63	8,06
S5	0,43	0,20	0,70	0,47	1,33	5,13
S6	1,00	0,43	0,73	1,15	2,16	7,30
S7	0,17	0,26	0,54	0,53	0,98	4,37
S8	1,69	1,16	0,94	1,17	3,79	17,34
S9	0,75	0,81	0,74	1,05	2,31	12,48
S10	0,26	0,32	1,08	0,51	1,66	9,31
S11	0,16	0,17	0,69	0,34	1,03	4,86
S12	0,21	0,14	0,41	0,32	0,76	3,16
S13	0,29	0,13	0,47	0,38	0,88	4,02
S14	0,72	0,43	0,90	0,61	2,04	10,37
S15	0,38	0,14	0,25	0,86	0,77	2,29
S16	0,63	0,25	0,33	0,61	1,20	3,28
S17	0,18	0,04	0,17	0,35	0,39	1,13
S18	0,58	0,23	0,49	0,73	1,30	3,98
Rio Mondego						
S19	2,74	1,22	1,27	1,87	5,23	17,48
S20	0,92	0,28	0,51	0,66	1,71	5,23
S21	0,52	0,28	0,37	1,07	1,17	3,62
S22	1,04	0,43	0,67	1,00	2,15	6,36

Tabela 17. Concentração de triterpenoides em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego ($\mu\text{g g}^{-1}$) e somatório total destes.

Estação	α -amirina	β -amirina	β -taraxerol	Lupeol	Σ Triterpenoides
Ria de Aveiro					
S1	0,42	0,68	0,33	1,50	2,93
S2	1,39	1,36	0,46	1,95	5,16
S3	3,79	1,84	1,63	0,00	7,25
S4	3,00	3,53	1,31	4,70	12,53
S5	4,02	5,95	2,25	8,08	20,30
S6	4,10	4,31	1,66	5,75	15,81
S7	2,74	4,04	1,56	0,00	8,34
S8	4,58	6,37	1,82	8,41	21,18
S9	4,20	4,69	1,76	6,23	16,87
S10	9,73	9,36	2,98	0,00	22,08
S11	4,84	4,81	1,74	0,00	11,38
S12	1,54	1,57	0,70	2,17	5,98
S13	1,97	2,94	1,03	3,90	9,84
S14	1,89	3,27	1,35	4,71	11,22
S15	0,55	0,93	0,39	2,10	3,96
S16	1,03	1,26	0,46	1,57	4,32

Estação	α -amirina	β -amirina	β -taraxerol	Lupeol	Σ Triterpenoides
S17	0,41	0,53	0,20	0,64	1,79
S18	2,59	2,27	0,48	5,29	10,63
Rio Mondego					
S19	3,97	3,49	1,10	5,47	14,04
S20	2,14	3,68	1,47	5,13	12,42
S21	1,26	2,72	1,12	5,35	10,45
S22	1,50	2,33	0,69	2,96	7,48

10.4.

Porcentagens relativas dos marcadores lipídicos.

Tabela 18. Porcentagem relativa de esteróis não fecais no somatório total de esteróis em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Estação	Diidrocolest.	Brassicast.	Campesterol	Sitosterol	Sitostanol	Estigmast.	Dinosterol
Ria de Aveiro							
S1	4,89	1,55	8,30	20,81	8,23	7,82	14,07
S2	4,81	7,73	8,18	27,97	7,43	8,38	7,19
S3	4,29	3,79	7,73	26,50	4,04	14,99	1,02
S4	2,11	7,73	7,54	31,82	7,12	8,97	0,66
S5	2,61	7,13	7,68	25,11	5,40	7,18	1,58
S6	3,00	9,73	7,94	22,43	4,97	9,39	1,86
S7	2,40	6,80	6,88	25,78	5,95	5,86	12,63
S8	0,85	4,59	4,16	15,56	3,99	3,51	3,75
S9	1,58	6,30	5,55	16,94	4,95	4,61	3,88
S10	2,26	6,31	6,99	26,85	6,56	5,38	7,29
S11	3,24	7,81	7,36	28,11	5,94	9,24	5,66
S12	3,54	7,30	7,69	24,06	8,03	7,87	0,14
S13	3,97	11,50	7,54	18,56	4,81	7,79	0,10
S14	2,48	6,13	5,61	11,32	2,95	4,02	3,45
S15	3,62	8,49	6,20	14,91	4,49	6,46	21,90
S16	2,94	7,71	5,64	11,95	3,96	5,22	14,22
S17	2,84	6,29	4,69	9,72	2,17	6,05	35,70
S18	2,42	4,99	5,53	16,60	4,16	7,73	35,11
Rio Mondego							
S19	2,24	6,54	6,45	9,56	2,54	3,15	0,39
S20	3,86	10,06	7,59	25,92	1,50	10,69	5,49
S21	3,96	8,08	6,67	17,26	4,34	7,26	13,84
S22	3,09	9,21	6,97	17,57	4,88	8,48	6,01

Tabela 19. Porcentagem relativa de esteróis fecais incluindo o colesterol e colestanol no somatório total de esteróis em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Estação	Coprostanol	Epicoprostanol	Etilcoprostanol	Colesterol	Colestanol
Ria de Aveiro					
S1	4,66	3,65	3,65	15,18	10,58
S2	3,65	0,31	0,31	15,60	8,42
S3	3,00	3,40	3,40	21,48	7,99
S4	6,28	4,13	4,13	15,35	8,22
S5	6,13	4,08	4,08	25,85	7,18
S6	5,62	3,78	3,78	23,51	7,72
S7	5,88	4,12	4,12	16,69	6,93
S8	29,10	10,79	10,79	14,25	9,44
S9	20,83	9,54	9,54	16,60	9,18
S10	8,69	4,99	4,99	16,83	7,79
S11	2,67	2,55	2,55	20,09	7,25
S12	3,17	0,14	0,14	26,59	11,35
S13	4,11	0,10	0,10	31,94	9,48
S14	5,65	1,99	1,99	45,12	11,26
S15	2,09	0,11	0,11	21,45	9,29
S16	9,27	4,38	4,38	26,21	8,40
S17	1,38	0,18	0,18	24,69	5,52
S18	2,53	0,06	0,06	14,01	6,17
Rio Mondego					
S19	27,88	8,41	8,41	25,17	7,66
S21	3,84	3,33	3,33	20,72	6,93
S20	2,30	0,10	0,10	25,80	10,29
S22	4,14	3,13	3,13	25,45	11,02

Tabela 20. Porcentagem relativa de *n*-álcoois de cadeia longa no somatório total de *n*-álcoois em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Estação	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH	C ₃₂ OH
S1	0,52	17,54	26,24	0,52	0,52	4,21
S2	0,31	21,71	34,33	0,31	9,10	6,90
S3	0,31	16,51	22,08	0,31	4,03	9,49
S4	17,83	14,36	18,70	7,08	6,79	4,14
S5	18,74	16,26	16,98	3,62	5,43	3,88
S6	13,30	11,78	15,78	5,31	5,53	2,99
S7	19,51	20,22	18,91	0,14	3,61	3,15
S8	10,92	12,56	23,36	12,37	8,44	3,77
S9	14,61	15,30	21,44	9,89	7,81	4,06
S10	24,49	19,38	19,23	5,46	5,46	2,59
S11	18,72	19,22	21,88	4,23	5,08	2,73
S12	18,72	20,86	21,85	0,20	1,56	2,67
S13	31,71	19,00	15,26	0,16	0,52	1,94
S14	19,43	16,90	20,16	9,60	5,31	3,03
S15	5,48	11,52	11,07	0,27	0,27	0,27
S16	9,58	15,46	16,10	0,19	0,66	2,66
S17	0,56	15,22	16,64	0,56	0,56	0,56

Estação	C ₂₂ OH	C ₂₄ OH	C ₂₆ OH	C ₂₈ OH	C ₃₀ OH	C ₃₂ OH
S18	12,58	13,55	16,93	0,16	1,80	4,09
S19	15,22	14,09	17,19	6,67	3,93	2,35
S20	18,26	17,58	14,02	0,12	2,11	2,54
S21	15,31	10,42	10,00	0,17	0,17	2,12
S22	17,87	14,07	14,02	0,63	1,99	1,97

Tabela 21. Porcentagem relativa de *n*-álcoois de cadeia curta no somatório total de *n*-álcoois em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Estação	C ₁₆ OH	C ₁₈ OH	C ₂₀ OH	Fitol
S1	12,86	6,90	12,03	18,67
S2	10,89	5,94	5,38	5,13
S3	9,02	6,63	20,05	11,56
S4	7,14	5,21	7,91	10,85
S5	8,29	3,94	13,68	9,19
S6	13,63	5,95	10,03	15,70
S7	3,89	6,03	12,43	12,10
S8	9,73	6,70	5,42	6,73
S9	6,01	6,49	5,97	8,41
S10	2,83	3,41	11,64	5,51
S11	3,37	3,54	14,27	6,94
S12	6,77	4,33	12,94	10,09
S13	7,18	3,16	11,58	9,49
S14	6,90	4,10	8,67	5,89
S15	16,65	6,14	10,90	37,42
S16	19,31	7,48	9,94	18,62
S17	15,79	3,72	15,36	31,06
S18	14,49	5,81	12,31	18,26
S19	15,65	6,96	7,28	10,67
S20	17,63	5,28	9,84	12,63
S21	14,43	7,64	10,16	29,58
S22	16,40	6,84	10,51	15,71

Tabela 22. Porcentagem relativa de triterpenoides no somatório total dos triterpenoides em sedimentos da Ria de Aveiro e Rio Mondego.

Estação	α -amirina	β -amirina	β -taraxerol	Lupeol
Ria de Aveiro				
S1	14,37	23,18	11,34	51,11
S2	26,94	26,33	8,90	37,84
S3	52,19	25,35	22,49	0,00
S4	23,91	28,14	10,42	37,52
S5	19,80	29,30	11,10	39,80
S6	25,90	27,27	10,47	36,36
S7	32,89	48,49	18,65	0,00
S8	21,61	30,08	8,61	39,70
S9	24,87	27,78	10,44	36,91
S10	44,09	42,40	13,52	0,00

Estação	α -amirina	β -amirina	β -taraxerol	Lupeol
S11	42,50	42,23	15,29	0,00
S12	25,80	26,30	11,65	36,25
S13	20,01	29,90	10,45	39,65
S14	16,84	29,13	12,07	41,97
S15	13,90	23,41	9,77	52,92
S16	23,85	29,14	10,57	36,44
S17	23,05	29,56	11,35	36,04
S18	24,33	21,40	4,51	49,76
Rio Mondego				
S19	28,32	24,87	7,87	38,95
S20	17,18	29,62	11,87	41,33
S21	12,07	26,07	10,72	51,15
S22	20,00	31,20	9,24	39,55

11

Anexo III: Cromatogramas e espectros de massas

Este capítulo destina-se a apresentar os cromatogramas entre os tempos de retenção 8 e 44 min das amostras analisadas. Assim como, os espectros de massas entre 50 e 550 m/z para cada marcador lipídico identificado ao longo das estações de amostragem, padrões sub-rogados e PI. Os cromatogramas encontram-se organizados na ordem das amostras S-1 a S-22. Os espectros de massas acham-se ordenados de acordo ao RT em ordem crescente e divididos por tipo de lipídio.

11.1.

Cromatograma das amostras

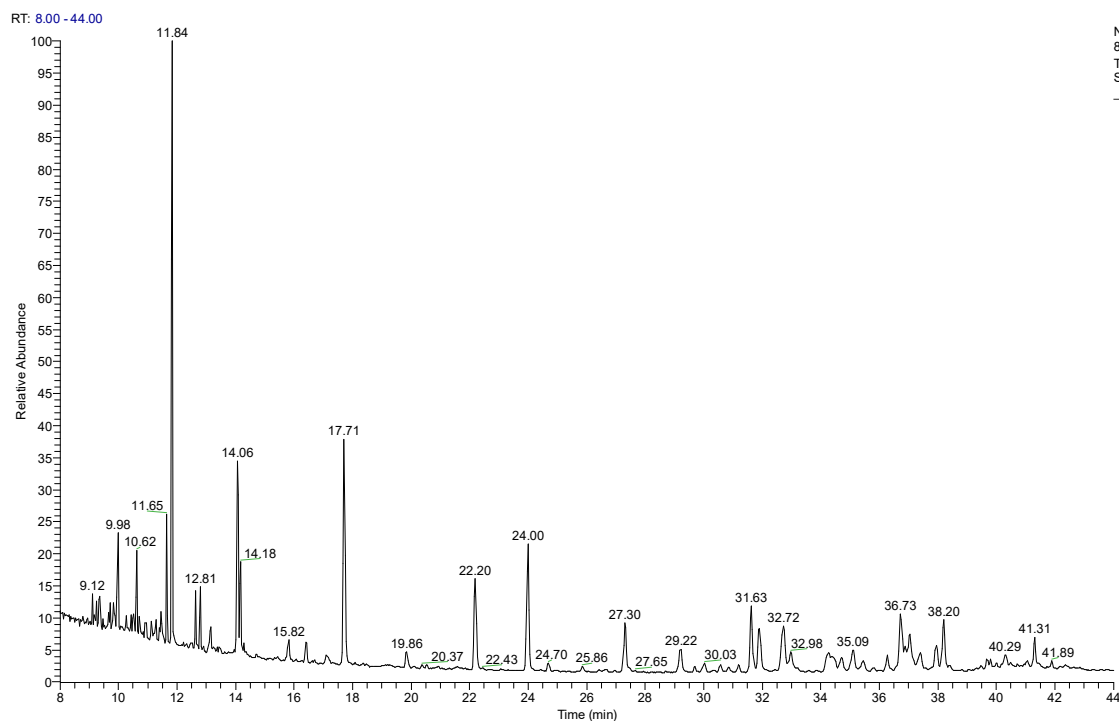


Figura 20. Cromatograma de GC-MS para a amostra S1.

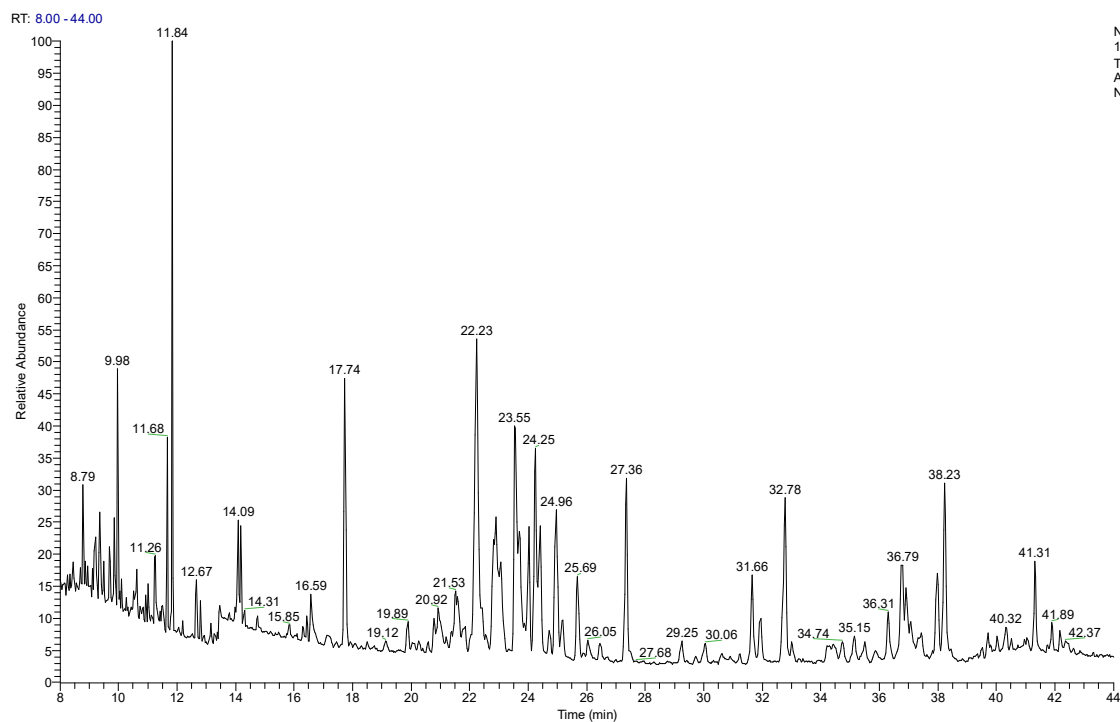


Figura 21. Cromatograma de GC-MS para a amostra S2.

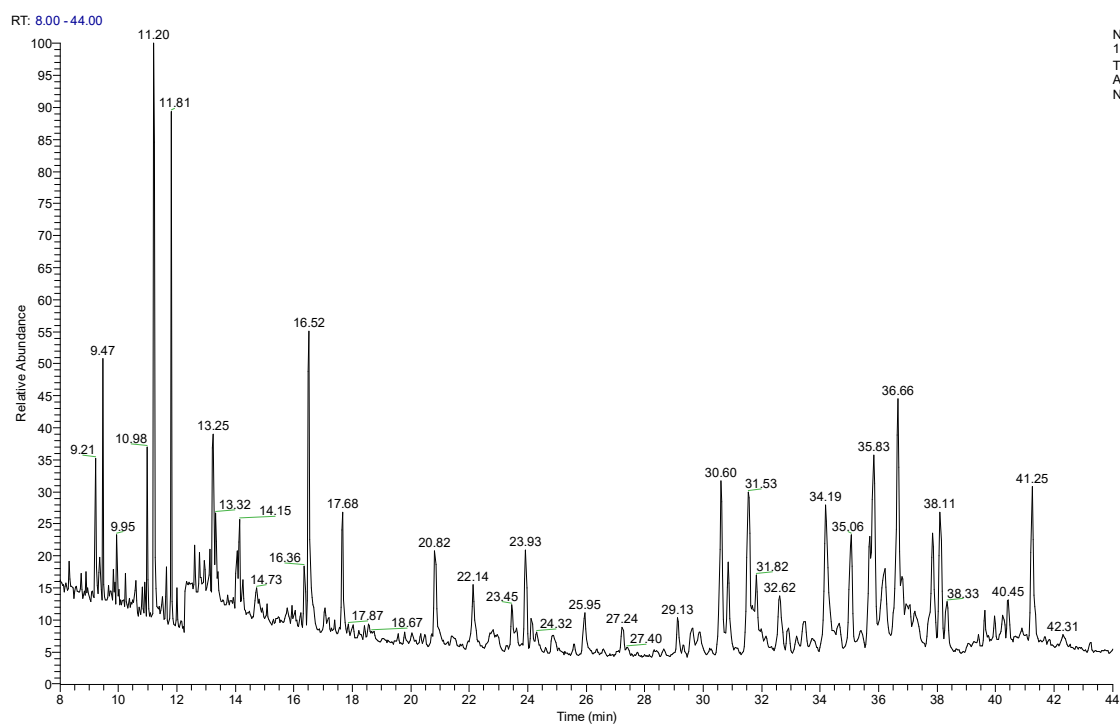


Figura 22. Cromatograma de GC-MS para a amostra S3.

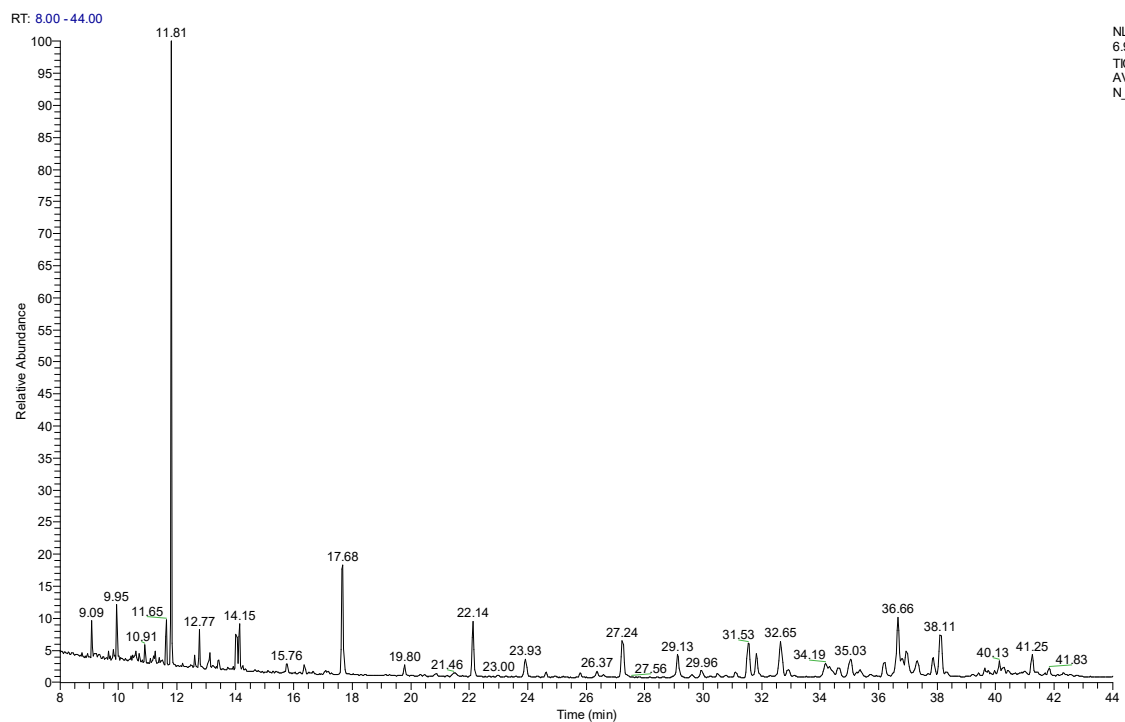


Figura 23. Cromatograma de GC-MS para a amostra S4.

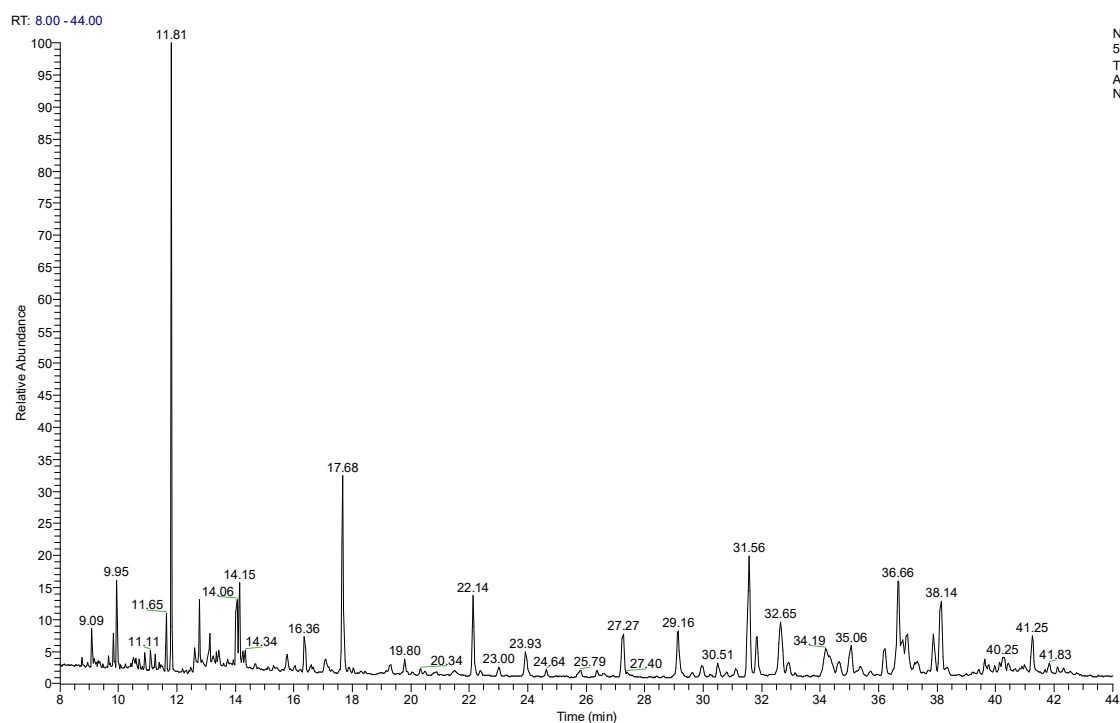


Figura 24. Cromatograma de GC-MS para as amostra S5.

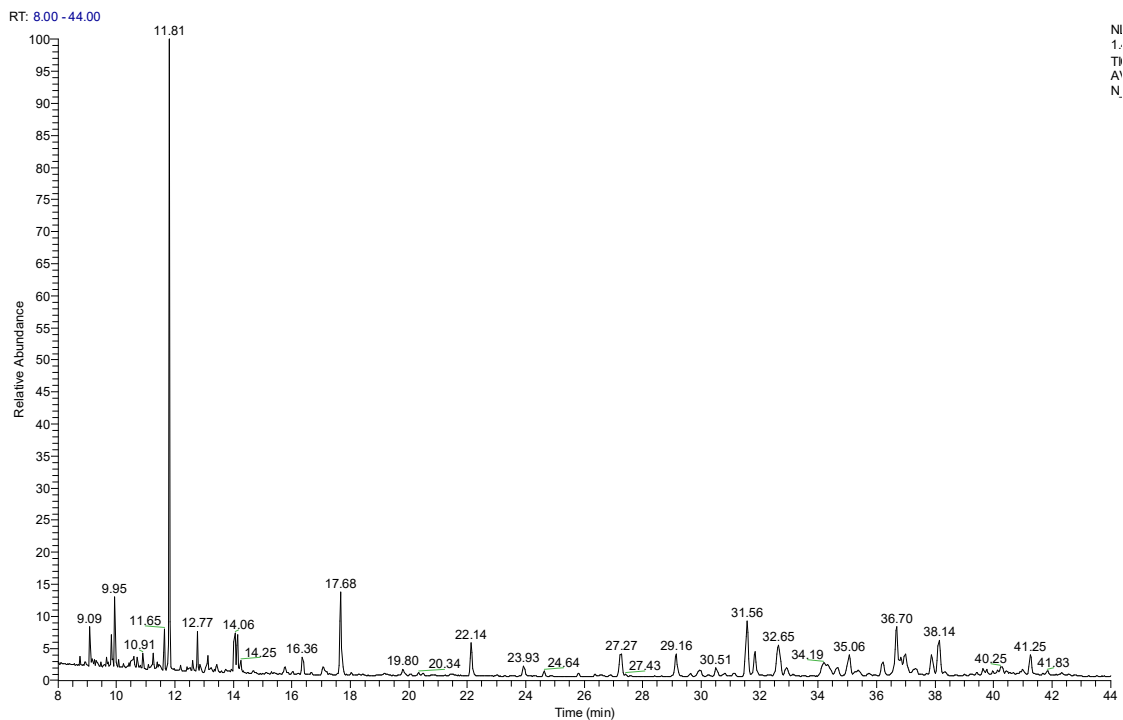


Figura 25. Cromatograma de GC-MS para a amostra S6.

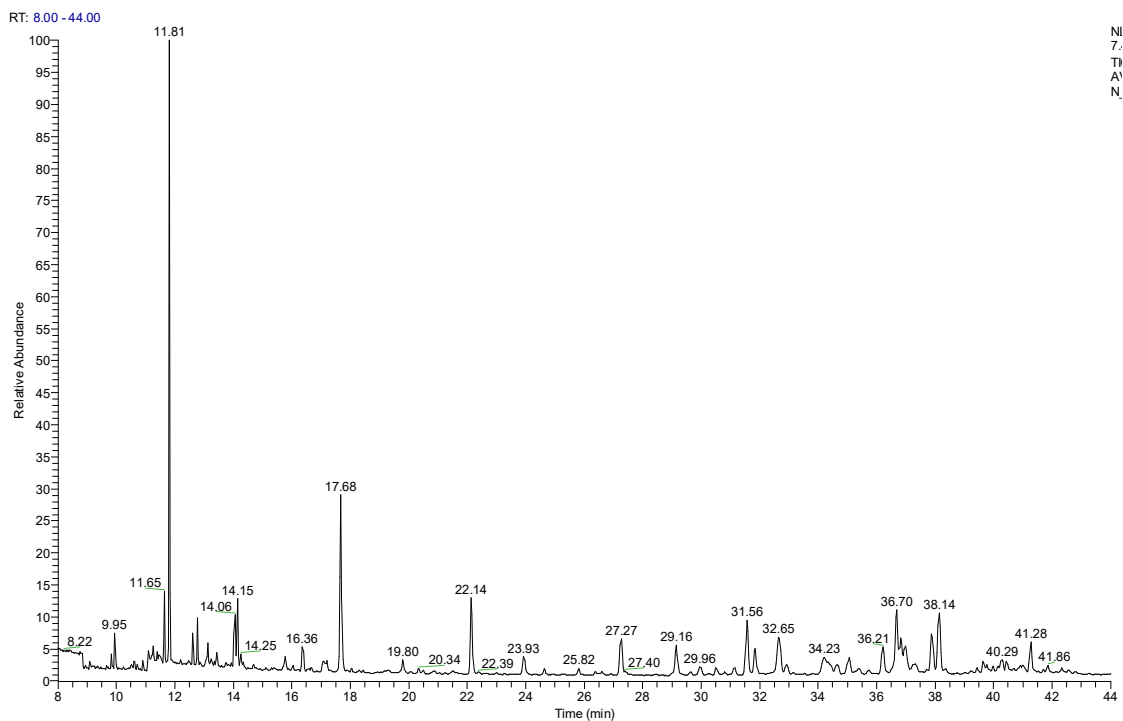


Figura 26. Cromatograma de GC-MS para a amostra S7.

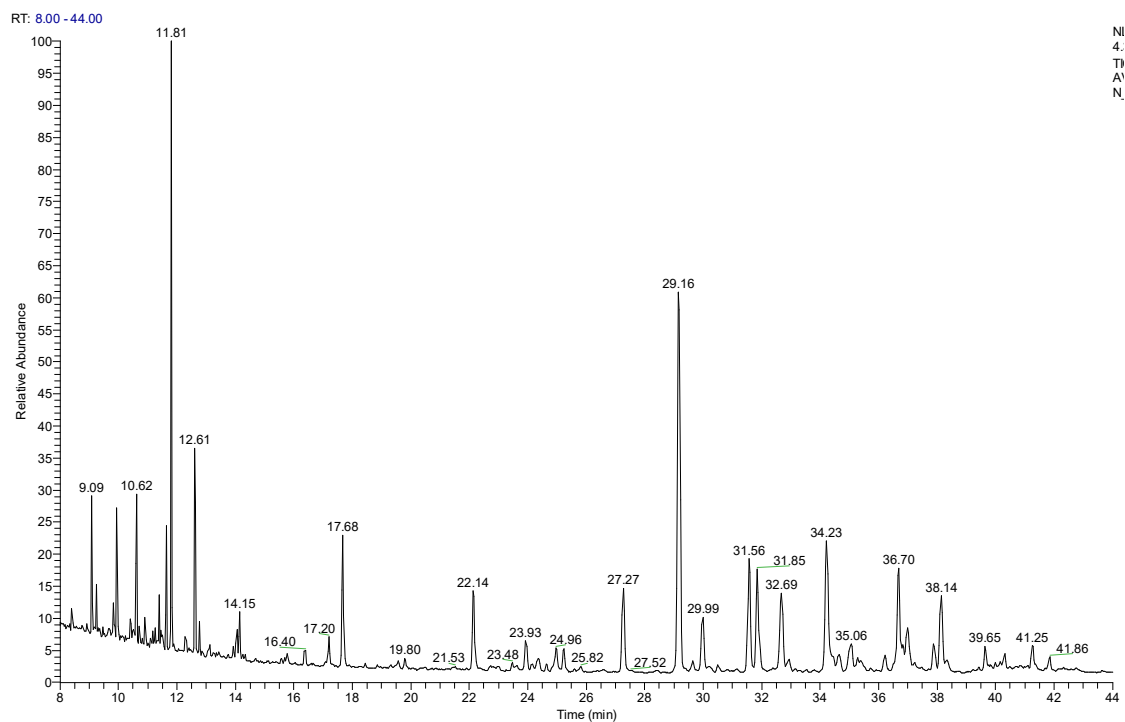


Figura 27. Cromatograma de GC-MS para a amostra S8.

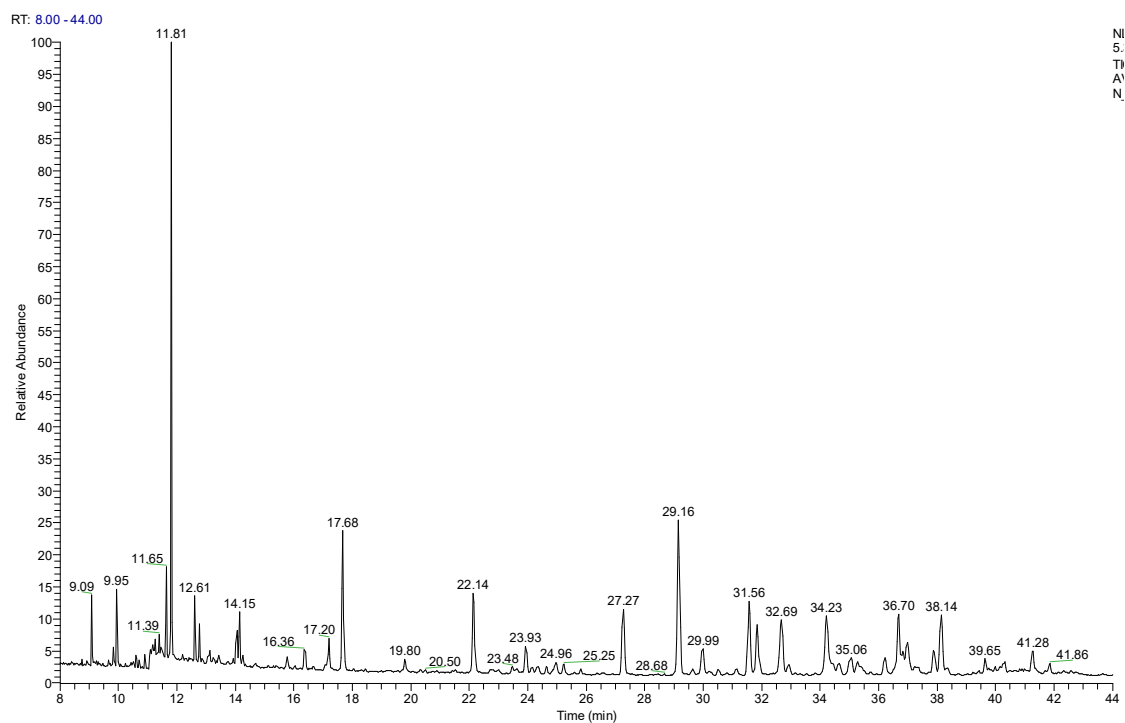


Figura 28. Cromatograma de GC-MS para a amostra S9.

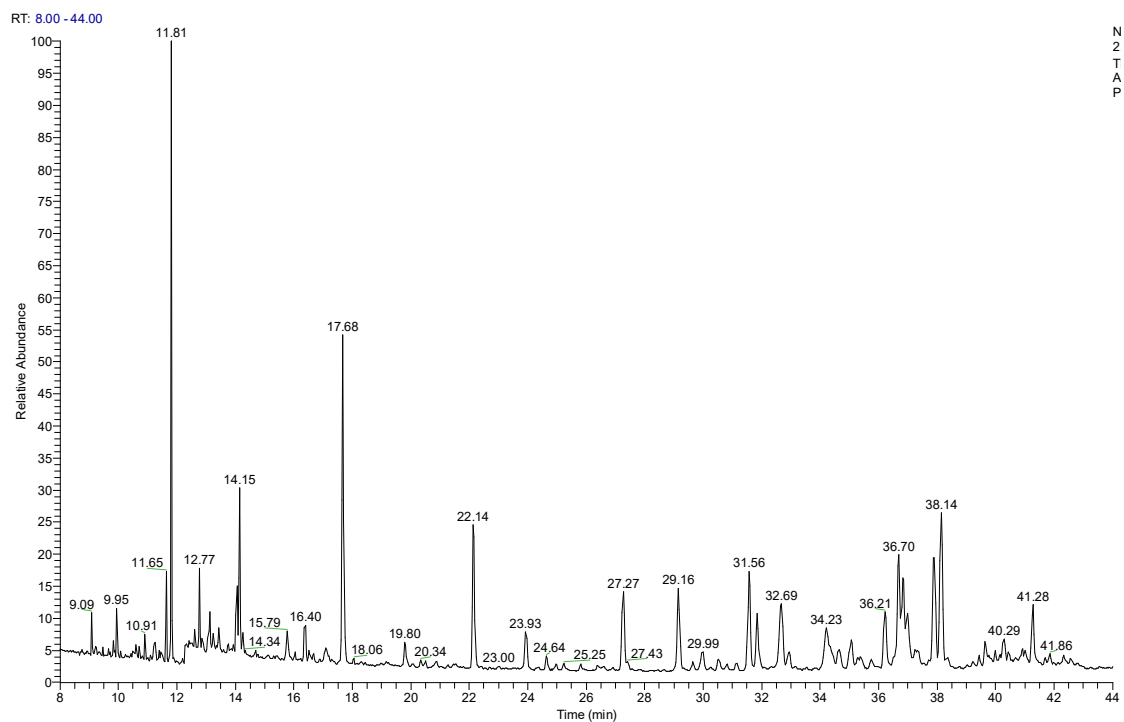


Figura 29. Cromatograma de GC-MS para a amostra S10.

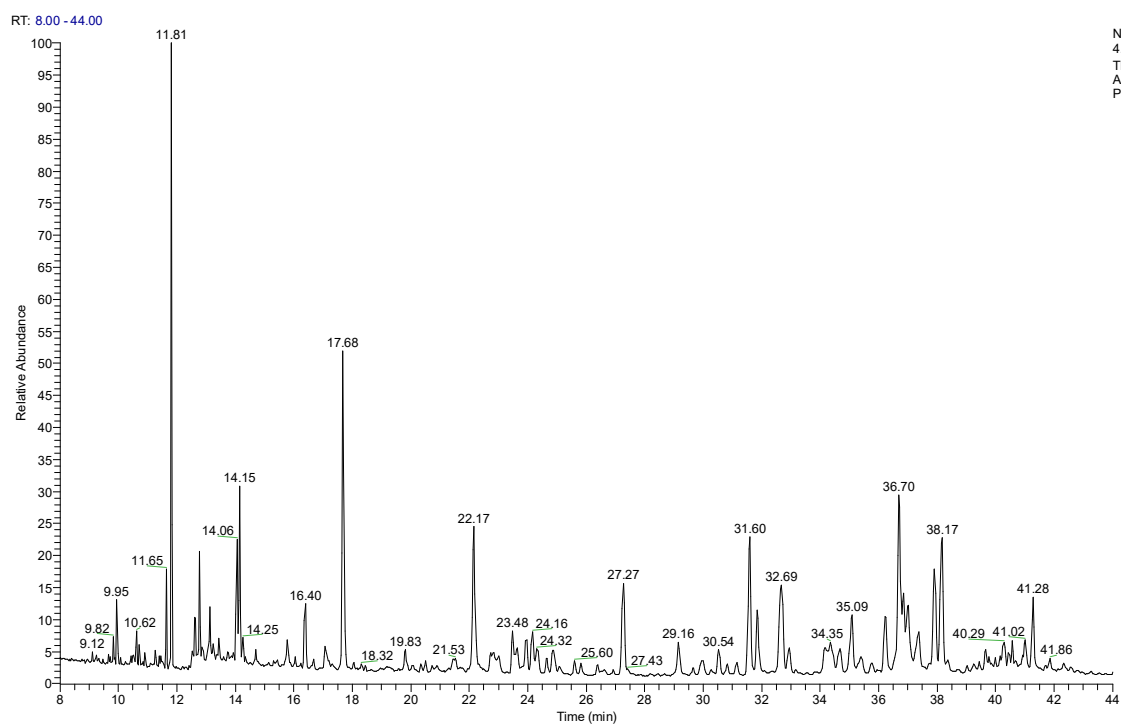


Figura 30. Cromatograma de GC-MS para a amostra S11.

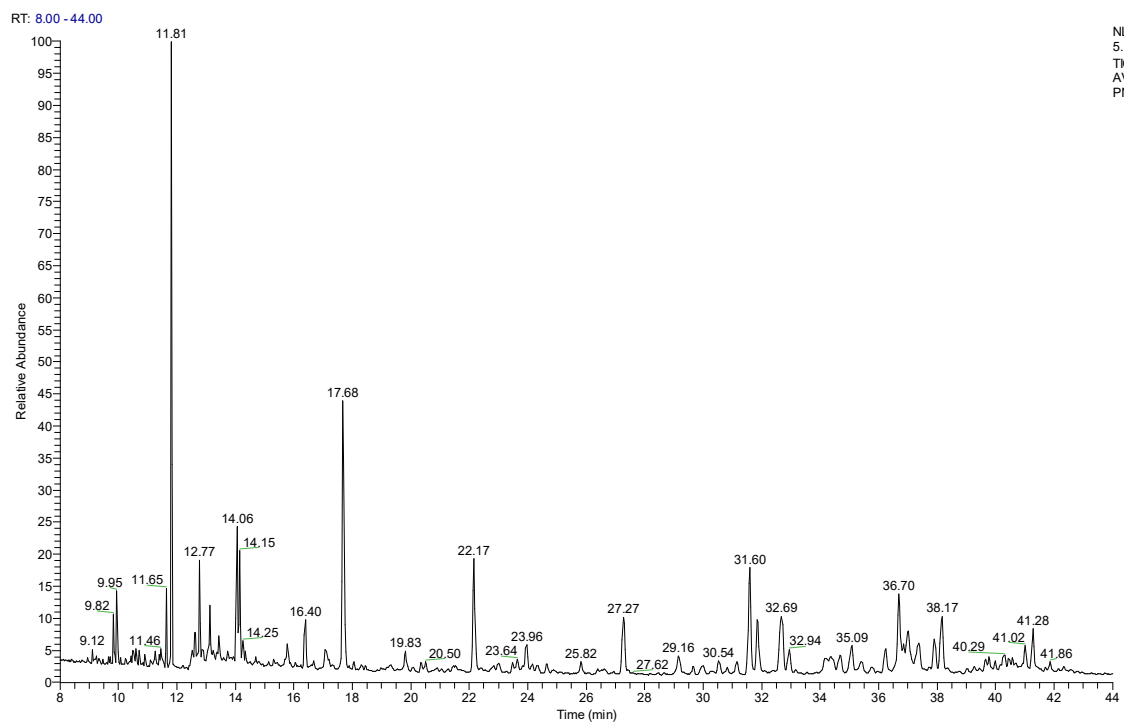


Figura 31. Cromatograma de GC-MS para a amostra S12.

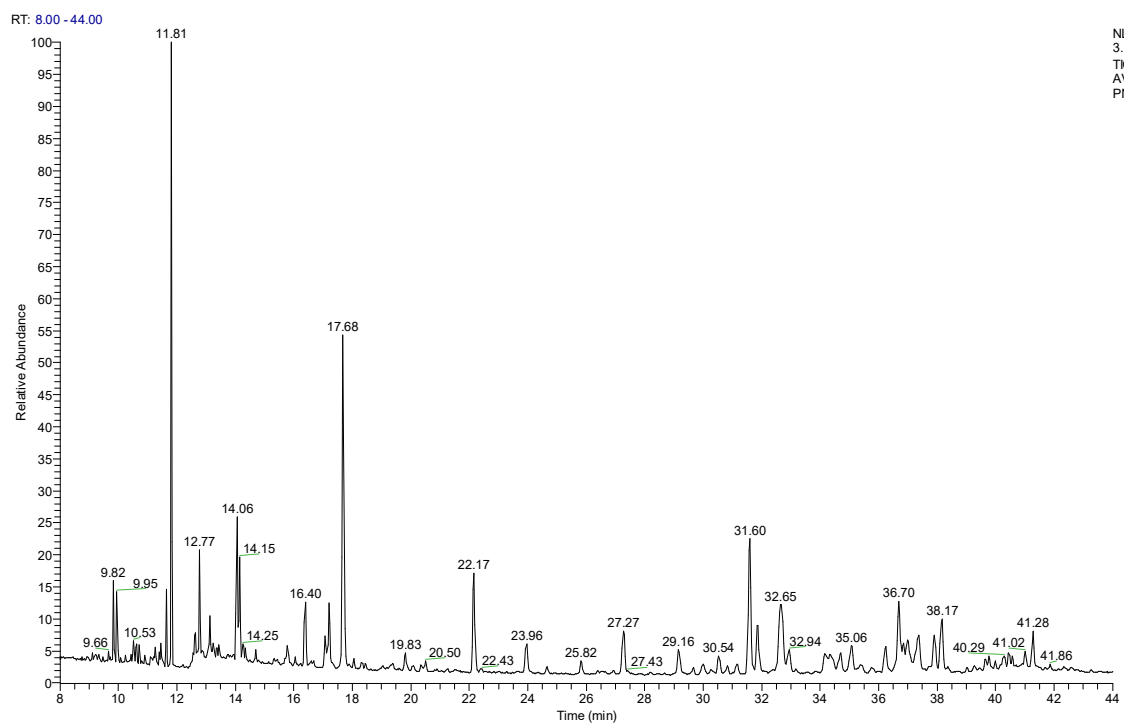


Figura 32. Cromatograma de GC-MS para a amostra S13.

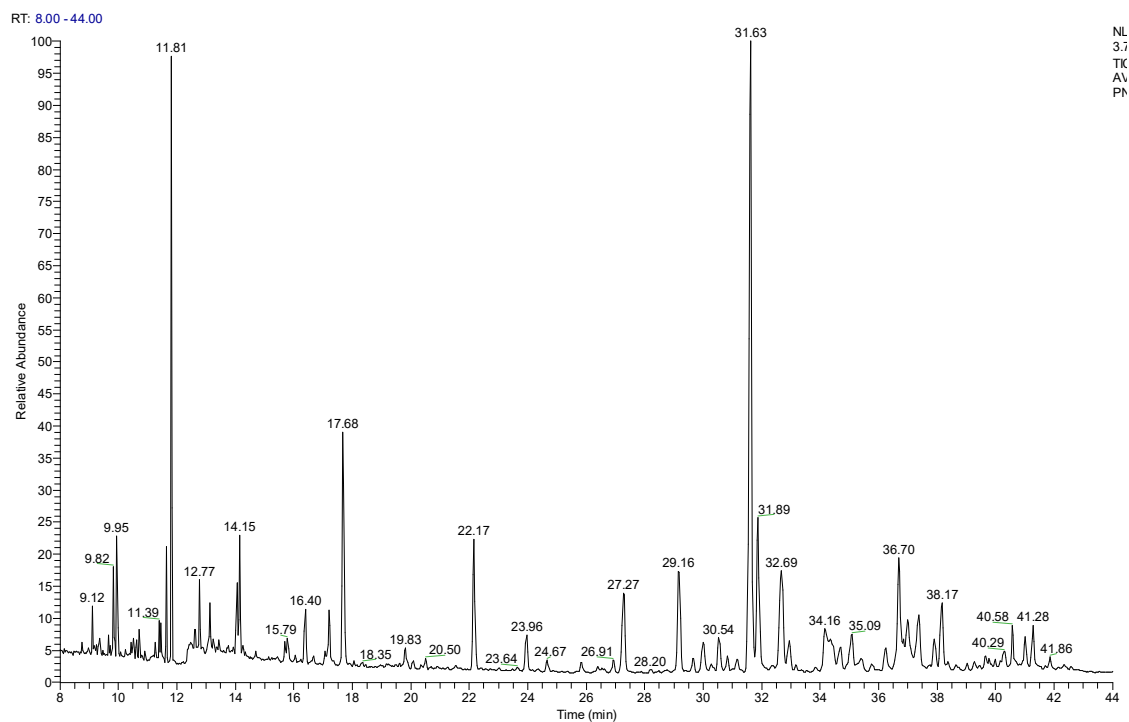


Figura 33. Cromatograma de GC-MS para a amostra S14.

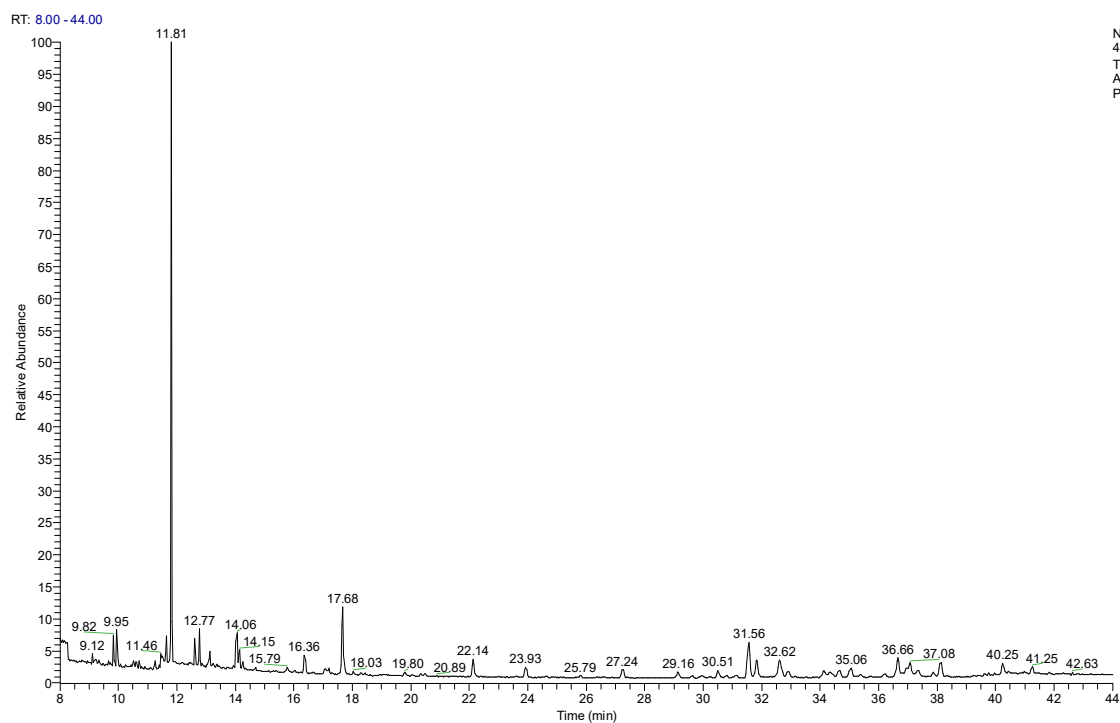


Figura 34. Cromatograma de GC-MS para a amostra S15.

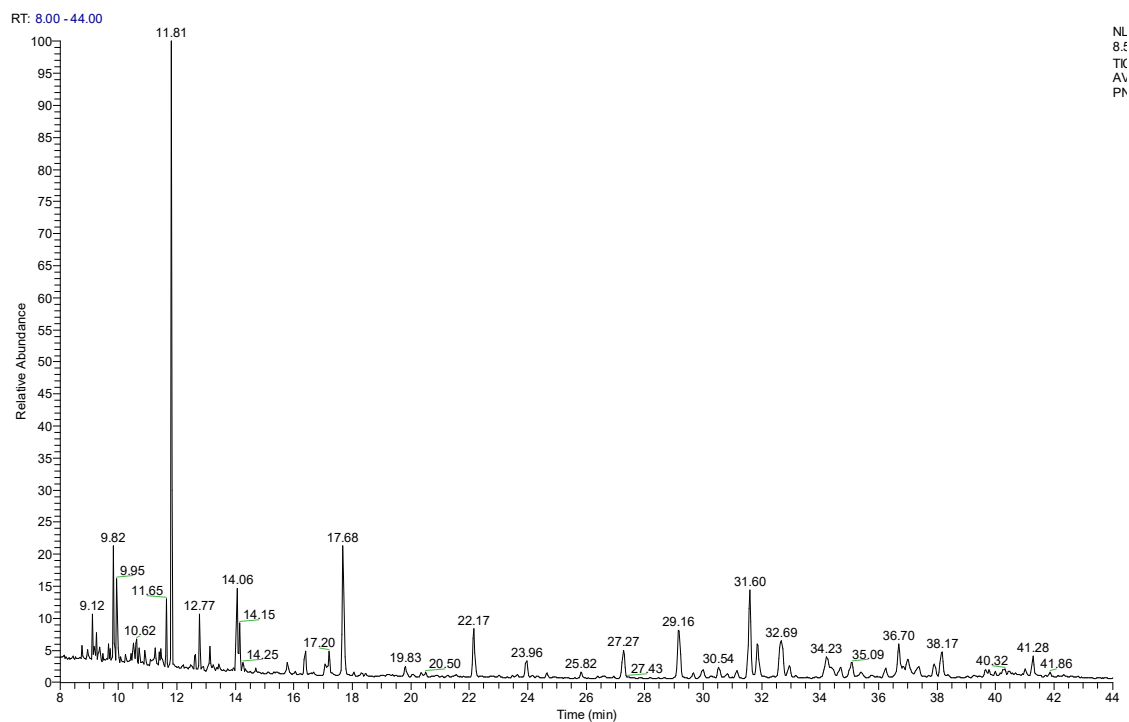


Figura 35. Cromatograma de GC-MS para a amostra S16.

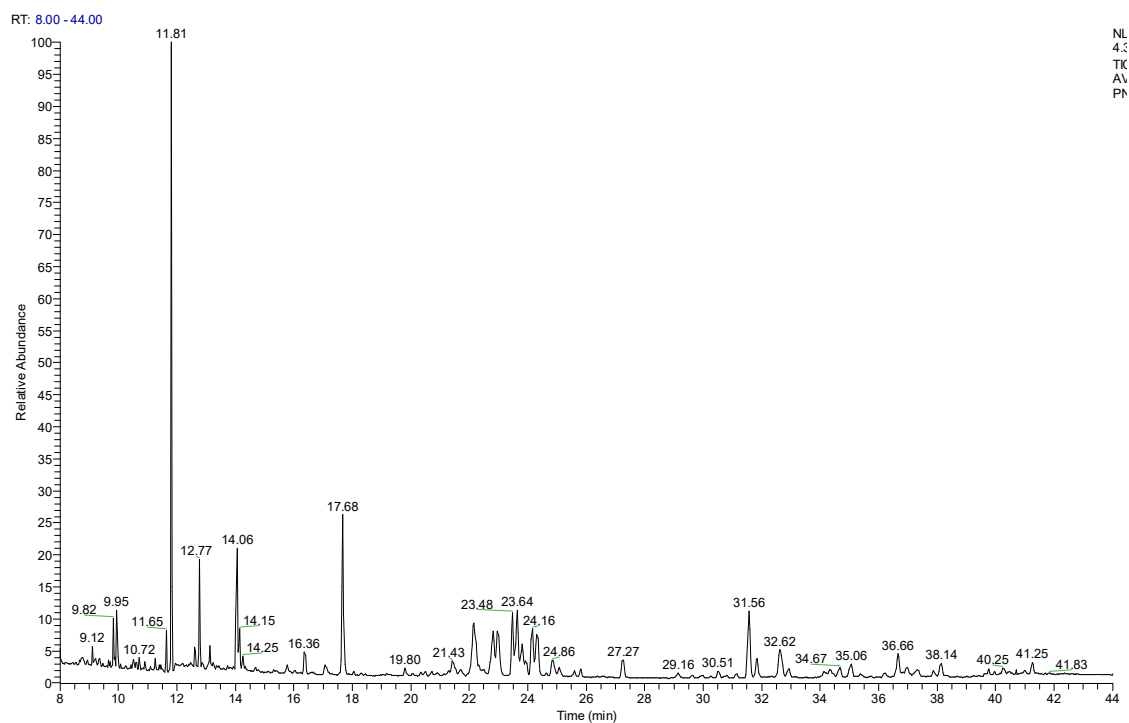


Figura 36. Cromatograma de GC-MS para a amostra S17.

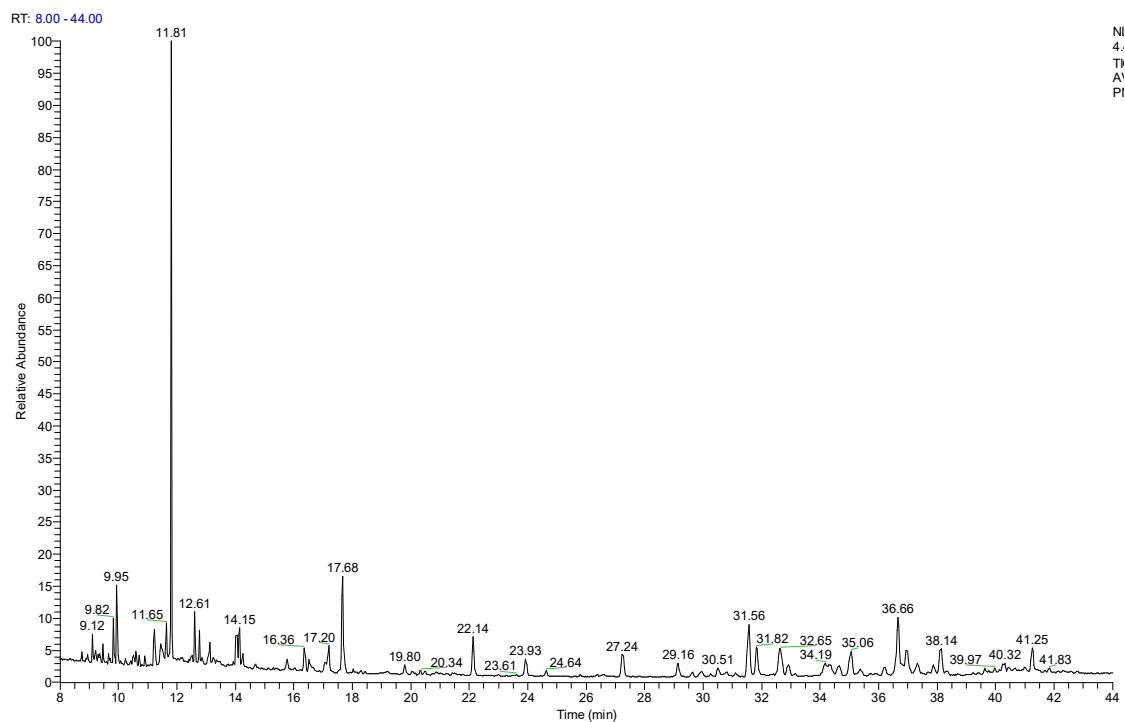


Figura 37. Cromatograma de GC-MS para a amostra S18.

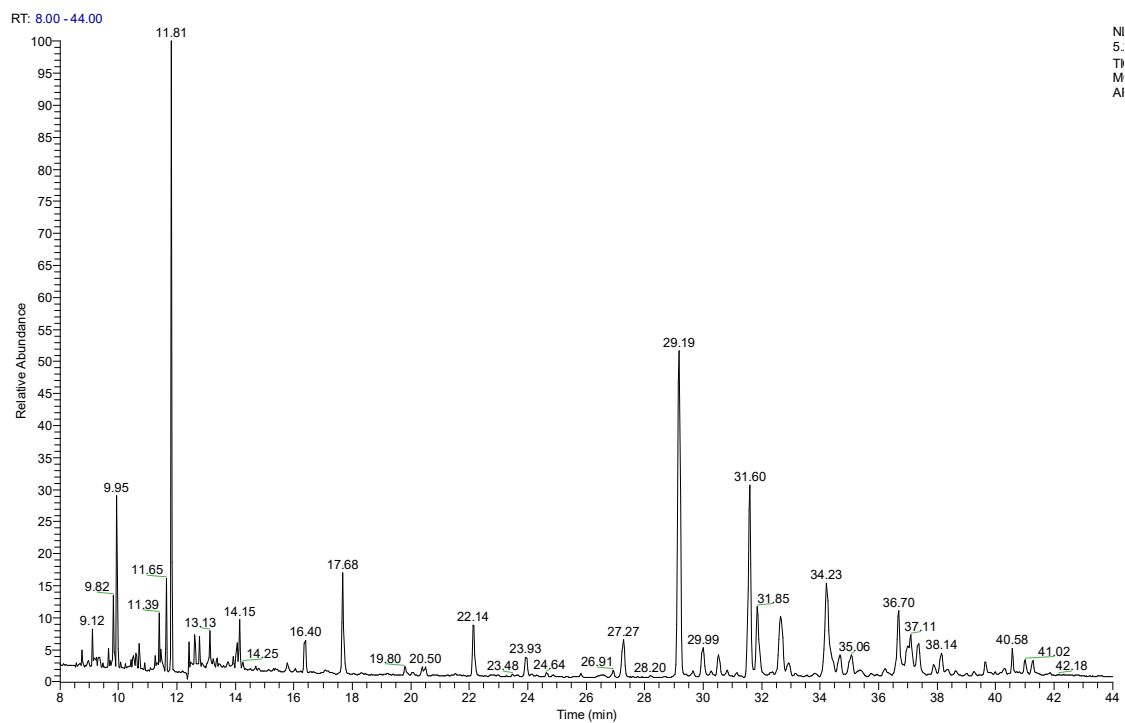


Figura 38. Cromatograma de GC-MS para a amostra S19.

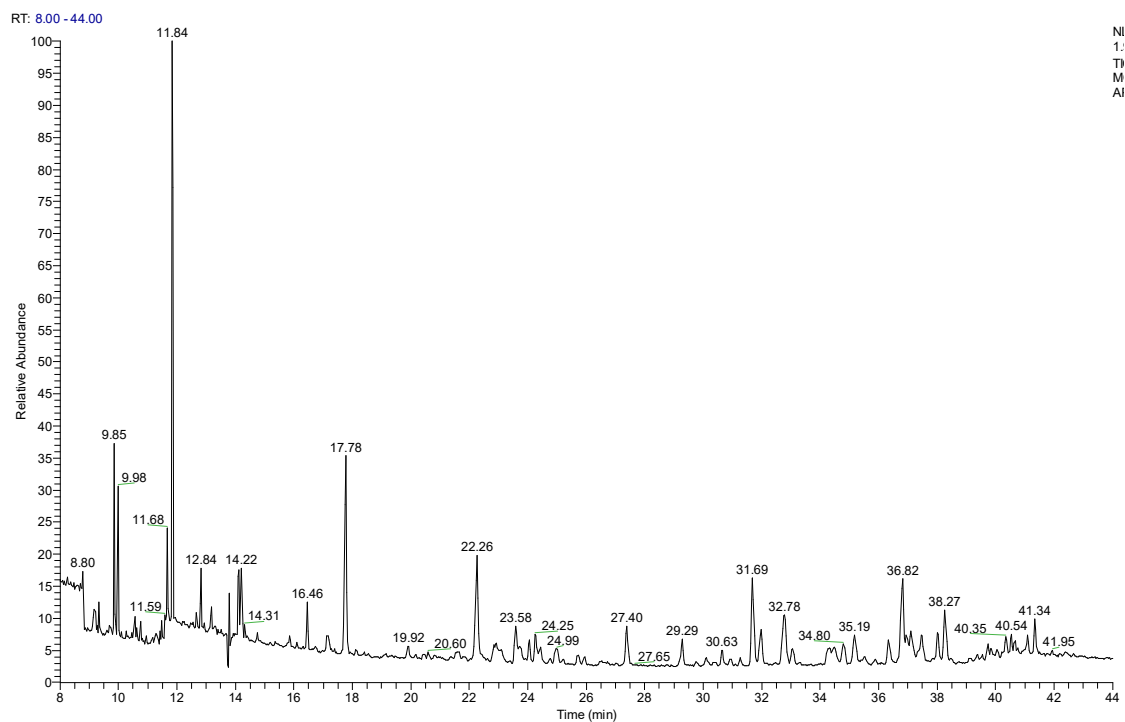


Figura 39. Cromatograma de GC-MS para a amostra S20.

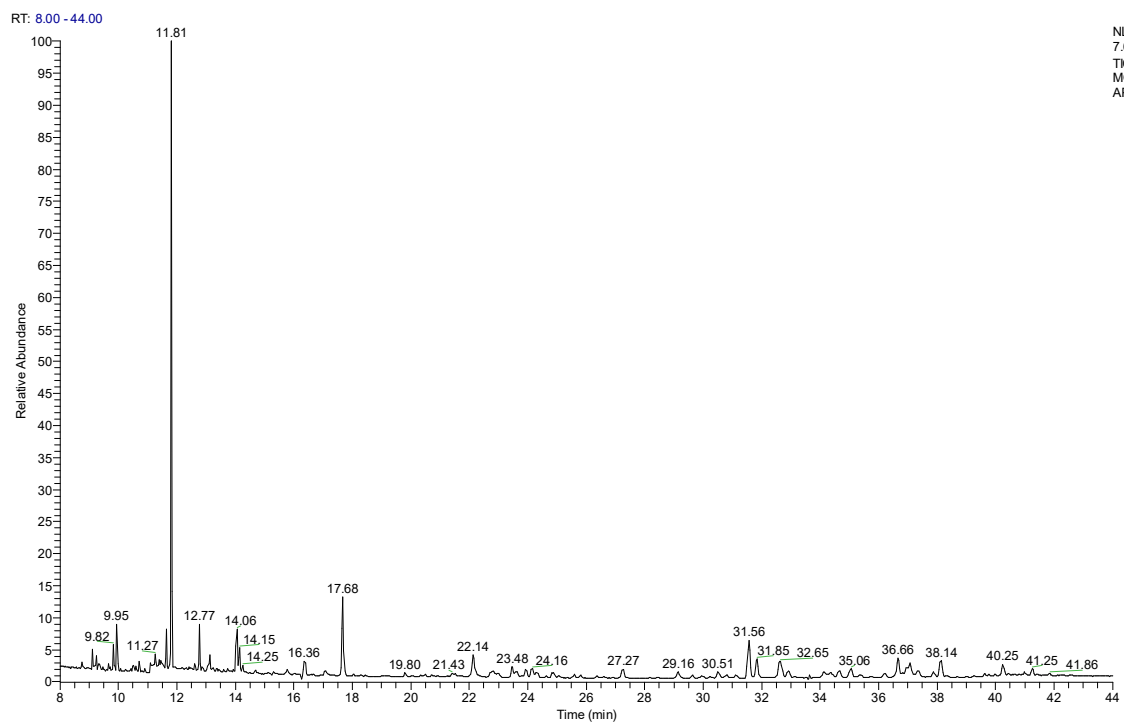


Figura 40. Cromatograma de GC-MS para a amostra S21.

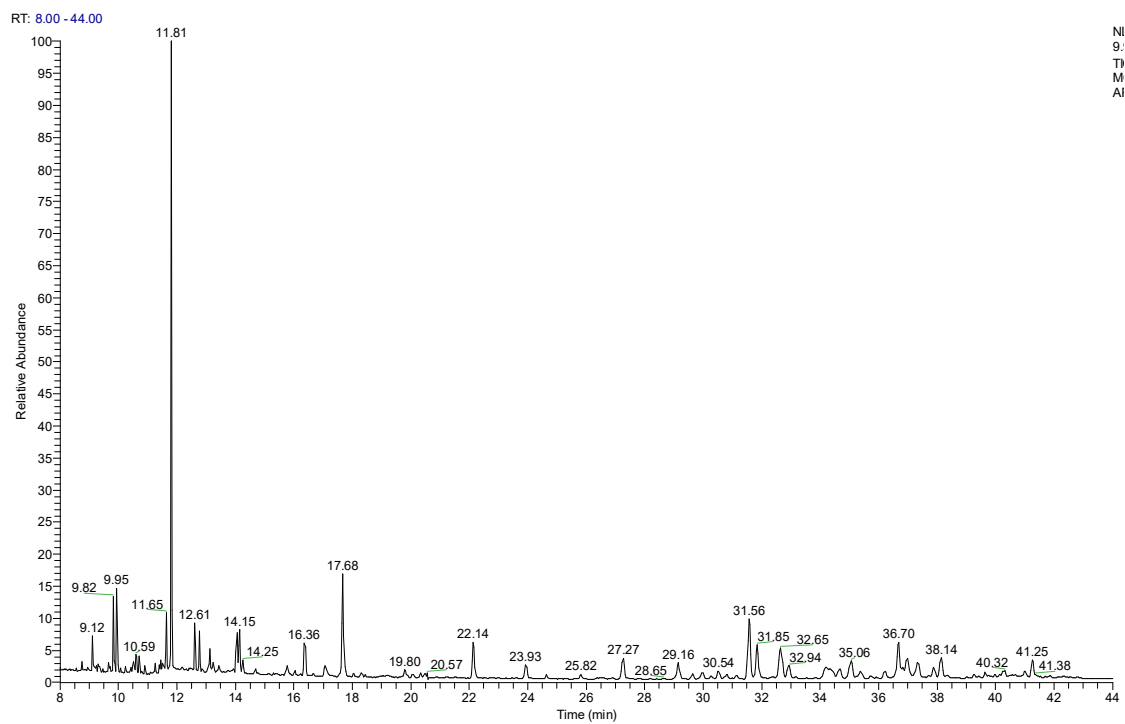


Figura 41. Cromatograma de GC-MS para a amostra S22.

11.2. Espectro de Massas dos lipídios identificados

11.2.1. *n*-álcoois

AVE8_SAPN_F301 #93 RT: 9.95 AV: 1 SB: 1 10.02 NL: 1.73E6
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

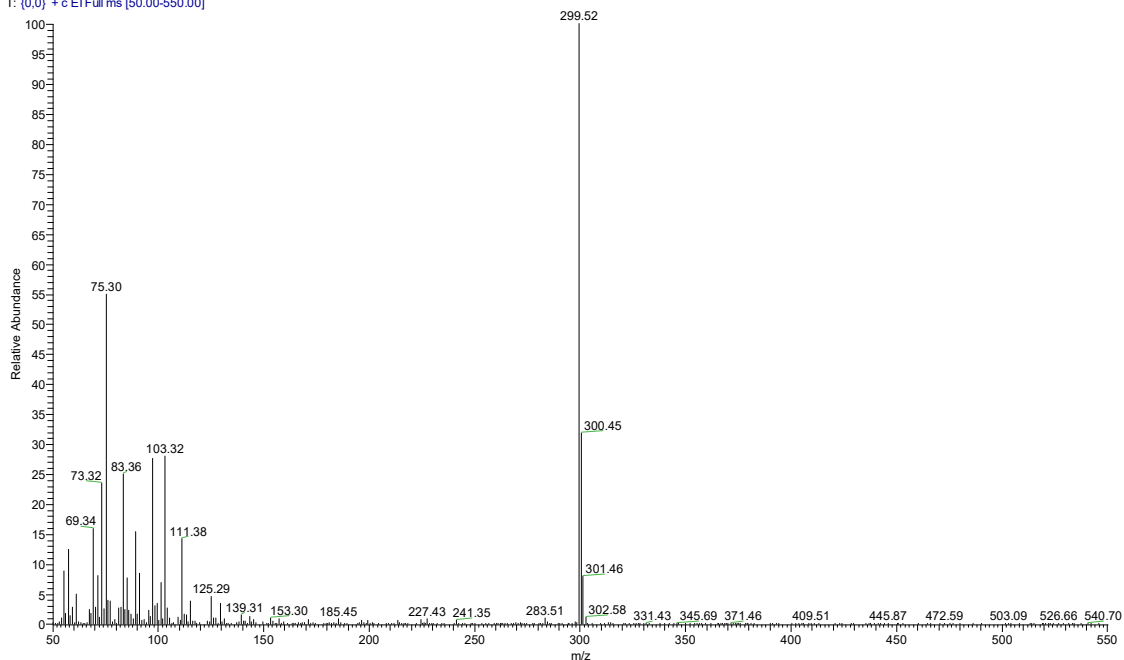


Figura 42. Espectro de massas do *n*-álcool C₁₆OH, RT: 9,95.

P5_2000_EST01 #145 RT: 11.62 AV: 1 SB: 1 11.39 NL: 6.53E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

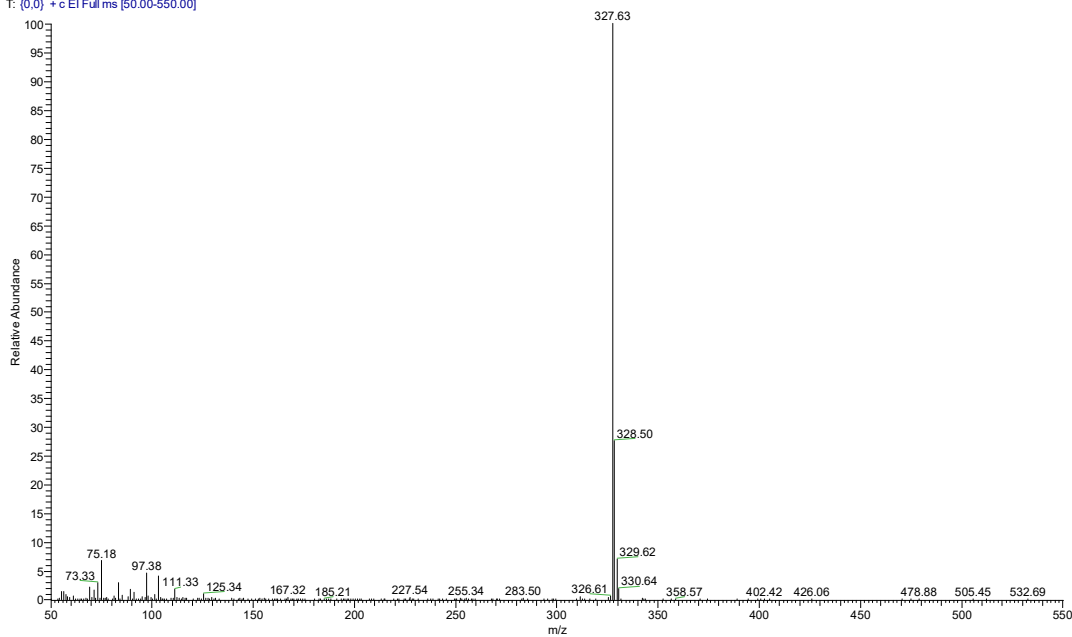


Figura 43. Espectro de massas do *n*-álcool C₁₈OH, RT: 11,39.

AVE8 SAPN F301 #151 RT: 11.81 AV: 1 SB: 1 11.71 NL: 1.25E7
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

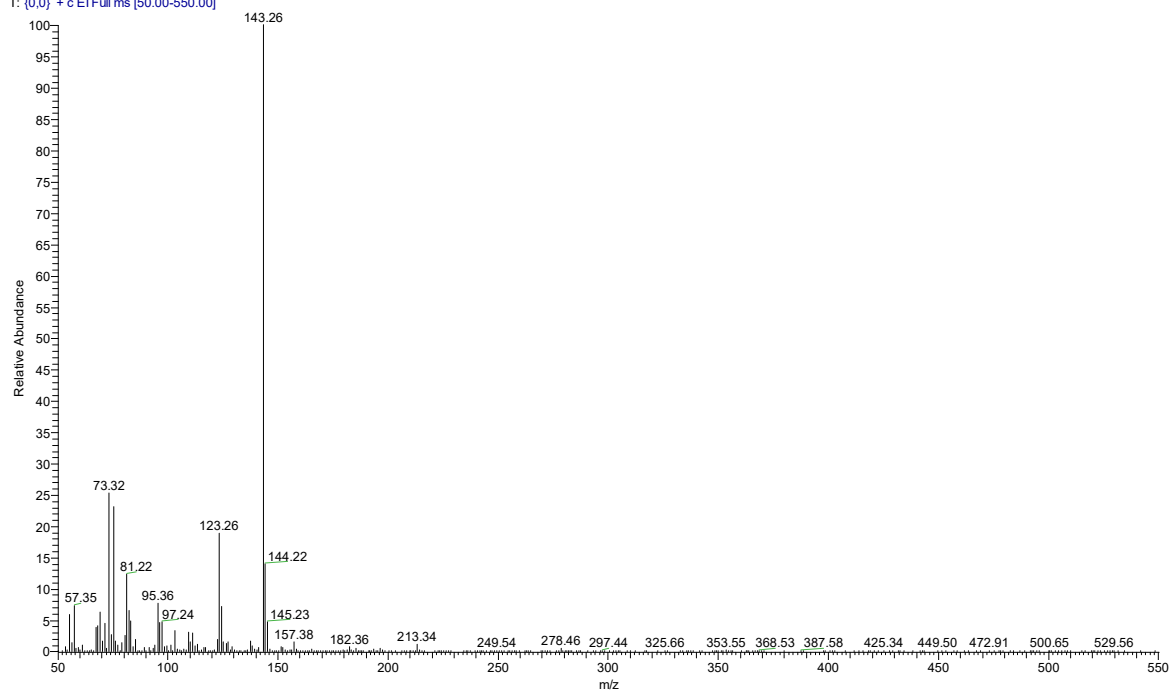


Figura 44. Espectro de massas do fitol, RT: 11,81.

AVE8 SAPN F301 #224 RT: 14.15 AV: 1 SB: 1 14.18 NL: 3.38E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

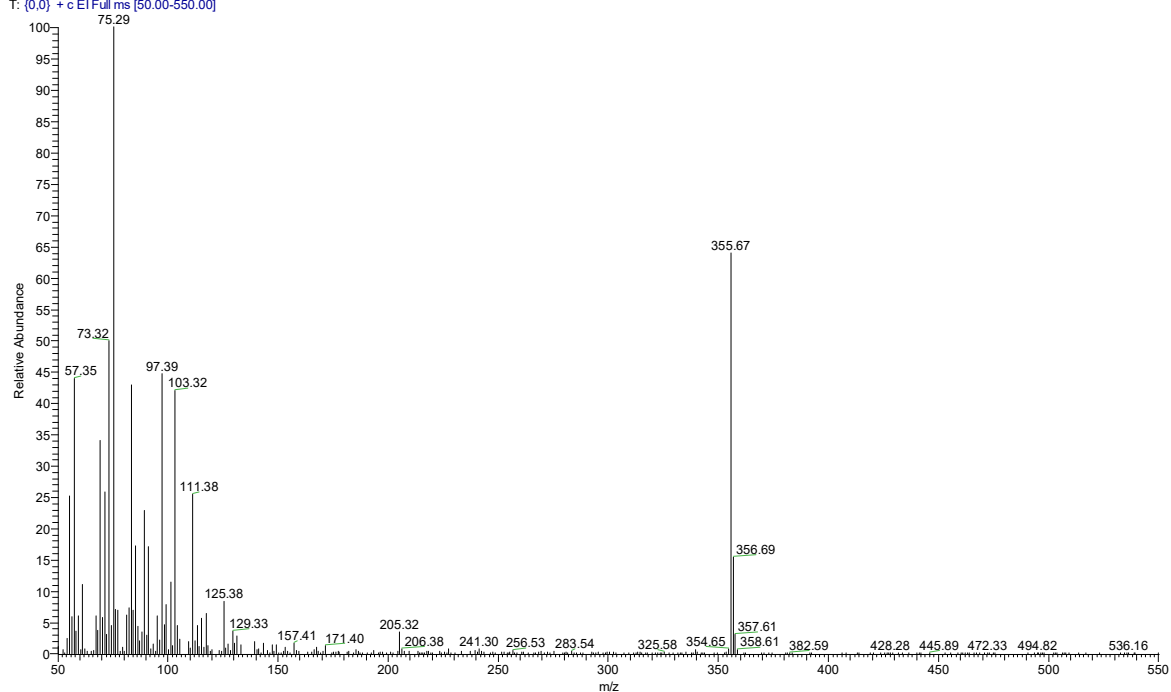


Figura 45. Espectro de massas do *n*-álcool C₂₀OH, RT: 14,15.

AVE8 SAPN F301 #334 RT: 17.68 AV: 1 SB: 1 17.78 NL: 1.14E6
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

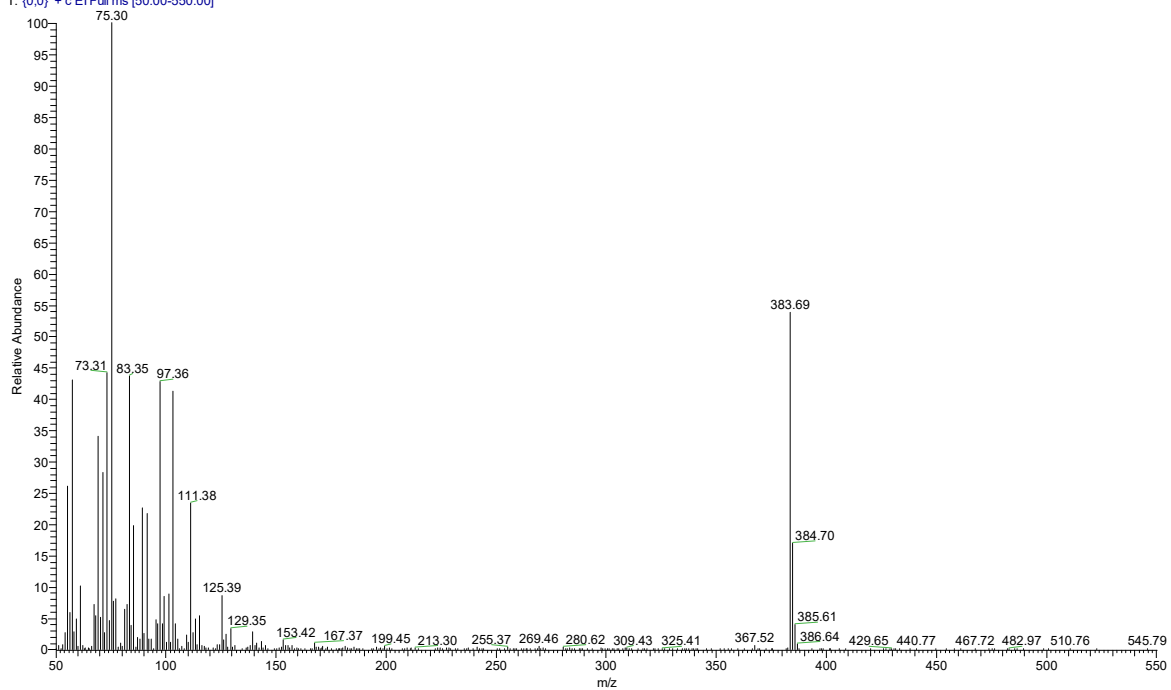


Figura 46. Espectro de massas do *n*-álcool C₂₂OH, RT: 17,68.

P5 2000 EST01 #474 RT: 22.17 AV: 1 SB: 1 21.88 NL: 4.67E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

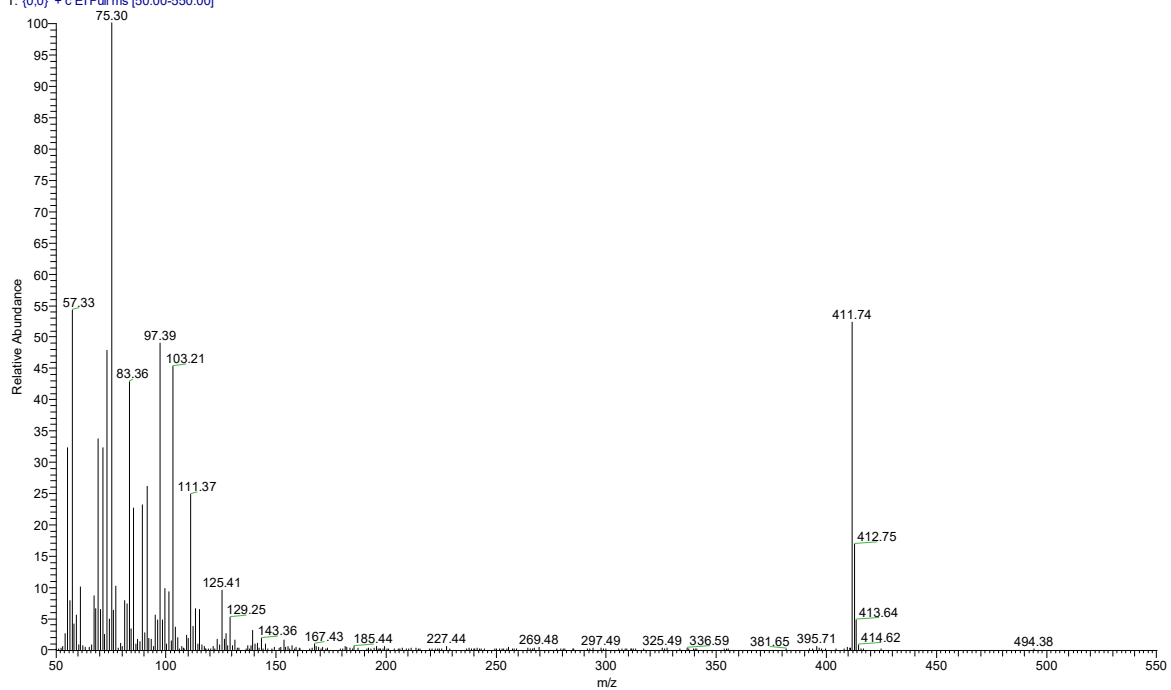


Figura 47. Espectro de massas do *n*-álcool C₂₄OH, RT: 22,17.

P5 2000 EST01 #633 RT: 27.27 AV: 1 SB: 1 27.59 NL: 1.84E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

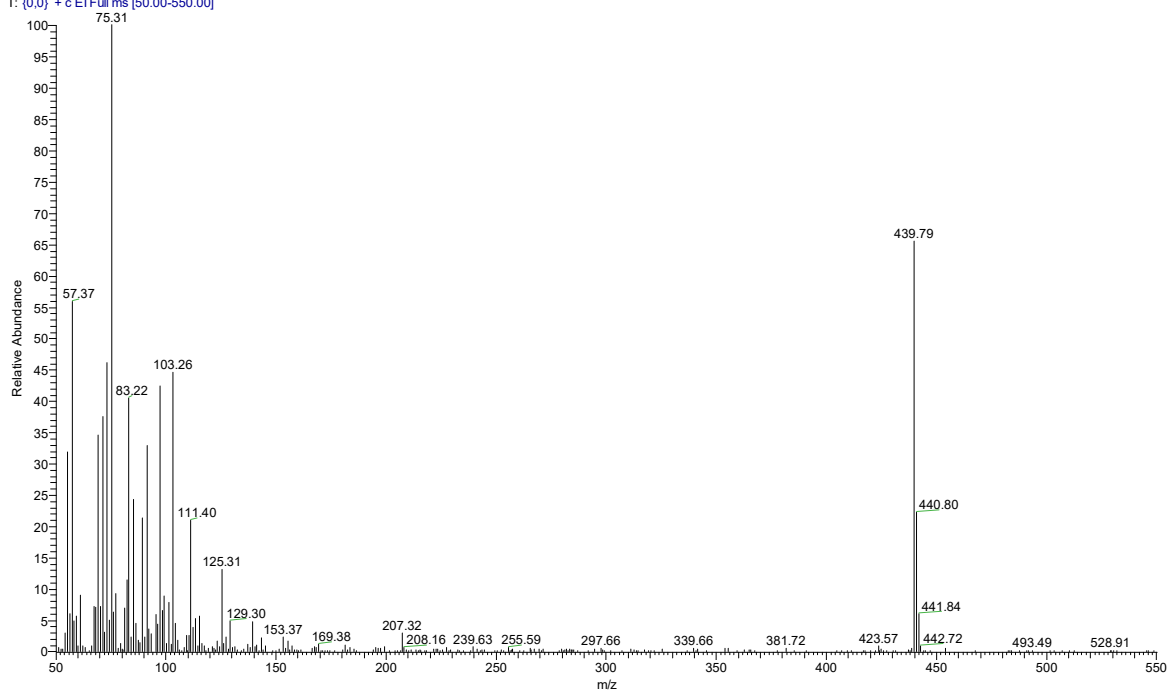


Figura 48. Espectro de massas do *n*-álcool C₂₆OH, RT: 27,27.

AVE8 SAPN F301 #801 RT: 32.65 AV: 1 SB: 1 32.46 NL: 3.07E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

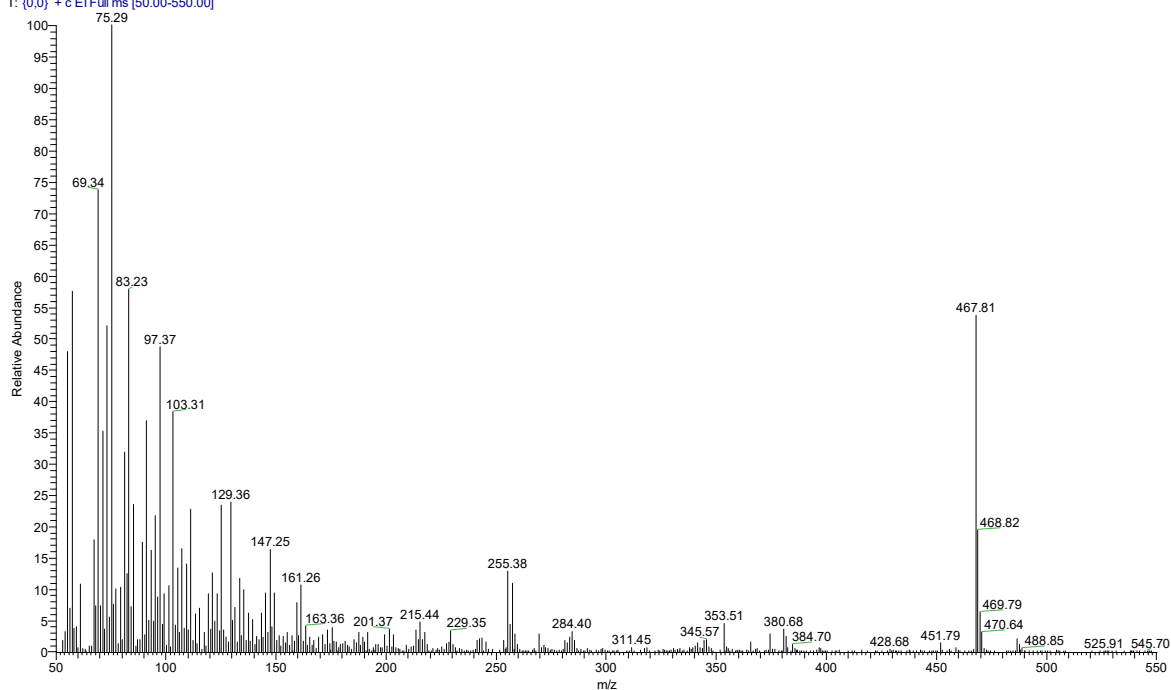


Figura 49. Espectro de massas do *n*-álcool C₂₈OH, RT: 32,65.

AVE8 SAPN F301 #972 RT: 38.14 AV: 1 SB: 1 38.01 NL: 2.56E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

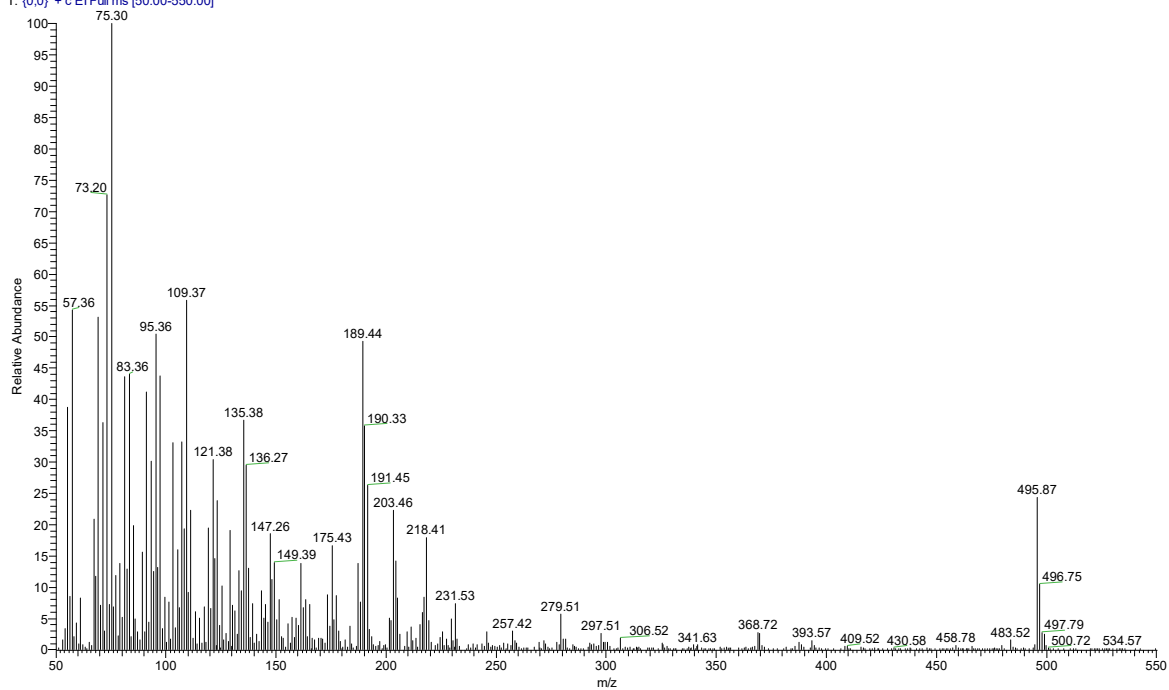


Figura 50. Espectro de massas do *n*-álcool C₃₀OH, RT: 38,14.

AVE8 SAPN F301 #1087 RT: 41.83 AV: 1 SB: 1 41.70 NL: 6.90E4
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

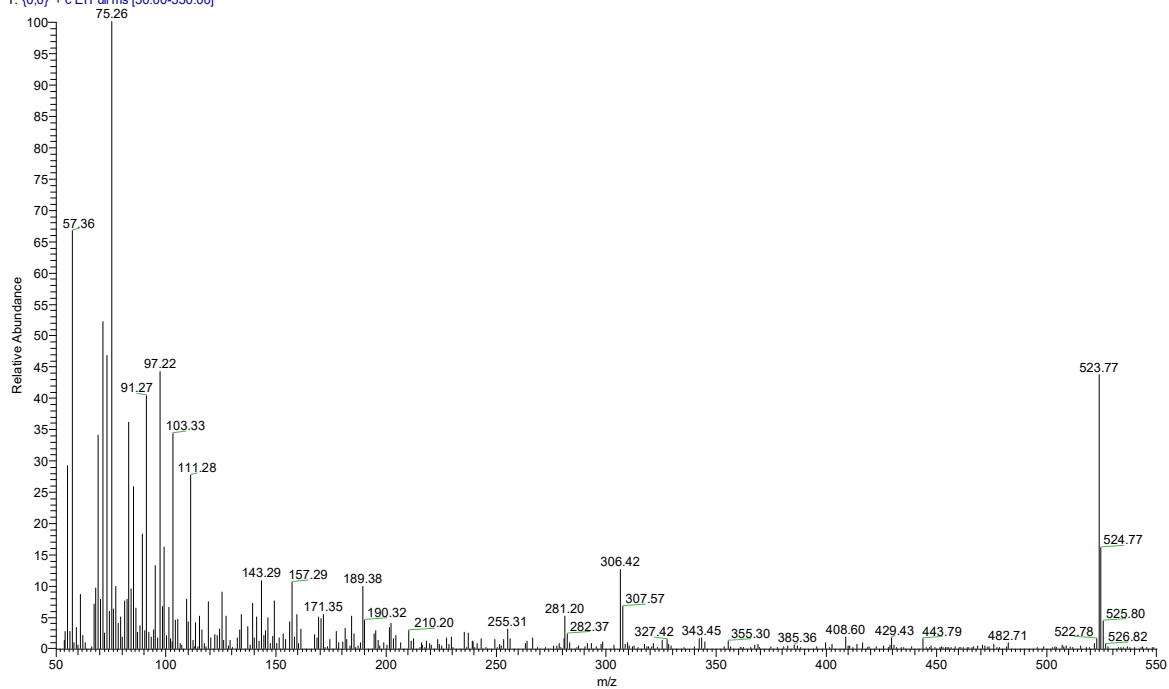


Figura 51. Espectro de massas do *n*-álcool C₃₂OH, RT: 41,83.

11.2.2. Esteróis

P5_2000_EST01 #693 RT: 29.19 AV: 1 SB: 1 29.45 NL: 1.99E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

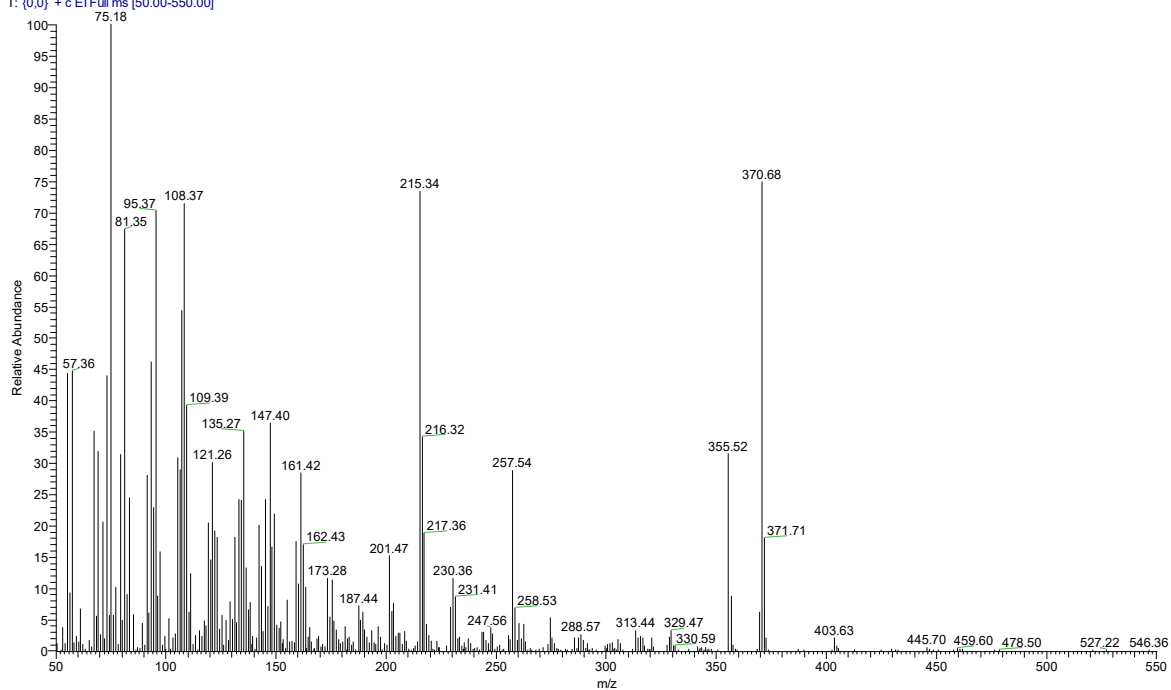


Figura 52. Espectro de massas do coprostanol, RT: 29,19.

AVE8 SAPN_F301 #707 RT: 29.64 AV: 1 SB: 1 29.51 NL: 4.18E4
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

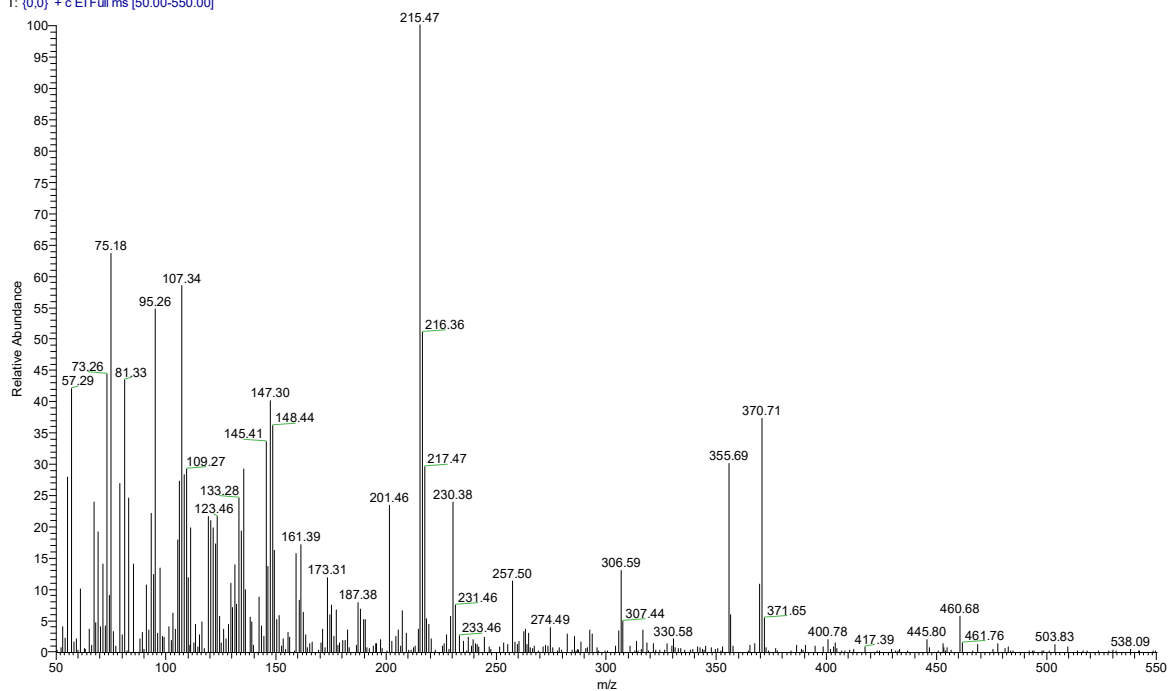


Figura 53. Espectro de massas do epicoprostanol, RT: 29,64.

AVE8 SAPN F301 #734 RT: 30.51 AV: 1 SB: 2 30.41-30.44 NL: 3.21E4
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

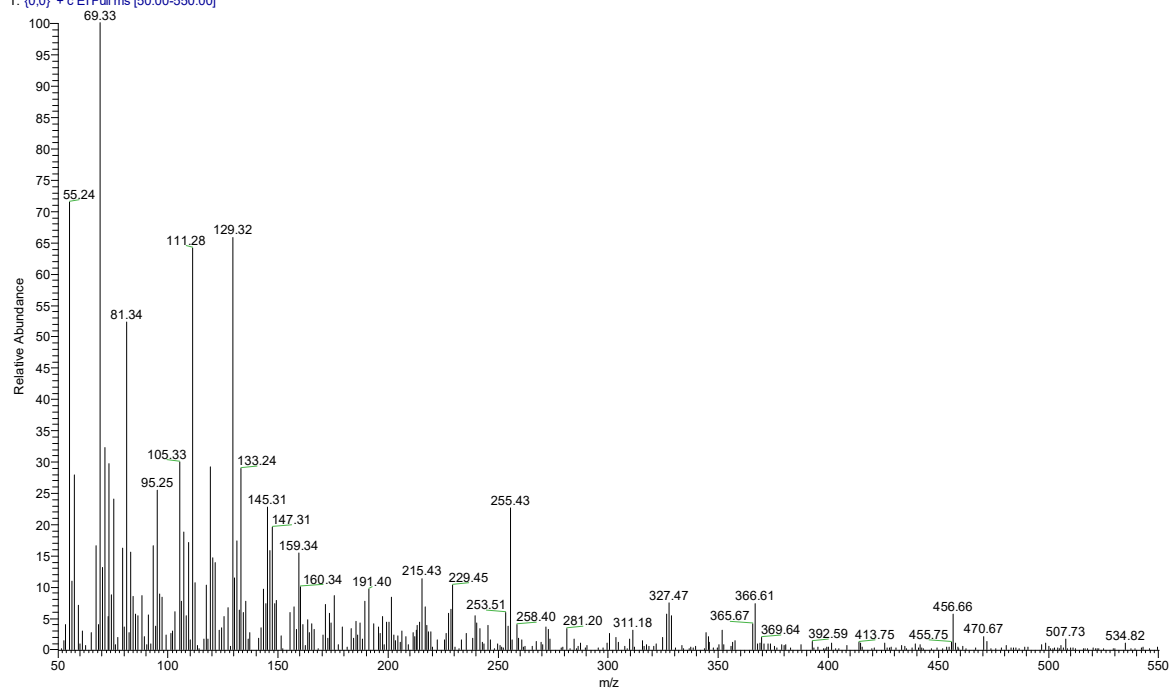


Figura 54. Espectro de massas do diidrocolesterol, RT: 30,51.

P5 2000 EST01 #739 RT: 30.67 AV: 1 SB: 1 30.35 NL: 4.13E4
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

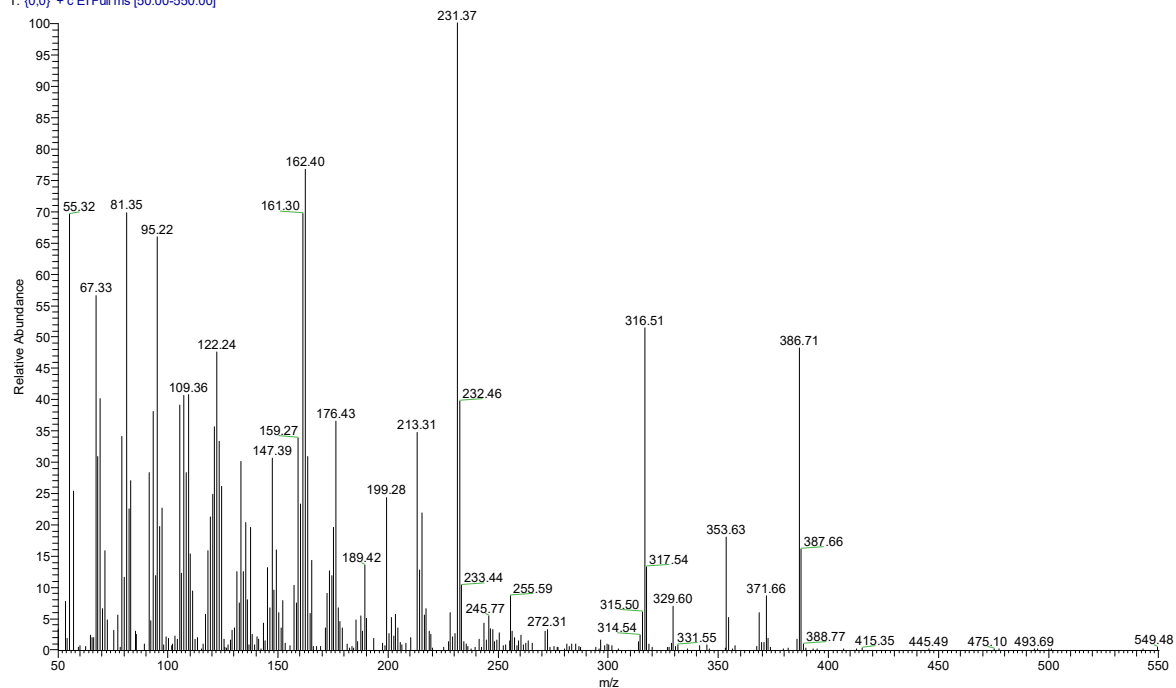


Figura 55. Espectro de massas da coprostanona (estanona padrão), RT: 30,67.

P5 2000 EST01 #768 RT: 31.60 AV: 1 SB: 1 31.44 NL: 1.90E5
T: {0,0} + c EI Full ms [50.00-550.00]

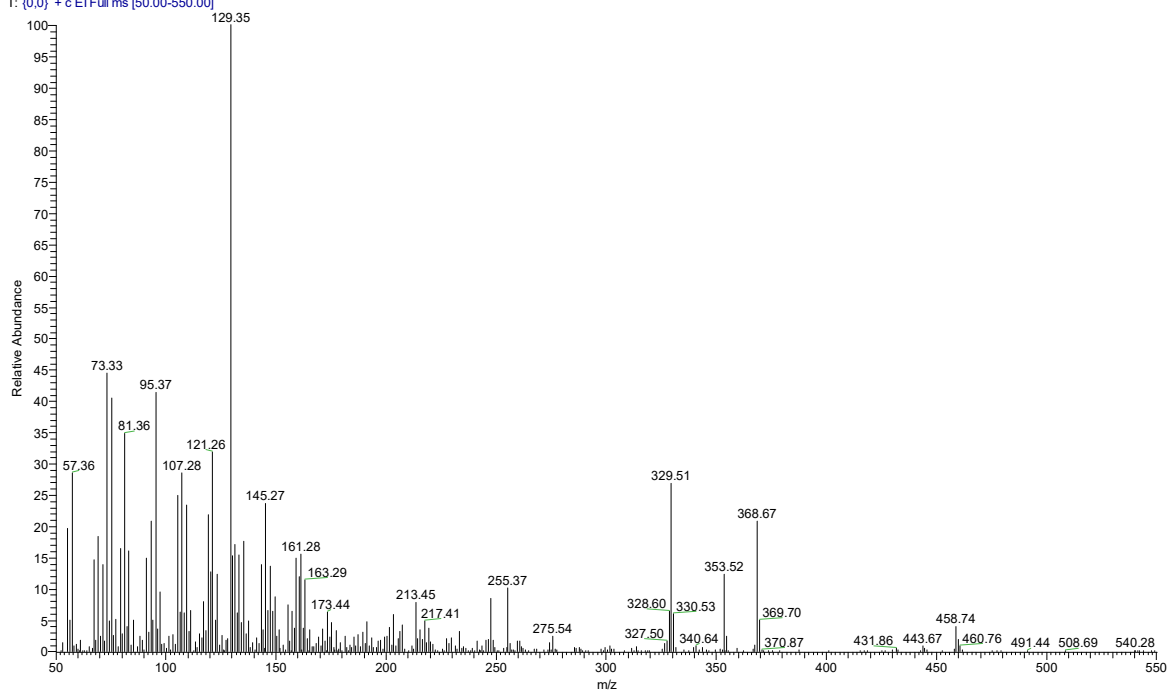


Figura 56. Espectro de massas do colesterol, RT: 31,60.

P5 2000 EST01 #777 RT: 31.89 AV: 1 SB: 1 32.14 NL: 2.43E5
T: {0,0} + c EI Full ms [50.00-550.00]

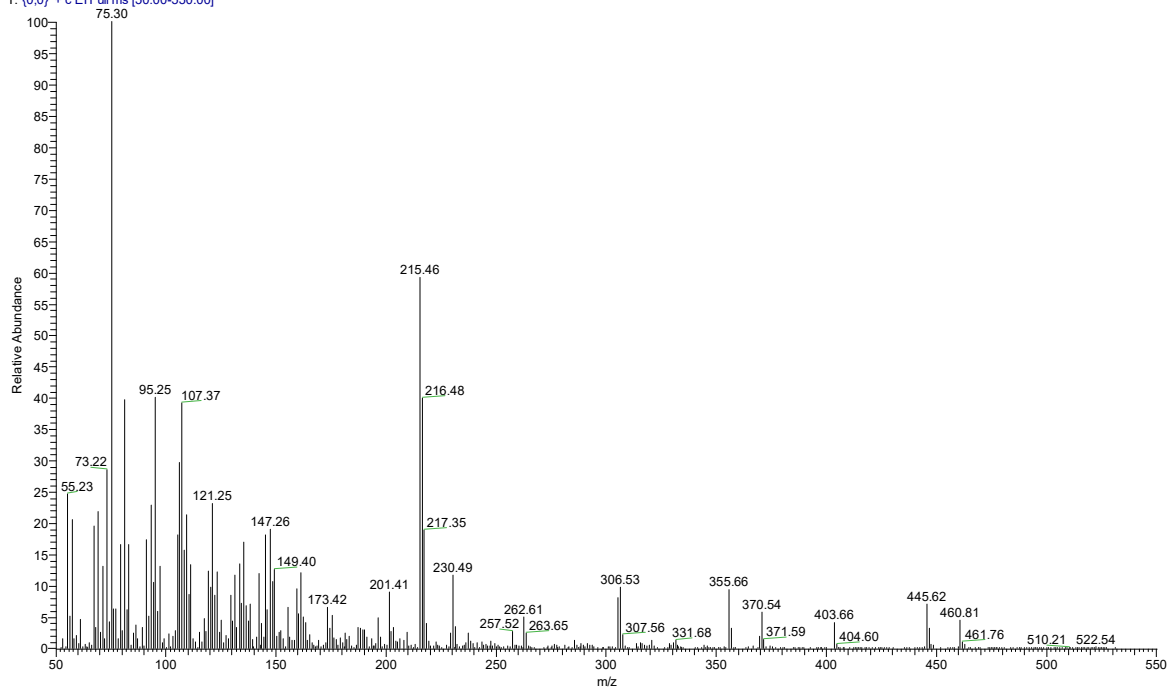


Figura 57. Espectro de massas do colestanol, RT: 31,89.

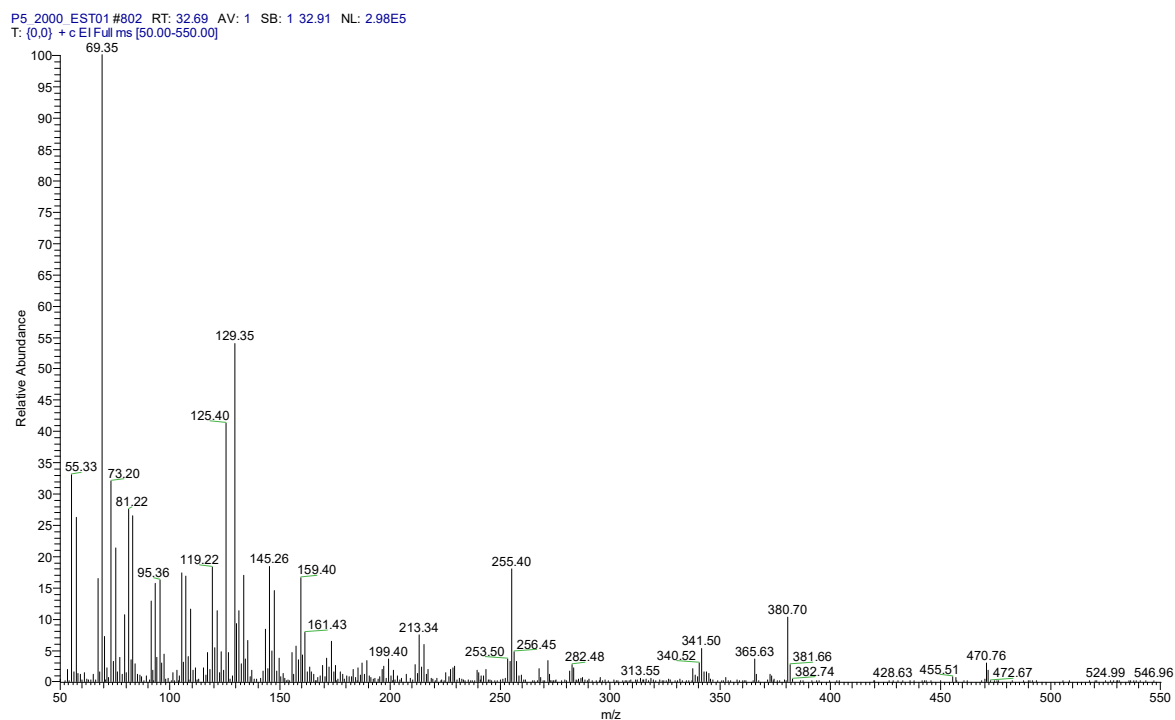


Figura 58. Espectro de massas do brassicasterol, RT: 32,69.

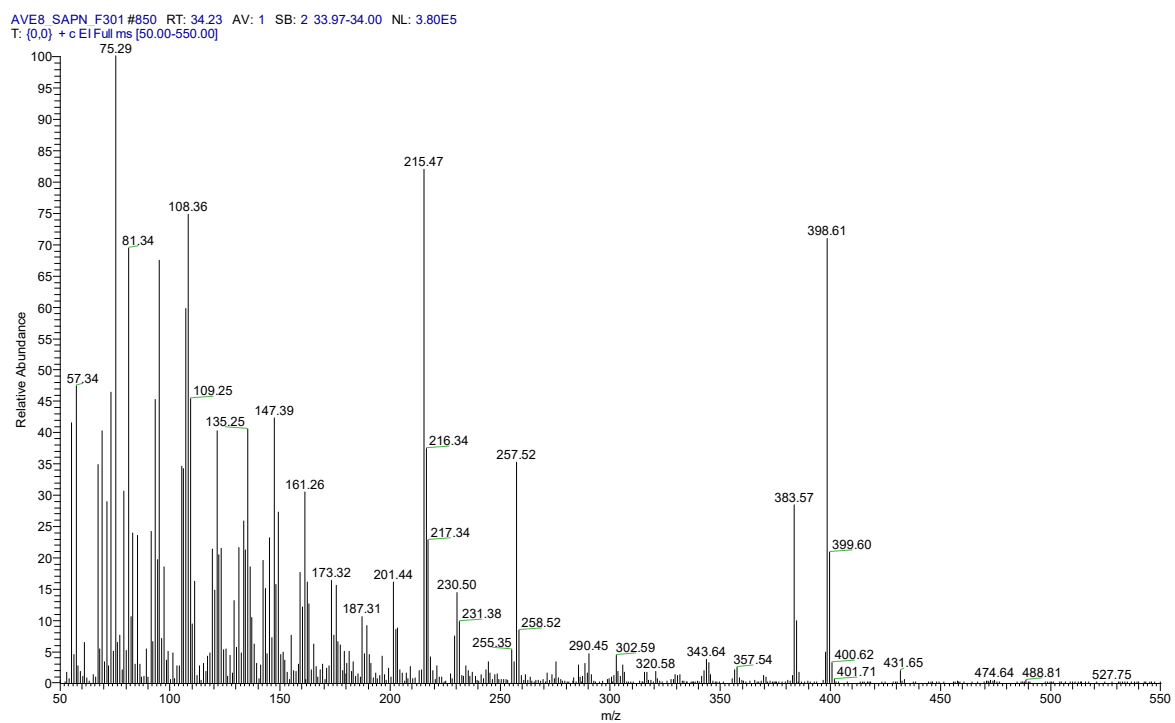


Figura 59. Espectro de massas do etilcoprostanol, RT: 34,23.

P5 2000 EST01 #855 RT: 34.39 AV: 1 SB: 1 34.19 NL: 1.67E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

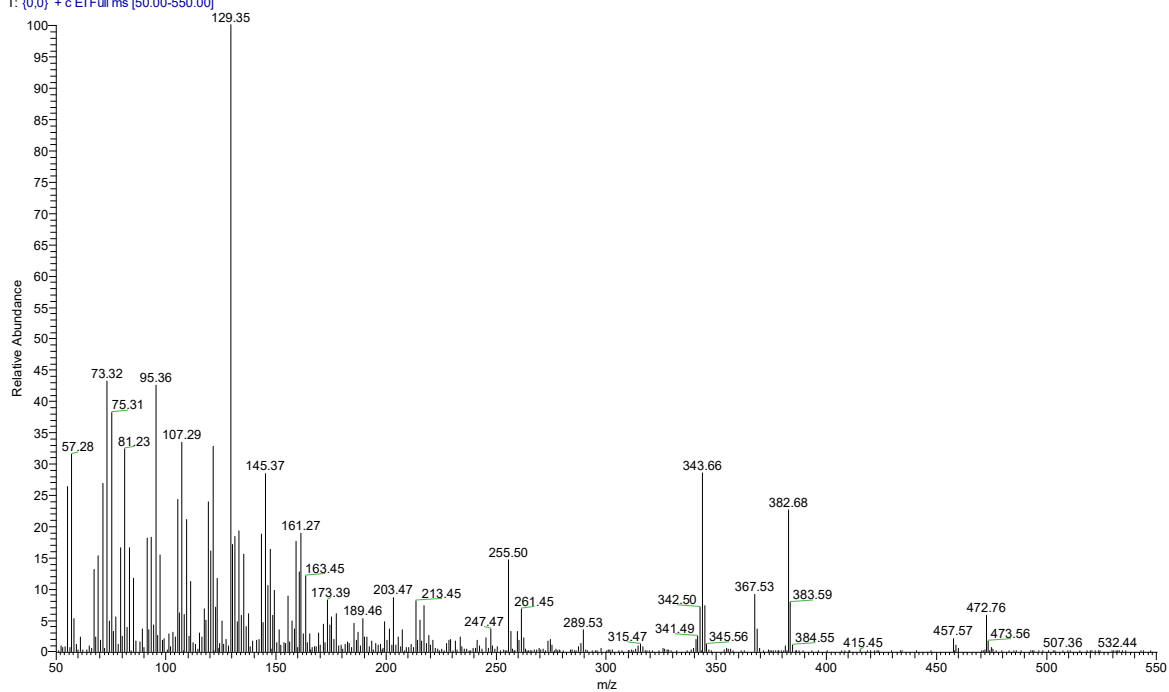


Figura 60. Espectro de massas do campesterol, RT: 34,39.

P5 2000 EST01 #877 RT: 35.09 AV: 1 SB: 1 35.35 NL: 2.33E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

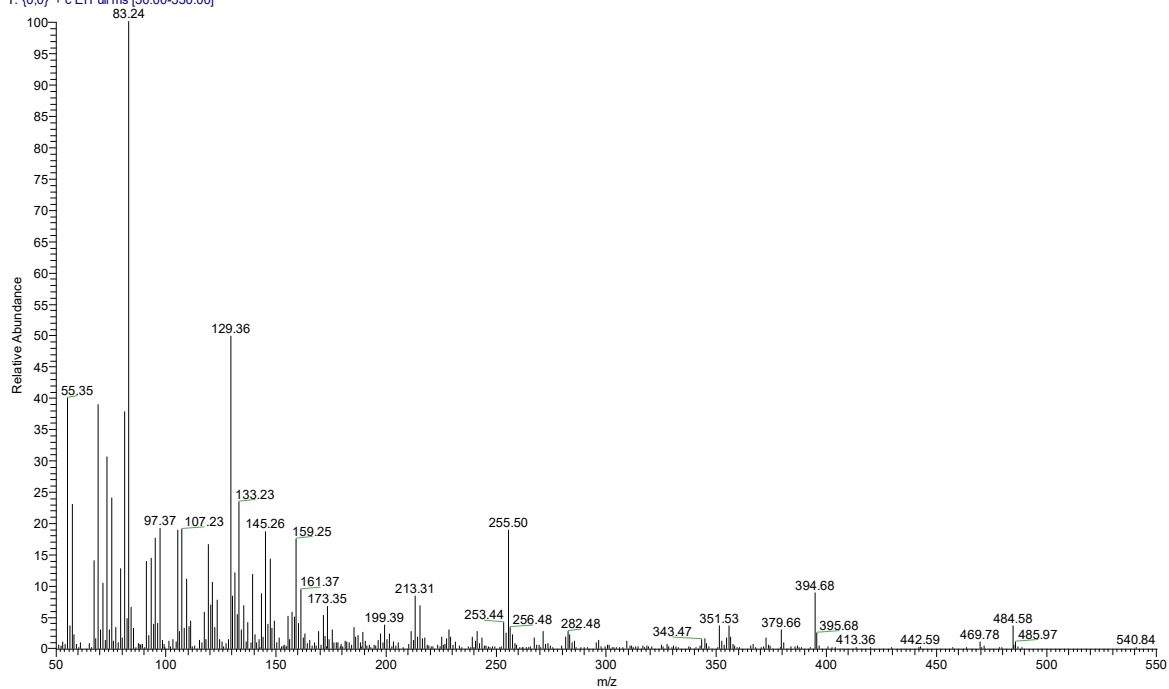


Figura 61. Espectro de massas do estigmasterol. RT: 35,09.

P5_2000_EST01#928 RT: 36.73 AV: 1 SB: 1 36.50 NL: 1.36E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

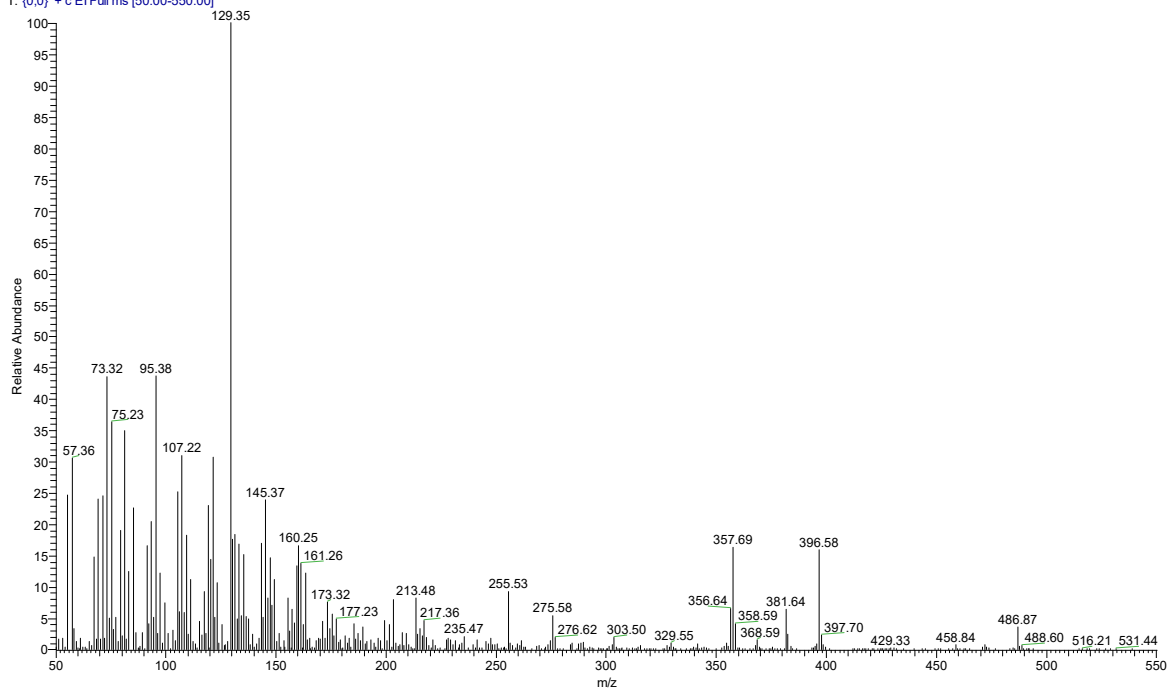


Figura 62. Espectro de massas do sitosterol, RT: 36,73.

AVE8_SAPN_F301#936 RT: 36.98 AV: 1 SB: 1 37.14 NL: 1.93E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

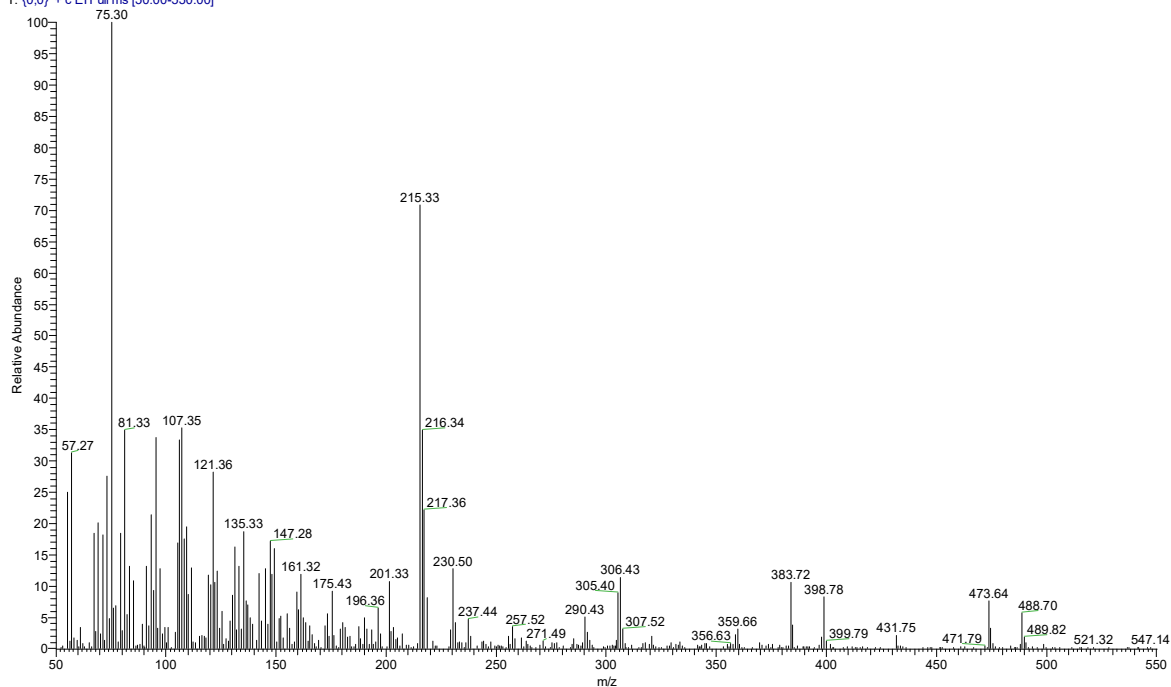


Figura 63. Espectro de massas do sitostanol, RT: 36,98.

MOND1 SAPN F302 #947 RT: 37.34 AV: 1 SB: 1 37.27 NL: 1.24E4
T: {0,0} + c EI Full ms [50.00-550.00]

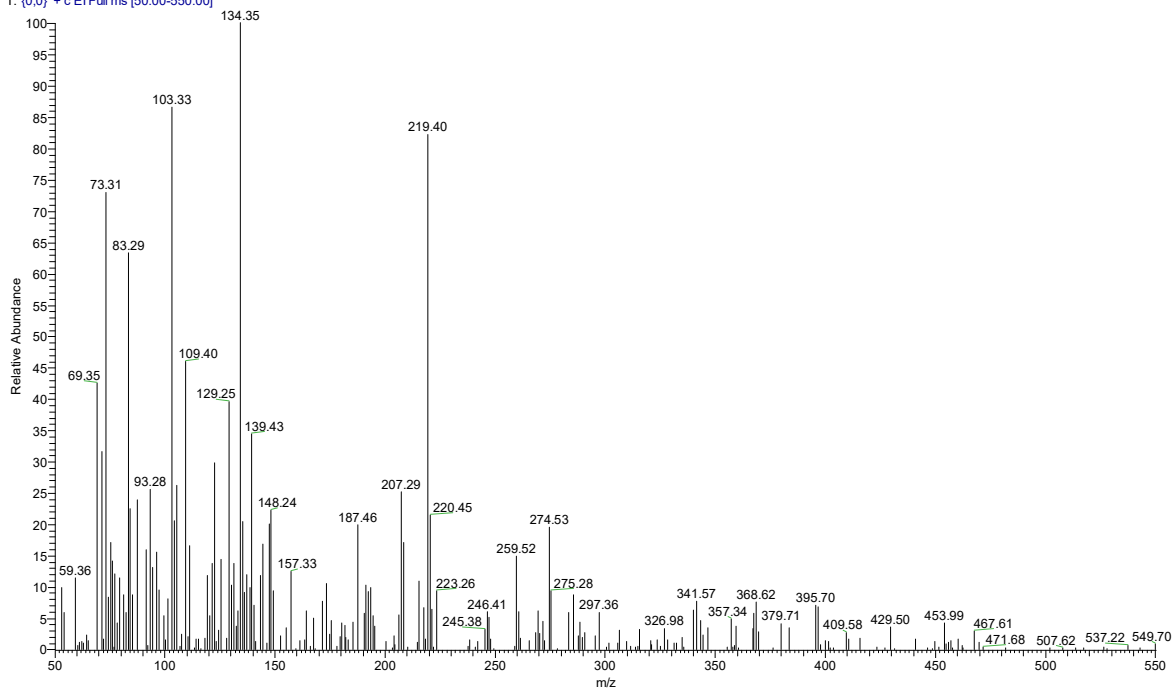


Figura 64. Espectro de massas do dinosterol, RT: 37,34.

11.2.3. Triterpenoides

Lupeol 5000 #976 RT: 38.27 AV: 1 SB: 1 38.65 NL: 1.43E5
T: {0,0} + c EI Full ms [50.00-550.00]

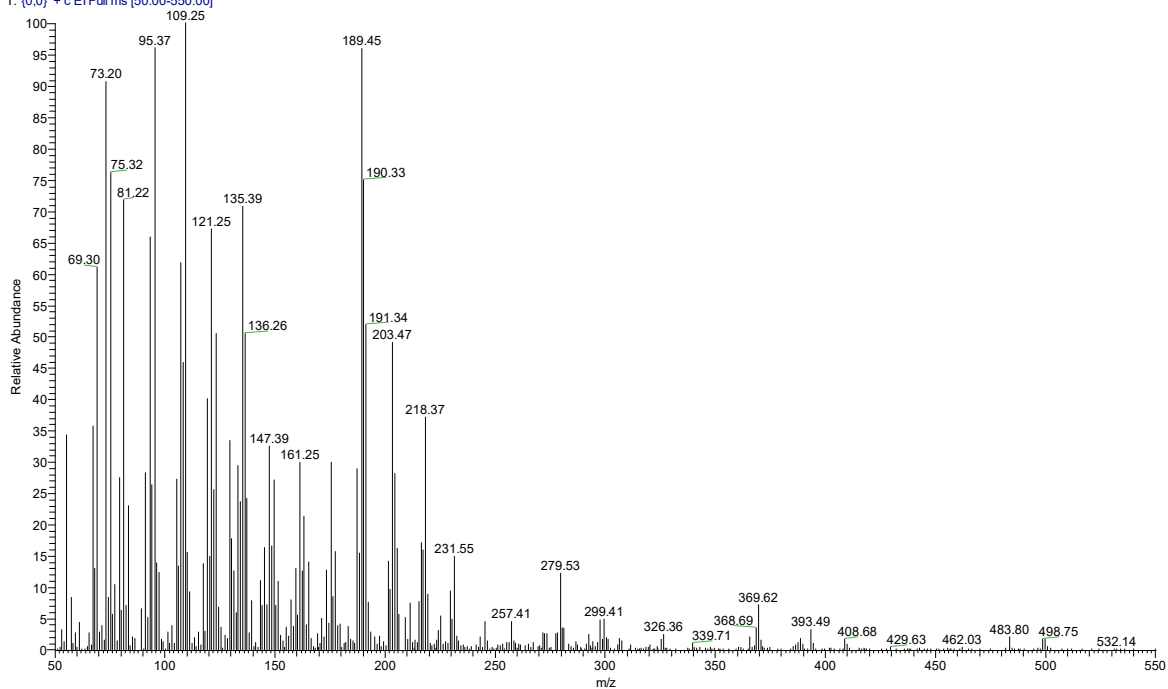


Figura 65. Espectro de massas do lupeol, RT: 38,27.

3B Taraxerol 5000 #912 RT: 36.21 AV: 1 SB: 1 36.50 NL: 9.27E4
T: [0,0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

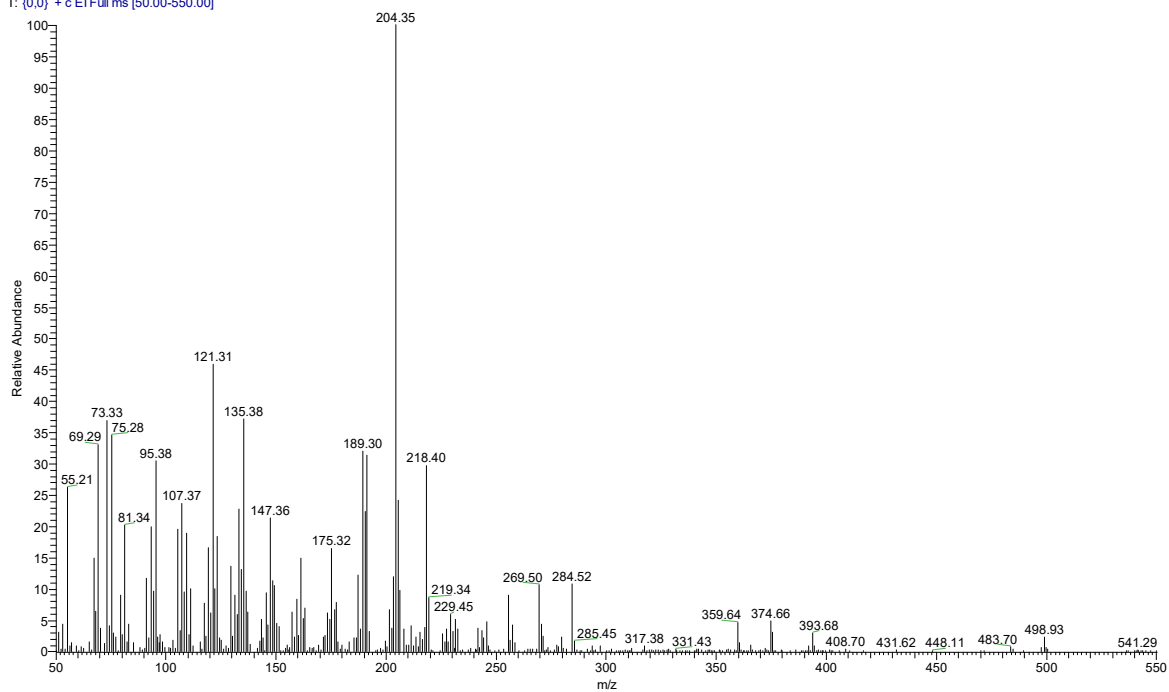


Figura 66. Espectro de massas do β -taraxerol, RT: 36,21.

AVE8_SAPN_F301 #964 RT: 37.88 AV: 1 NL: 3.34E5
T: [0,0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

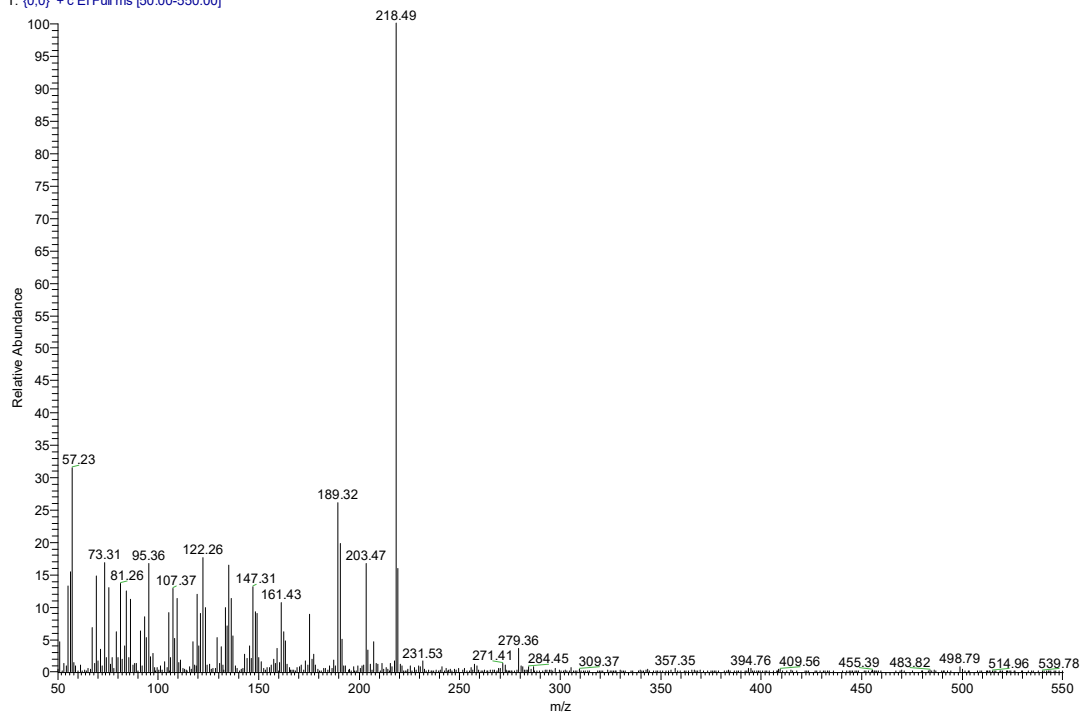


Figura 67. Espectro de massas do α -amirina, RT: 37,88.

AVE8 SAPN F301 #931 RT: 36.82 AV: 1 NL: 3.13E5
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

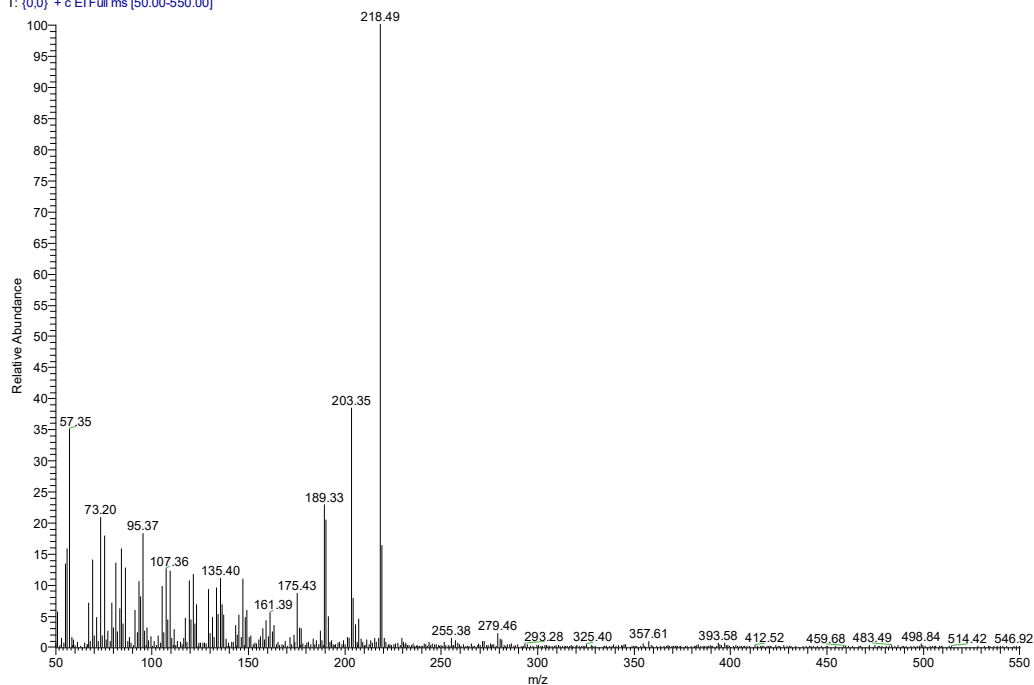


Figura 68. Espectro de massas do β -amirina, RT: 36,82.

11.2.4. Padrões subrogados e PI

P5_2000_EST01 #181 RT: 12.77 AV: 1 SB: 1 12.29 NL: 1.38E6
T: [0.0] + c EI Full ms [50.00-550.00]

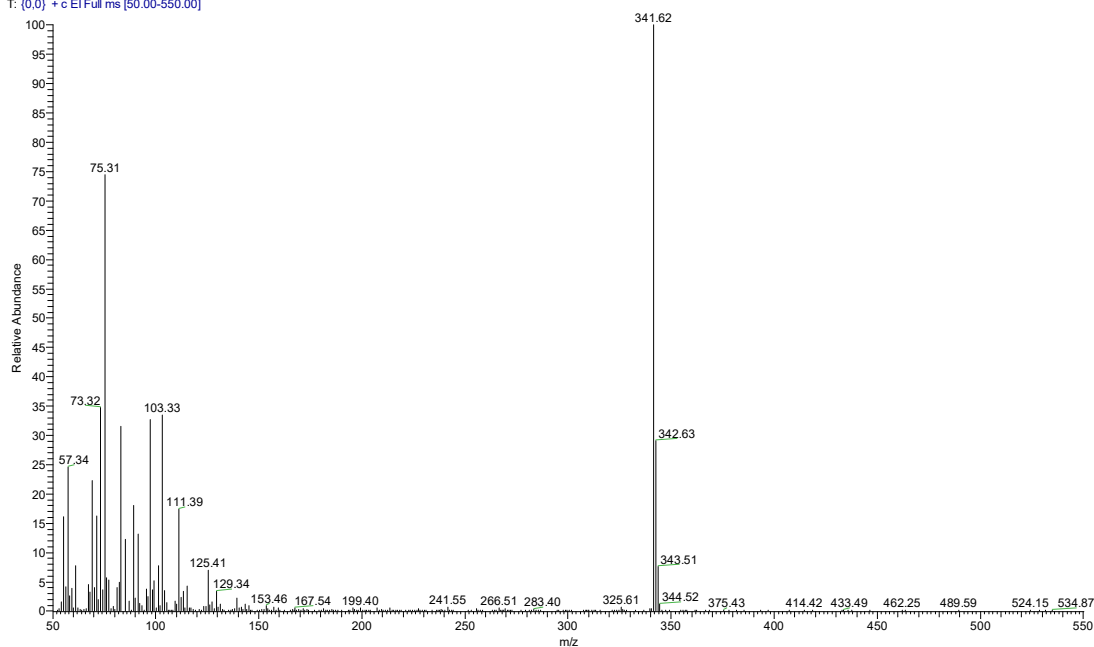


Figura 69. Espectro de massas do n -álcool $C_{19}OH$, RT: 12,77.

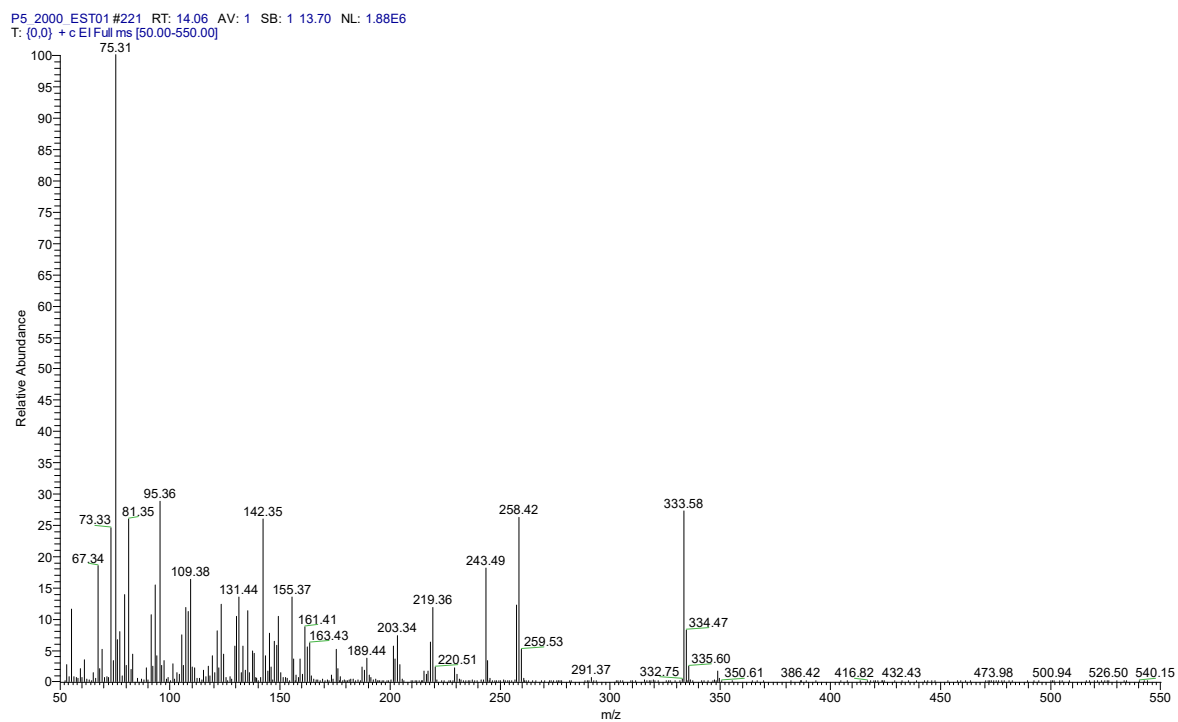


Figura 70. Espectro de massas do androstanol, RT:14,06.

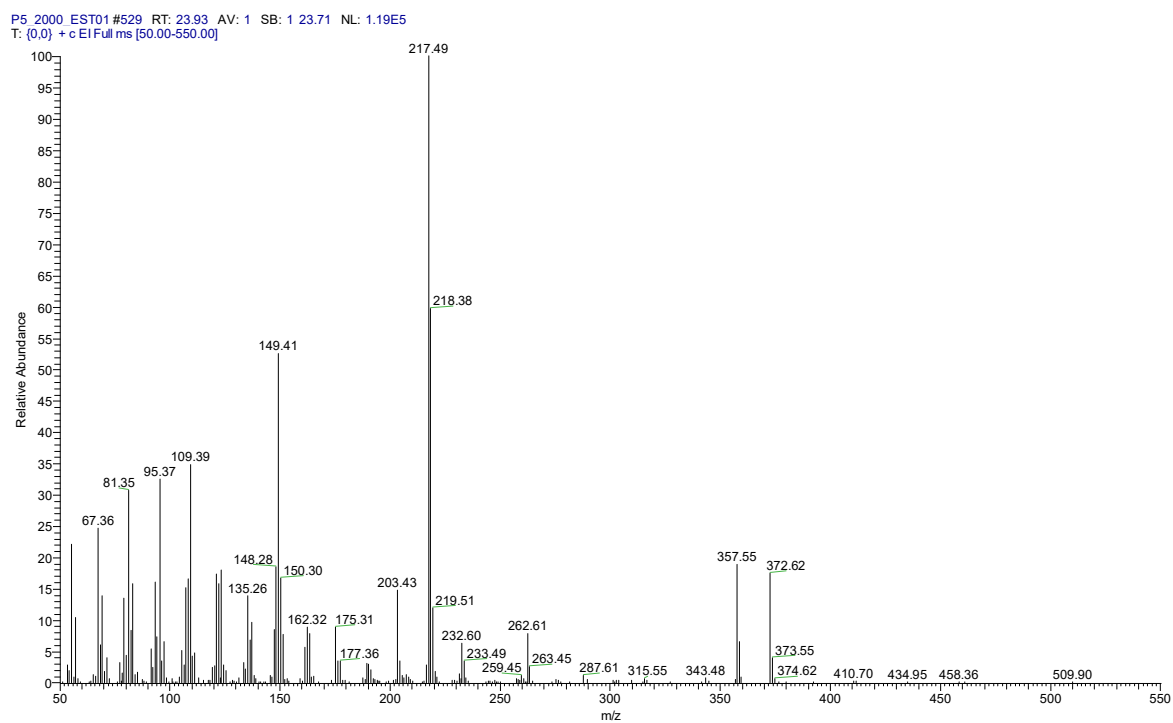


Figura 71. Espectro de massas do colestano, RT: 23,93.