



Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas

Processo CNPq 465768/2014-8

Programa Ciência do Mar

**Chamada emergencial em resposta ao derramamento de óleo
ocorrido em 2019**

Relatório final de atividades

Maio / 2023

I. INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) com base em sua missão, na expertise do seu quadro de pesquisadores e na sua abrangência nacional, que inclui estados afetados pelo derramamento de petróleo, se propôs atuar junto ao Programa Ciência do Mar atendendo a chamada emergencial em resposta ao derramamento de óleo que atingiu as praias brasileiras em diversas localidades no ano de 2019. As ações empreendidas pelo INCTAA se voltaram para aspectos relevantes para a compreensão dos impactos causados pelo derramamento e para o desenvolvimento de técnicas analíticas que possam auxiliar na tomada de decisão em futuros eventos:

Segurança Alimentar: Avaliação e monitoramento do impacto da contaminação por HPA, BTX e metais pesados de produtos provenientes da pesca e aquicultura

Balneabilidade e impactos na saúde da população: Avaliação e monitoramento da qualidade da água e sedimentos por contaminação por HPA e BTX

Controle e remediação: Modelagem, sensoriamento remoto e detecção preventiva de acidentes com transporte de óleo e combustíveis. Desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção de hidrocarbonetos em águas in situ e praias. Construção de uma biblioteca multi-espectral de petróleos comercializados ou produzidos no Brasil.

O desenvolvimento destas atividades sofreu impacto significativo das restrições impostas pela pandemia da Covid-19 afetando seu cronograma original, e tornando algumas ações associadas aos itens 1 e 2 extemporâneas em relação ao aspecto emergencial coincidente com a fase mais aguda do evento. Mesmo assim, os resultados obtidos permitem avaliar parcialmente a situação da segurança alimentar e balneabilidade em locais afetados pelo derramamento.

O INCTAA produziu no âmbito desta chamada diversos métodos analíticos úteis no monitoramento de ambientes marinhos sujeitos a episódios de derramamento de combustíveis e petróleo que contribuem para prevenção, detecção e tomada de decisões de enfrentamento a eventos com as mesmas características daquele ocorrido no ano de 2019.

Os pesquisadores do INCTAA e suas instituições que participaram do desenvolvimento destas atividades são:

Ceará:

Lívia Paulia Dias Ribeiro	UNILAB	Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Gisele Simone Lopes	UFC	Universidade Federal do Ceará
Wladiana Oliveira Matos	UFC	Universidade Federal do Ceará

Paraíba:

Mario César Ugulino de Araújo	UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Katia Messias Bichinho	UFPB	Universidade Federal da Paraíba
<u>Pernambuco:</u>		
Claudete Fernandes Pereira	UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
Fernanda Araújo Honorato	UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
Maria Fernanda Pimentel	UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Ana Paula Silveira Paim	UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
Ricardo Saldanha Honorato	PF-PE	Departamento de Polícia Federal
<u>Rio de Janeiro:</u>		
Maria Cristina Canela	UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
<u>Paraná:</u>		
Marco Tadeu Grassi	UFPR	Universidade Federal do Paraná
Gilberto Abate	UFPR	Universidade Federal do Paraná
<u>São Paulo:</u>		
Celio Pasquini	UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Ivo Milton Raimundo Junior	UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Jarbas Jose Rodrigues Rohwedder	UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Pedro Sergio Fadini	UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
Joaquim Araújo Nóbrega	UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
Susanne Rath	UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Fábio Rodrigo Piovezani Rocha	USP – CENA	Universidade de São Paulo
Ana Rita de Araújo Nogueira	EMBRAPA	Pecuária Sudeste-SP

A seguir são relatados detalhadamente os resultados obtidos das atividades desenvolvidas pelos pesquisadores do INCTAA.

II. SEGURANÇA ALIMENTAR: AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DO IMPACTO DA CONTAMINAÇÃO POR HPA, BTX E METAIS PESADOS DE PRODUTOS PROVENIENTES DA PESCA E AQUICULTURA

II.1. HPA e BTX em produtos da pesca e aquicultura

II.1.1. Introdução e Justificativas

De acordo com as estimativas atuais, o volume anual de petróleo bruto que entra nos oceanos devido a atividades antrópicas e infiltrações naturais pode alcançar 8,3 milhões de toneladas (Yakimov et al., 2022). Entre estes, acidentes de derramamento de petróleo são responsáveis por ocasionar danos severos para os ecossistemas ambientais, sobretudo ao ecossistema marinho (Oliva et al., 2017).

O petróleo consiste em uma mistura complexa de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos. Neste ponto, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são compostos provenientes do petróleo de preocupação constante, uma vez que são tóxicos, possuem capacidade de bioacumulação e apresentam potencial para desencadear efeitos cancerígenos (Achten & Andersson, 2015; Ohiozebau et al., 2017; Oliva et al., 2017). As principais rotas pelas quais estes contaminantes chegam ao ambiente aquático incluem deposições atmosféricas, derramamentos de óleo, escoamento urbano, descargas de águas residuais e emissões de embarcações e veículos (Oliva et al., 2017).

Neste contexto, a contaminação de alimentos provenientes de atividades pesqueiras no mar possui atenção especial, uma vez que vazamentos de petróleos são eventos que podem afetar diretamente estas atividades, oferecendo assim um risco à saúde humana. Além disso, a contaminação do mar por vazamentos e/ou derramamentos de petróleo afetam não apenas o ecossistema local e a saúde humana, mas também a economia local, por meio do impacto negativo nas atividades turísticas e de recreação (Wenzl & Zelinkova, 2018).

No Brasil, o último derramamento de petróleo com registro oficial ocorreu em 30 de agosto de 2019 até janeiro de 2020, atingindo 11 estados, 120 municípios e 724 localidades, entre as regiões Nordeste e Sudeste. Neste período, manchas de petróleo bruto atingiram a costa do Brasil e os impactos deste desastre ainda estão sendo avaliados (Magalhães et al., 2022; Pena et al., 2020). Entre estes impactos, estão os danos socioeconômicos associados principalmente à população que possuía a atividade de pesca como principal fonte de subsistência (Araújo et al., 2020).

Frente a este potencial impacto de contaminação da biota e a cadeia alimentar por HPA, alguns estudos já foram realizados para explorar esta questão referente ao derramamento de 2019. Por exemplo, Magalhães et al. (2022) avaliaram a presença de HPA em tecidos de 34 espécies de peixes e mariscos, onde encontraram uma concentração de 8,71 a 418 ng g⁻¹, em que naftalenos foram os compostos majoritariamente encontrados. O estudo ressalta que embora menos de 3% das amostras apresentaram níveis de contaminação preocupantes à saúde humana, mais estudos precisam ser elaborados para melhor elucidar a contaminação e impacto a longo prazo dos produtos da cadeia alimentar.

Frente ao exposto, o projeto, em sua totalidade, visou a avaliação da contaminação por HPA e BTEX de produtos provenientes da pesca e aquicultura, que foram impactados devido ao derramamento de petróleo de 2019. Este projeto está vinculado ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) juntamente com o Programa Ciência Mar, o qual compreende grupos de pesquisadores de diversas regiões do país, onde cada laboratório será responsável em trabalhar com

sua expertise. As análises de triagens foram realizadas utilizando protocolos já desenvolvidos e empregados por pesquisadores do INCTAA na determinação destes compostos em tecidos de pescado.

II.1.2. Procedimento experimental

Padrões e reagentes

Os solventes acetonitrila, hexano e metanol foram todos de grau cromatográfico (HPLC) das marcas Sigma-Aldrich, Panreac, JT Baker ou similares. Para o estudo, foram empregados padrões analíticos de alta pureza (>95%) de 5 BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m+p*-xileno e *o*-xileno), de 16 HPA prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dizeno[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]pireno), de 5 padrões de HPA deuterados (acenafteno-²H₁₀, criseno-²H₁₂, fenantreno-²H₁₀, naftaleno-²H₈ e perileno-²H₁₂) e 1 padrão interno deuterado (p-Terfenil-²H₁₄). As soluções estoques dos padrões BTEX e PAH foram preparadas em metanol e diclorometano, respectivamente, em concentração de 80,0 mg L⁻¹. Estas foram mantidas no freezer (-18 °C) até o momento do preparo das soluções intermediárias e de trabalho.

Descontaminação de vidrarias e materiais

A descontaminação dos materiais foi realizada com escova e detergente neutro, seguida por 3 ciclos de 15 min de lavagem com banho ultrassom: i) água da torneira; ii) água deionizada; iii) água ultrapura. Os materiais não volumétricos foram secos em estufa a 105 °C e calcinados em mufla por 4 horas a 400 °C. As vidrarias volumétricas foram enxaguadas com acetona e secas em temperatura ambiente.

II.1.3. Locais de estudo e amostragem

As amostras de pescado foram adquiridas de pescadores locais, em locais afetados pelo aparecimento de manchas de óleo em 2019, da costa da Bahía, Pernambuco e Rio de Janeiro. Após a coleta, as amostras foram liofilizadas e encaminhadas para o laboratório de Análises Ambientais do Grupo de Química Ambiental, GQA da Universidade Federal Paraná, para determinação de BTEX e HPA. Ao total foram analisadas 44 amostras. A relação das amostras avaliadas, bem como o código e local de coleta estão descritos na **Tabela II.1.1**.

Tabela II.1.1. Amostras estudadas para a determinação de BTEX e HPA.

Amostra	Código	Estado de coleta	Local
Abadejo	A	Bahia	Mucuri
Robalo	BA1	Bahia	Mucuri
Robalo	BA2	Bahia	Mucuri
Camarão	C	Bahia	Mucuri
Cação	CA1	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Cação	CA2	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Cação	CA3	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Cavala	CAV2_1	Pernambuco	Maracaípe
Cavala	CAV2_2	Pernambuco	Maracaípe
Robalo	R01	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Robalo	R02	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Robalo	R03	Rio de Janeiro	Guaxindiba
Saramunete	R22B01	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B03	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B05	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B07	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B09	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B11	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B13	Pernambuco	Itamaracá
Saramunete	R22B15	Pernambuco	Itamaracá
Tainha	R22B17	Pernambuco	Maria Farinha
Tainha	R22B19	Pernambuco	Maria Farinha
Tainha	R22B21	Pernambuco	Maria Farinha
Tainha	R22B23	Pernambuco	Maria Farinha
Tainha	R22B25	Pernambuco	Maria Farinha
Tainha	R22B27	Pernambuco	Maria Farinha
Pampo	R22B29	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B31	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B33	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B34	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B35	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B37	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B39	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B41	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B43	Pernambuco	Itamaracá
Pampo	R22B45	Pernambuco	Itamaracá
Cavala	R22B47	Pernambuco	Maracaípe
Cavala	R22B49	Pernambuco	Maracaípe
Cavala	R22B51	Pernambuco	Maracaípe
Cavala	R22B53	Pernambuco	Maracaípe
Xaréu	X1	Pernambuco	Maracaípe
Xaréu	X2	Pernambuco	Maracaípe
Xaréu	X3	Pernambuco	Maracaípe
Xaréu	X4	Pernambuco	Maracaípe

II.1.4. Extração de BTEX em pescado por *headspace* estático

As concentrações de BTEX foram determinadas nas amostras de pescado empregando condições modificadas de extração descritas no método EPA Method 8265 (EPA, 2002). Aproximadamente 1 g da amostra previamente liofilizada e triturada foi transferida para vials *headspace* de 20 mL. Em seguida, 10 mL de metanol foi adicionado a amostra. O vial foi fechado com tampa rosqueável contendo septo em PTFE/silicone e em seguida a amostra foi submetida a agitação em vortex por 1 min. Uma alíquota de 200 µL do extrato foi transferida para outro vial de *headspace* e completado para 5 mL de água ultrapura. O vial foi fechado e encaminhado para quantificação por HS-GC-MS, de acordo com os parâmetros instrumentais descritos na seção 2.5.

II.1.5. Protocolo de extração de HPA em biota

Os HPA foram extraídos das amostras empregando o método de saponificação. A saponificação com uma base é sugerida para quebrar componentes como proteínas e lipídios, nos quais os PAH podem ser adsorvidos, para posterior separação usando solventes orgânicos. O método empregado foi empregado com base em modificações do protocolo de Da Silva et al. (2023). Alíquotas de 0,25 g de amostra liofilizadas e maceradas foram adicionadas em um tubo de vidro de 100 mL juntamente com 100 µL dos padrões sub-rogados em concentração de 200 ng g⁻¹. No frasco, foram adicionados 4,0 mL de solução saturada de hidróxido de potássio (KOH) preparada em metanol na concentração 2 mol L⁻¹ e 10 mL de hexano.

Em seguida, o frasco foi vedado e submetido a aquecimento em banho maria por 70 °C durante 1h. Finalizado o processo, após o resfriamento, uma alíquota de 6 mL da fase orgânica foi filtrada em PTFE hidrofílico de porosidade de 0,45 µm. A limpeza (*clean-up*) do extrato foi realizada em uma coluna de vidro com dimensões de aproximadamente 115 x 15 mm contendo 500 mg de C₁₈. A Coluna foi empacotada com 4 mL de diclorometano e condicionada com 4 mL de diclorometano e hexano (1:1). Em seguida, a amostra foi transferida para a coluna e eluída com 4 mL da mistura diclorometano e hexano. Aproximadamente 10 mL do eluato foi coletado em tubo de vidro de 12 mL e evaporado em evaporador rotativo a vácuo Christ, modelo RVC 2-18 CD Plus operado a 60 °C em rotação de 1500 rpm. O extrato foi ressolubilizado com 1000 µL de solução de *p*-tercfeñil-D14 preparado em hexano, na concentração de 100 µg L⁻¹ e analisado por GC-MS.

II.1.6. Determinação dos HPA e BTEX por GC-MS

A separação, identificação e quantificação dos BTEX e HPA foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japão – Modelo QP2010 Plus - TQ8040) equipado com uma coluna capilar analítica Phenomenex ZB-5ms (Califórnia, EUA) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm acoplado a espectrômetro de massa e um amostrador automático (Palm Shimadzu modelo AOC-5000 Plus). O

equipamento foi operado com hélio analítico de alta pureza 99,999 % como gás de arraste em vazão constante, fornecido pela White Martins (Paraná, Brasil).

As determinações de BTEX foram realizadas por *headspace* (HS-GC-MS). Neste procedimento, o vial contendo a amostra é aquecido (60°C) e agitado (250 rpm) durante 5 min. O aquecimento promove a volatilização dos analitos, deslocando o equilíbrio para a fase gasosa, localizada no volume morto do frasco ou *headspace*. Por fim, uma seringa cromatográfica aquecida (60 °C) e controlada por amostrador automático perfura o septo do frasco, coletando apenas um volume da fase gasosa (500 µL), sendo a injeção feita no GC-MS para quantificação. O instrumento foi operado usando 1,00 mL min⁻¹ de gás de arraste com vazão constante, injeção no modo splitless a 180 °C sem pulso de pressão. A coluna foi mantida a 35°C por 5 min, seguida de aquecimento a 10 °C min⁻¹ e por fim, um gradiente de 30 °C min⁻¹ a 200 °C, sendo mantido por 2 min. A linha de transferência e a fonte de íons foram mantidas a 250°C.

Para HPA, a injeção foi realizada empregando 1 µL do extrato em modo splitless a 270°C. O programa de aquecimento foi de 40°C por 2 min, aumentado a uma taxa de 50°C min⁻¹ a 80°C, depois aumentado de 10°C min⁻¹ a 240°C (2 min de espera), de 240°C a 260°C a uma taxa de 4°C min⁻¹ (5 min de espera) e por fim, a uma taxa de 20°C min⁻¹ a 300°C (7 min de espera) (tempo de execução = 39,8 min). A linha de transferência e da fonte de ionização foram mantidas em temperatura de 280°C e 230°C, respectivamente. As determinações de BTEX e HPA foram realizadas em modo de monitoramento seletivo de íons, SIM. Na **Tabela II.1.2**, pode ser visualizado as informações de abreviatura, tempo de retenção e íons alvo dos analitos investigados.

Tabela II.1.2. Compostos, abreviaturas, tempo de retenção e íons alvos (*m/z*).

Compostos	Abreviatura	Tempo de Retenção, min	Íons alvos, <i>m/z</i>
Benzeno	Ben	3,03	78, 77
Tolueno	Tol	5,59	91, 92, 65
Ethylbenzene	Eth	7,96	91, 106, 65
<i>m</i> -+ <i>p</i> -Xyleno	<i>m</i> + <i>p</i> -Xyl	8,14	91, 105, 106
<i>o</i> -Xyleno	<i>o</i> -Xyl	8,66	91, 105, 106
Naftaleno[² H ₈]	Nap[² H ₈]	7,87	136, 137, 108
Naftaleno	Nap	7,91	128, 127, 129
Acenaftileno	Acy	11,30	152, 151,150
Acenafteno[² H ₁₀]	Ace[² H ₁₀]	11,64	162, 164,160
Acenafteno	Ace	11,71	153, 154, 152
Fluoreno	Flu	12,92	166, 165, 164
Fenantreno[² H ₁₀]	Phe[² H ₁₀]	15,11	188, 187, 184
Fenantreno	Phe	15,16	178, 176, 152
Antraceno	Ant	15,29	178, 176, 179
Fluoranteno	Fla	17,99	202, 200, 203
Pireno	Pyr	18,51	202, 200, 201
<i>p</i> -Tercefenil[² H ₁₄]	<i>p</i> -Ter[² H ₁₄]	19,05	244, 243, 245
Benz[<i>a</i>]antraceno	BaA	22,29	228, 226, 229
Criseno[² H ₁₂]	Chr[² H ₁₂]	22,35	240, 236, 241
Criseno	Chr	22,43	228, 226, 229
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	BbF	26,78	252, 250, 253
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	BkF	26,92	252, 250, 253
Benzo[<i>a</i>]pireno	BaP	28,35	252, 250, 253
Perileno[² H ₁₂]	Per[² H ₁₂]	28,68	264, 260, 265
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	Ind	33,39	276, 277, 274

Compostos	Abreviatura	Tempo de Retenção, min	Íons alvos, <i>m/z</i>
Dibenzo[a,h]antraceno	DahA	33,56	<i>278, 279, 276</i>
Benzo[ghi]perileno	BghiP	34,13	<i>276, 277, 274</i>

m/z: em itálico são destacados os íons de quantificação.

Continuação.

Curvas analíticas

As curvas analíticas para BTEX foram elaboradas em triplicata, utilizando o método de padronização externa, a partir de soluções intermediárias de BTEX em concentrações de 500 e 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva analítica foi preparada em 5,00 mL de soluções aquosas em cinco níveis de concentração, contendo 4% de metanol para respeitar o teor de solvente no processo de extração dos BTEX: 1,0; 5,0; 25,0; 50,0; e 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ressalta-se que esses padrões foram preparados diretamente em frascos para *headspace* de 20 mL, com septo de silicone/PTFE não perfurado. As curvas de HPA foram preparadas em hexano, em sete níveis de concentração: 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 125,0 e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

II.1.7. Controle e garantia de qualidade (QA/QC)

Para avaliar a precisão e exatidão do protocolo de extração de BTEX, foram realizados ensaios de recuperação em pescado liofilizado. Em 1 g de pescado foi realizada fortificação com 62,5 μL de solução padrão de BTEX (80 mg L^{-1}), seguida da adição de 10 mL de MeOH, proporcionando concentração de 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. O frasco foi fechado e submetido a agitação por vórtex por 1 min e após a separação de fase, uma alíquota de 200 μL foi transferida para outro vial e o volume completado para 5 mL com água ultrapura.

Para os HPA, o QA/QC dos protocolos de extração incluiu a adição de padrões sub-rogados em concentração de 200 ng g^{-1} em todas as extrações, além de ensaios em branco ($n=5$) e análise dos solventes utilizados. Foram obtidos valores médios de recuperação de $77\pm 1,2\%$ para criseno-D12 e $76\pm 2,6\%$ para perileno-D12, com incertezas (RSD) inferiores a 22%. Adicionalmente, foi realizado ensaio de recuperação em triplicata, nos quais foram fortificadas a amostra B47 com HPA em concentração de 200 ng g^{-1} . A fortificação foi realizada com 100 μL de solução dos HPAs em concentração de 0,50 mg L^{-1} , proporcionando concentração de 200 ng g^{-1} , e a amostra foi preparada de modo análogo às demais.

II.1.8. Conversão da concentração em massa seca para massa úmida

De acordo com a literatura a carne de peixe é composta de 66%-81% de água, 16%-21% de proteína, 1,2%-1,5% de minerais, 0,2%-25% de gordura e 0%-0,5% de carboidratos (Ahmed et al., 2022). Neste estudo, entre as espécies estudadas, o teor de umidade também se encontra na faixa mencionada (Araujo, 2019; Araujo et al., 2012; Balieiro, 2010; Oliveira, 1996; Pimentel De Araujo, 2013; Silva de Sá Júnior et al., 2020). Portanto, para este trabalho foi considerada umidade de 75% para

todas as amostras, com o objetivo de converter os valores obtidos de concentração em massa seca para massa úmida, tornando possível a comparação dos dados obtidos com os dados de concentrações de níveis preocupantes disponibilizados pela ANVISA (2019). O cálculo de conversão foi realizado considerando a equação abaixo:

$$\text{Concentração em massa úmida} = \left(\frac{100\% - 75\%}{100\%} \right) \times \text{Concentração massa seca}$$

II.1.9. Resultados

Curvas analíticas e ensaios de recuperação para HPA

Os estudos para determinação de HPA nas amostras foram iniciados, em que primeiramente foram realizadas as curvas analíticas instrumentais. Para as curvas analíticas na faixa 5–250 $\mu\text{g L}^{-1}$, em sete níveis de concentração, os coeficientes de determinação obtidos foram entre 0,9956 e 0,9996. Por meio da curva, foram calculados os LOD e LOQ para os HPA, sendo LOD de 2 ng g^{-1} e LOQ de 5 ng g^{-1} em massa úmida. Além disso, realizou-se ensaios preliminares para recuperação de HPA na amostra de pescado B47, obtendo-se recuperações a partir do composto acenaftileno. Deste modo, a recuperação alcançada foi de 39 \pm 15,8% para o acenaftileno e 84 \pm 5% para o benzo[b]fluoranteno. Os dados de recuperação estão demonstrados na **Tabela II.1.3**.

Tabela II.1.3. Avaliação da precisão e exatidão do método para determinação de HPA nas amostras estudadas.

HPA	Fortificação (200 ng g^{-1})	
	Recuperação (%)	RSD (%)
Acenaftileno	39	15,8
Acenafteno-D10	47	12,7
Acenafteno	48	11,4
Fluoreno	52	9,8
Fenentreno-D10	59	6,0
Fenantreno	64	5,4
Antraceno	52	7,4
Fluoranteno	67	8,7
Pireno	74	2,4
Benzo[a]antraceno	80	2,5
Criseno-D12	77	1,2
Criseno	80	2,8
Benzo[b]fluoranteno	84	4,6
Benzo[k]fluoranteno	74	4,3
Benzo[a]pireno	73	2,1
Perileno-D12	76	2,6
Indeno[1,2,3-cd]pireno	71	3,7
Dibenzo[a,h]antraceno	76	4,1
Benzo[ghi]perileno	61	1,9

As recuperações sugerem a potencialidade do método para ser empregado para determinação de HPA em amostras com maior teor de gordura, como as analisadas neste projeto.

Determinação de BTEX e HPA em amostras de pescado

Durante as análises foram realizadas determinações em triplicata dos controles (brancos) do processo de extração, ou seja, apenas água e metanol, e os valores de da concentração de BTEX encontrado, foram utilizados para fazer a correção da concentração nas amostras estudadas. Neste sentido, por meio do presente estudo, não foram detectados os compostos de BTEX nas amostras analisadas, acima do limite de detecção aqui estabelecido, de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa úmida.

Em relação à determinação de HPA, entre as 44 amostras analisadas, 36 indicaram a presença dos compostos aromáticos. A relação da concentração de cada HPA encontrado nas amostras está demonstrada nas **Tabela II.1.4** e **II.1.5**. Os HPA foram quantificados a partir do fenantreno, para as amostras CA2 e C, com concentrações de $6,21$ e $6,90 \text{ ng g}^{-1}$ respectivamente. A concentração máxima de HPA encontrada foi de $17,5 \text{ ng g}^{-1}$ para a amostra CA2. Os resultados sugeriram maior contaminação para as amostras CA1, CA2 e CA3, amostradas no Rio de Janeiro, com quantificações para 11 HPA avaliados.

Estes resultados são similares aqueles descritos por Magalhães et al. (2022), que também avaliaram a contaminação de amostras de pescado pelo derramamento de petróleo em 2019 na costa brasileira, com uma faixa de concentração de $8,71$ a 418 ng g^{-1} . De acordo com o estudo, no geral, maiores concentrações foram encontradas para os HPAs de menor massa molecular como o naftaleno, condição esta que difere parcialmente dos dados obtidos neste relatório.

No Brasil, após o incidente do derramamento de óleo de 2019, a ANVISA (2019) elaborou uma nota técnica a respeito dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil. Nesta nota está descrito o nível de preocupação para compostos carcinogênicos genotóxicos em relação aos HPA.

Desta forma, por meio dos dados de concentração de nível preocupante expostos pela ANVISA (2019) e por Magalhães et al. (2022), foi possível realizar uma análise a respeito do nível de contaminação das amostras avaliadas neste projeto, demonstrada na **Tabela II.1.6**.

Por meio dos resultados obtidos foi observado que entre todas as amostras analisadas, as concentrações de HPA pertencentes ao grupo não carcinogênicos e não genotóxicos foram inferiores aos níveis de preocupação estabelecidos para eventos de derramamento de óleo no Brasil de acordo com ANVISA (2019). Por outro lado, para os HPA pertencentes ao grupo carcinogênico genotóxico foram identificados dois compostos acima do limite estabelecido de 6 ng g^{-1} , sendo eles: benzo[a]pireno em 32% e dibenzo[a,h]antraceno em 14% das amostras, conforme mostrado na **Tabela II.1.6**. Assim, estes dados apontam, que mesmo sendo encontrados apenas 2 dos compostos com potencial cancerígeno, a presença de ambos ocorreu em aproximadamente um terço das amostras analisadas, o que pode servir de alerta para novas análises destes contaminantes.

Tabela II.1.4. Concentrações de HPA determinadas nas amostras avaliadas.

HPA	Concentração (ng g ⁻¹)																	
	A	B01	B03	B05	B07	B09	B11	B13	B15	B17	B19	B21	B23	B25	B27	B29	B31	B33
BaA	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	5,8	<2,0	<2,0	<2,0	5,8	<2,0	5,8	5,7	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	5,9	<2,0
Chr	7,5	7,6	7,4	<2,0	7,5	<2,0	7,4	7,6	7,4	7,4	7,5	<2,0	<2,0	7,5	<2,0	<2,0	7,5	7,5
BbF	<2,0	12,7	<2,0	8,7	8,4	7,8	<2,0	8,4	8,7	8,7	8,4	<2,0	8,1	8,7	9,3	<2,0	8,6	8,1
BkF	<2,0	5,3	<5,0	5,2	5,1	5,4	<2,0	5,1	5,1	5,1	5,1	<2,0	<5,0	<5,0	5,1	<2,0	5,3	<5,0
BaP	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	6,2	<2,0	<2,0	6,5	<2,0	6,5	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	6,6	<2,0

LOD: 2,0 ng g⁻¹; LOQ: 5,0 ng g⁻¹

Tabela II.1.5. Concentrações de HPA determinadas nas amostras avaliadas.

HPA	Concentração (ng g ⁻¹)																	
	B35	B37	B41	B43	B45	B47	B51	B53	C	CA1	CA2	CA3	C2_1	C2_2	R01	R02	R03	X1
Phe	<5,0	<5,0	<2,0	<2,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	6,9	<5,0	6,21	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Fla	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<5,0	<5,0	<2,0	<2,0	7,53	<2,0	6,87	<5,0	<2,0	<5,0	<2,0	<5,0	<2,0	<2,0
Pyr	<2,0	<5,0	<2,0	<2,0	<5,0	5,9	<2,0	<2,0	9,4	<2,0	8,5	5,9	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
BaA	<2,0	<2,0	8,9	<2,0	<2,0	10,4	<2,0	<2,0	13,0	8,4	12,9	9,8	5,8	5,7	7,9	6,3	5,6	5,6
Chr	10,1	<2,0	10,5	<2,0	<2,0	13,0	<2,0	7,4	14,3	10,2	15,0	11,9	7,5	7,4	10,0	8,1	<2,0	7,3
BbF	8,8	8,8	13,4	9,3	<2,0	14,6	8,2	8,0	17,4	11,8	17,5	17,4	<2,0	7,8	<2,0	8,9	<2,0	<2,0
BkF	5,4	5,4	9,5	5,4	<2,0	12,0	5,2	<2,0	13,7	9,1	13,9	11,3	<5,0	<2,0	8,3	5,9	<2,0	<2,0
BaP	<2,0	6,3	<2,0	<2,0	6,4	10,9	6,4	<2,0	14,3	9,5	13,3	10,6	<2,0	<2,0	9,3	7,1	<2,0	<2,0
Ind	<5,0	<2,0	6,9	<5,0	<2,0	12,2	<5,0	<2,0	12,3	7,0	13,7	11,4	<5,0	<2,0	7,5	<5,0	<5,0	<5,0
DahA	<5,0	<5,0	<2,0	<2,0	<2,0	10,4	<5,0	<2,0	12,0	6,7	12,1	11,2	<2,0	<5,0	7,8	<5,0	<2,0	<2,0
BghiP	<5,0	<2,0	<5,0	<2,0	<2,0	8,2	<2,0	<2,0	9,3	<5,0	10,2	7,7	<2,0	<2,0	5,3	<5,0	<2,0	<2,0

LOD: 2,0 ng g⁻¹; LOQ: 5,0 ng g⁻¹

Tabela II.1.6. Faixa de concentração de HPA determinado nas amostras estudadas e concentrações de níveis preocupantes de PAH em peixes, estabelecidos para áreas impactadas por petróleo no Brasil. Todas as concentrações são expressas em ng g^{-1} de massa úmida.

HPA	Concentração (ng g^{-1})	
	Determinada nas amostras	Níveis preocupantes de HPA em peixes no Brasil
Não carcinogênicos		
Naftaleno	<2,0	6.670
Acenafteno	<2,0	20.000
Fluoreno	<2,0 - <5,0	13.330
Fenantreno	<2,0 - 6,9	–
Antraceno	<2,0 - <5,0	100.000
Fluoranteno	<2,0 - 7,5	13.330
Pireno	<2,0 - 9,4	10.000
Carcinogênicos		
Benzo[a]antraceno	<2,0 - 13,0	41
Criseno	<2,0 - 15,0	1.364
Benzo[b]fluoranteno	<2,0 - 17,5	43
Benzo[k]fluoranteno	<2,0 - 13,9	91
Benzo[a]pireno	<2,0 - 14,3	6
Indeno[1,2,3-cd]pireno	<2,0 - 13,7	26
Dibenzo[a,h]antraceno	<2,0 - 12,1	5
Benzo[ghi]perileno	<2,0 - 10,2	273

LOD: $2,0 \text{ ng g}^{-1}$; LOQ: $5,0 \text{ ng g}^{-1}$

Neste contexto, entre as amostras avaliadas, a presença de HPA em maiores concentrações foi determinada para aquelas coletadas na região de Guaxindiba-Rio de Janeiro, sugerindo maior contaminação do local quando comparadas aos outros locais amostrados. Neste ponto, destacam-se as menores concentrações de HPA nas amostras coletadas nas regiões de Pernambuco, sendo: Itamaracá, Maria Farinha e Maracaípe, o que indica menor impacto destas regiões com contaminações oriundas de petróleo.

II.1.10. Conclusões parciais

Os resultados parciais obtidos indicaram que as amostras de pescado possuem contaminação por compostos de HPA, indicando que mais estudos precisam ser realizados para melhor compreender o impacto da contaminação da costa brasileira devido a derramamento de petróleo e assim tomar medidas em relação à segurança alimentar de alimentos providos de regiões contaminadas.

Assim, de acordo com os dados obtidos, maiores concentrações de HPA foram determinadas para os compostos classificados como cancerígenos. Portanto, mais estudos

precisam ser realizados a fim de aprofundar os estudos de contaminação de amostras de pescado por compostos orgânicos como os HPA.

Além disso, o presente projeto permitiu o desenvolvimento e aprimoramento de método para extração de HPA em amostras de elevado teor de gordura, capacitando o GQA para análises em amostras com esta característica.

II.1.11. Referências Bibliográficas

- Achten, C., Andersson, J.T., 2015. Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC). *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 177–186. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.994071>
- Ahmed, I., Jan, K., Fatma, S., Dawood, M.A.O., 2022. Muscle proximate composition of various food fish species and their nutritional significance: A review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 106, 690–719. <https://doi.org/10.1111/jpn.13711>
- ANVISA, 2019. Riscos à saúde humana decorrentes do consumo de pescados oriundos das praias contaminadas por óleo cru na região Nordeste do Brasil. Agência Nac. Vigilância Sanitária Nota Técnica, 5.
- Araujo, A. da R.M.P.-H.C., 2019. Avaliação das características do músculo de tainha (*Mugil liza*) provenientes de criação e de captura. *Concept Commun.* null, 301–316. <https://doi.org/10.15797/concom.2019.23.009>
- Araujo, D.F. de S., Silvestre, D.D., Damasceno, K.S.F. da S.C., Pedrosa, L. de F.C., Seabra, L.M.A.J., 2012. Composição centesimal e teor de colesterol do camarão branco do Pacífico. *Ciência Rural* 42, 1130–1133. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782012000600029>
- Araújo, M.E. de, Ramalho, C.W.N., Melo, P.W. de, 2020. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. *Cad. Saude Publica* 36, e00230319. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00230319>
- Asejeje, G.I., Ipeaiyeda, A.R., Onianwa, P.C., 2021. Health risk assessment of Ubeji Creek residents' exposure to BTEX from consumption of locally sourced foods. *Environ. Pollut. Bioavailab.* 33, 449–459. <https://doi.org/10.1080/26395940.2021.2007795>
- Balieiro, A.L., 2010. Estudo sobre a presença de ácidos graxos e de histamina em pescado consumido no estado de sergipe acenini lima balieiro. Universidade Federal de Sergipe.
- da Silva, S.A., De Rossi, G.Z., Ossugui, M.M., de Almeida, A.P., Guizellini, G.M., Sampaio, G.R., da Silva Torres, E.A.F., 2023. Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Commonly Consumed Salami in Brazil. *Food Anal. Methods* 16, 293–303. <https://doi.org/10.1007/S12161-022-02414-Z/FIGURES/2>
- EPA, 2002. Volatile organic compounds in water, soil, soil gas, and air by direct sampling ion trap mass spectrometry (DSITMS), *Микробиология*.
- Magalhães, K.M., Carreira, R.S., Rosa Filho, J.S., Rocha, P.P., Santana, F.M., Yogui, G.T., 2022. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. *Mar. Pollut. Bull.* 175, 113334. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.113334>
- Ohiozebau, E., Tendler, B., Codling, G., Kelly, E., Giesy, J.P., Jones, P.D., 2017. Potential health risks posed by polycyclic aromatic hydrocarbons in muscle tissues of fishes from the Athabasca and Slave Rivers, Canada. *Environ. Geochem. Health* 39, 139–160. <https://doi.org/10.1007/S10653-016-9815-3/TABLES/11>
- Oliva, A.L., La Colla, N.S., Arias, A.H., Blasina, G.E., Lopez Cazorla, A., Marcovecchio, J.E., 2017. Distribution and human health risk assessment of PAHs in four fish species from a SW Atlantic estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 18979–18990. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-9394-6/FIGURES/5>
- Oliveira, F.H.J.P.O., 1996. Elaboração de linguças defumadas utilizando músculo e cartilagem de cação (*Prionace glauca*, linnaeus 1758). Universidade Federal do Ceará.
- Pena, P.G.L., Northcross, A.L., Lima, M.A.G. de, Rêgo, R. de C.F., 2020. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. *Cad. Saude Publica* 36, e00231019. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019>
- Pimentel De Araujo, D.H., 2013. Determinação de histamina e outras amins bioativas e perfil de ácidos graxos de peixes da região amazônica. Universidade Federal do Pará.
- Silva de Sá Júnior, P.L., Da Silva, L.J., Agrelli de Andrade, H., Campagnoli de Oliveira Filho, P.R., 2020. Rendimento e composição centesimal de filés e carne mecanicamente separada de saramunetes (*Pseudupeneus maculatus* BLOCH, 1793). *Arq. Ciências do Mar* 53, 52–62. <https://doi.org/10.32360/acmar.v53i1.42985>
- Wenzl, T., Zelinkova, Z., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and feed, *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21805-2>
- Yakimov, M.M., Bargiela, R., Golyshin, P.N., 2022. Calm and Frenzy: marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria sustain ocean wellness. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.015>

II.2. Metais pesados em produtos da pesca e aquicultura

Atividades referentes à meta “Avaliação e monitoramento do impacto da contaminação por metais pesados”

- Proposta de protocolo analítico para a amostragem, decomposição de amostras e determinação elementar;
- Avaliação de procedimentos de decomposição ácida assistida por micro-ondas de amostras de pescados;
- Avaliação preliminar da viabilidade de determinações elementares em amostras de pescado por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS);
- Determinação elementar em amostras de pescado por espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente (ICP OES);
- Determinação de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Cr, Hg e Pb) em amostras de pescado por espectrometria de massa em plasma acoplado indutivamente (ICP-MS);

II.2.1. Proposta de protocolo analítico para a amostragem, decomposição de amostras e determinação elementar

O protocolo analítico foi definido com base em informações da literatura e discussões entre os membros da equipe: Ana Rita A. Nogueira (EMBRAPA), Joaquim A. Nóbrega (UFSCar), Gisele S. Lopes (UFC), Ana Paula S. Paim (UFPE), Fábio R. P. Rocha (CENA-USP) e Lidiane C. Nunes (CENA-USP).

Foi recomendada a amostragem de pescado em regiões impactadas de cada Estado e, se possível, de uma região não impactada, considerando 2 espécies de pescado mais comuns em cada localidade, 3 peixes de cada espécie e aquisição preferencialmente de comunidades de pescadores, visando identificar a origem do pescado. Na amostragem, deve-se identificar a data da pesca e, se possível, as coordenadas geográficas (ao menos aproximadas) por GPS.

Foi recomendado que os peixes fossem pesados como adquiridos e que os filés fossem removidos e encaminhados para a análise, visando à avaliação do impacto aos consumidores considerando as partes usualmente comestíveis. Os filés também deveriam ser pesados e ca. 500 g de cada peixe deveria ser encaminhados para a determinação de metais tóxicos, com informações sobre a espécie de peixe, massa total e dos filés, data de aquisição e localização (GPS) do local de pesca (sempre que possível) e de aquisição.

Foi recomendado que os filés fossem liofilizados (devendo resultar em ca. 120 g de amostra seca) e encaminhados ao CENA-USP para homogeneização, moagem criogênica e decomposição ácida assistida por micro-ondas. O procedimento de decomposição ácida recomendado inicialmente (i.e. anteriormente à avaliação descrita no item 2) foi aquele proposto para a decomposição de amostras de tilápia visando à determinação por ICP-MS (Food Anal. Methods, 2020, 13:238–248): Adição de 8,0 mL de HNO₃ 4,2 mol L⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ (30%

m/m) a 100 mg amostra e aquecimento da mistura em forno de micro-ondas (sistema fechado), de acordo com o seguinte programa de aquecimento: (1) Patamar: 120°C, 15 min; (2) Rampa: 180 °C, 20 min; (3) Patamar: 180 °C, 20 min. Após a decomposição, os digeridos são avolumados a 30,0 mL com água deionizada.

Foi recomendada a determinação de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Cr, Pb e Hg) nos digeridos por ICP-MS (Embrapa Pecuária Sudeste) e de macro e micronutrientes por ICP OES (CENA-USP).

II.2.2. Avaliação de procedimentos de decomposição ácida assistida por micro-ondas de amostras de pescados

Como parte das atividades desenvolvidas pela Dra Lidiane Cristina Nunes, bolsista DTI no período agosto/2020 a abril/2021, foram avaliados 8 procedimentos de decomposição ácida assistida por micro-ondas, explorando equipamentos com características e desempenho distintos (Milestone, modelos ETHOS 1600 e Ultrawave). Esses experimentos visaram (i) assegurar resultados exatos para as amostras de pescado (itens 4 e 5), conforme avaliado utilizando um material de referência (filé de tilápia, MR-Agro E3002A) e um material de referência certificado (*Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals*, National Research Council of Canada, NRC, TORT-2) e (ii) determinar a maior massa de amostra passível de decomposição, objetivando aumentar a detectabilidade para a determinação das espécies em baixas concentrações. Os procedimentos avaliados e os resultados e conclusões desse estudo estão detalhados no relatório de atividades anexo.

II.2.3. Avaliação preliminar da viabilidade de determinação elementar em amostras de pescado por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

Também como parte das atividades desenvolvidas pela Dra Lidiane Cristina Nunes durante o período de bolsa DTI, foram realizados estudos preliminares visando à análise direta de pescados sólidos por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). As amostras foram analisadas na forma de pastilhas e foram avaliadas as condições para o preparo dessas pastilhas (e.g. adição de aglutinantes) e a calibração externa utilizando materiais de referência certificados. Resultados promissores foram obtidos para a determinação de Ca, Mn, Fe, Zn e Cu, conforme detalhado no relatório de atividades anexo.

II.2.4. Determinação elementar em amostras de pescado por espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente (ICP OES)

Amostras

As amostras de pescados foram coletadas em regiões litorâneas dos Estados da Bahia, Rio de Janeiro e Pernambuco, em que foram reportados indícios de contaminação pelo derramamento de óleo: BA-Mucuri; RJ-Guaxindiba (Campos dos Goytacazes) e PE-Itamaracá, Maracaípe, Maria Farinha e Sirinhaém. Os pescados foram adquiridos inteiros, diretamente de comunidades de pescadores, considerando as espécies mais consumidas em cada região: Robalo, abadejo e camarão (Mucuri, BA, 11/4/2022); Robalo e cação (Guaxindiba, RJ, 15/4/2022); Pampo e seramunete (Itamaracá, PE, 12/4/2022); Cavala e Xareu (Maracaípe, PE, 8/1/2021); Tainha (Maria Farinha, PE, 12/4/2022) e Cavala, cioba, enxada e robalo (Sirinhaém, PE, 8/2/2022). De cada pescado, foram separados os filés, que foram mantidos congelados e, posteriormente, liofilizados. Amostras do mesmo tipo de pescado, mas referentes a peixes diferentes, foram identificadas com números distintos.

Preparo das amostras

As amostras de pescado liofilizadas foram submetidas à moagem criogênica, de acordo com o programa: 5 min de pré-congelamento e 5 ciclos de moagem (15 cps) de 2 min, intercalados com 1 min de congelamento. As amostras moídas foram digeridas em triplicata em forno de micro-ondas de câmara única de reação (Ultrawave, Milestone), que possibilita realizar decomposições com pressões e temperaturas de até 199 bar e 300 °C, respectivamente. Nos frascos de digestão, foram transferidos 250 mg de amostra, 6,0 mL de HNO₃ 20% v v⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30% mm⁻¹. A solução de HNO₃ foi preparada a partir do ácido previamente purificado por destilação abaixo da temperatura de ebulição. Foi utilizado o seguinte programa de aquecimento: 120 °C (rampa: 5 min, patamar: 3 min); 180 °C (rampa: 5 min, patamar: 3 min) e 240 °C (rampa: 5 min, patamar: 20 min). Após a decomposição, os digeridos foram avolumados a 14 mL com água deionizada.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de alta pureza analítica e água desionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) com resistividade > 18,2 MΩ cm. Soluções estoque (SpecSol, Jacareí, SP, Brasil) contendo 1000 mg L⁻¹ dos elementos de interesse foram usadas para o preparo das soluções de referência multielementares para a calibração no ICP OES: 0,50-500 mg L⁻¹ P, K e S; 0,20-200 mg L⁻¹ Mg e Ca; 0,005-5,00 mg L⁻¹ Fe e Zn; 0,001-1,00 mg L⁻¹ Cu, Mn, Sr e As e 0,0001-0,10 mg L⁻¹ Ba, Cd, Co, Ni, Pb, Mo, Se, Cr, V e Ti.

Instrumento e parâmetros instrumentais

A determinação dos elementos foi realizada empregando um ICP OES iCAP 7400 Duo (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), com visões axial e radial, equipado com sistema de introdução de amostras composto por um nebulizador de vidro concêntrico e uma câmara de nebulização ciclônica de vidro, tubo injetor de 2 mm e mini-bomba peristáltica de 4 canais. O espectrômetro possui óptica Echelle, detector de estado sólido *Charge Injection Detector* (CID), possibilita a aquisição de sinais de emissão na região entre 166 e 847 nm e a dispersão linear por pixel varia de 7 pm a 200 nm. O software Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™, Thermo Scientific™) foi utilizado para ajustar as condições operacionais e para a aquisição de dados. Utilizando os parâmetros operacionais descritos na **Tabela II.2.1**, as medidas foram realizadas com visão axial e radial.

Tabela II.2.1. Parâmetros instrumentais empregados nas determinações por ICP OES.

Parâmetros Instrumentais	Condições de operação
Potência do plasma (W)	1200
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	12,0
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,50
Vazão de gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,60
Comprimentos de onda, vista radial (nm)	Mg 285.213, K 769.896, Ca 422.673, Zn 213.856, P 213.618, Fe 259.940
Comprimentos de onda, vista axial (nm)	Mn 257.610, Cu 324.754, Ba 233.527, Sr 421.552, As 189.042, Co 228.616, Ni 231.604, Mo 202.030, Se 196.090, Cr 267.716, Cd 226.502

Resultados

A exatidão do método foi comprovada pela determinação dos elementos em um material de referência (filé de tilápia, MR-Agro E3002A) e um material de referência certificado (proteína de peixe, DORM-4), **Tabela II.2.2**.

Tabela II.2. 2. Avaliação da exatidão do método ICP OES no MR (MR-Agro E3002A) e CRM (DORM-4). Resultados expressos pela média \pm desvio padrão (n=3), com recuperações (%) entre parênteses.

Analito	Fração de massa			
	MR-Agro E3002A		DORM-4	
	Valor determinado	Valor certificado	Valor determinado	Valor certificado
Mg (mg kg ⁻¹)	1169 \pm 63	903 \pm 88	751 \pm 33	–
K (mg kg ⁻¹)	13041 \pm 315	10283 \pm 964	11287 \pm 389	–
Ca (mg kg ⁻¹)	568 \pm 13	467 \pm 147	1992 \pm 52	–
P (mg kg ⁻¹)	6988 \pm 294	5931 \pm 377	6381 \pm 149	–
Mn (μ g kg ⁻¹)	555 \pm 38	388 \pm 76	2,52 \pm 0,13	–
Cu (mg kg ⁻¹)	1,198 \pm 0,075	0,980 \pm 0,188	13,7 \pm 0,44	15,9 \pm 0,9
Zn (mg kg ⁻¹)	25,5 \pm 0,1	18,9 \pm 2,5	42,4 \pm 0,5	–
Ba (μ g kg ⁻¹)	315 \pm 16	272 \pm 55	4,743 \pm 0,215	–
Sr (μ g kg ⁻¹)	1039 \pm 33	797 \pm 133	8,373 \pm 0,337	–
Ni (μ g kg ⁻¹)	430 \pm 27	333 \pm 107	1110 \pm 70	1360 \pm 220
Mo (μ g kg ⁻¹)	73 \pm 4	60,97 \pm 25,50	233 \pm 7	–
Se (mg kg ⁻¹)	–	–	3,85 \pm 0,05	3,56 \pm 0,34
Cr (mg kg ⁻¹)	–	–	1,65 \pm 0,07	1,87 \pm 0,16
Fe (mg kg ⁻¹)	16,9 \pm 0,5	11,89 \pm 3,03	275 \pm 2	341 \pm 27
Cd (mg kg ⁻¹)	< LOD	<0,0005	0,294 \pm 0,017	0,306 \pm 0,015
As (mg kg ⁻¹)	–	–	6,13 \pm 0,25	6,80 \pm 0,64

As frações de massa dos macro e micronutrientes determinados nos pescados adquiridos em regiões contaminadas pelo derramamento de óleo (item 4.1) por ICP OES são apresentadas nas Tabelas 3 e 4, enquanto as frações de massa de elementos potencialmente tóxicos são apresentadas nas **Tabelas II.2.5 e II.2.6**. Em todas as amostras analisadas, as frações de massa de Cd, V e Pb foram inferiores aos limites de detecção, i.e. < 0,0005 mg kg⁻¹ Cd, < 0,003 mg kg⁻¹ V e < 0,005 mg kg⁻¹ Pb.

Tabela II.2.3. Frações de massa de macro e micronutrientes determinadas por ICP OES em amostras de pescado dos Estados da Bahia e Rio de Janeiro.

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)							
	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Camarão VG (BA)	2161 ± 18	12836 ± 22	11184 ± 119	2902 ± 41	1,6 ± 0,1	29,8 ± 0,4	11,4 ± 0,1	67,3 ± 0,2
Robalo 1 (BA)	1336 ± 61	8986 ± 284	17135 ± 168	423 ± 33	0,51 ± 0,02	14,5 ± 0,9	0,95 ± 0,03	21,4 ± 0,6
Robalo 2 (BA)	1620 ± 85	9273 ± 76	15730 ± 437	3641 ± 26	1,0 ± 0,1	6,6 ± 0,3	0,57 ± 0,06	18,4 ± 0,1
Abadejo (BA)	1970 ± 112	12294 ± 125	21302 ± 276	2412 ± 152	0,32 ± 0,01	6,7 ± 0,5	0,43 ± 0,02	15,6 ± 0,4
Robalo 1 (RJ)	1726 ± 25	9819 ± 26	18052 ± 149	2515 ± 78	0,86 ± 0,01	9,6 ± 0,2	0,68 ± 0,03	16,5 ± 0,1
Robalo 2 (RJ)	1746 ± 44	12531 ± 387	14248 ± 179	11223 ± 869	2,7 ± 0,5	11,2 ± 0,4	0,67 ± 0,05	19,8 ± 0,8
Robalo 3 (RJ)	1517 ± 36	9426 ± 46	18456 ± 293	1113 ± 132	0,4 ± 0,1	9,3 ± 0,4	0,73 ± 0,04	15,5 ± 0,4
Cação 1 (RJ)	1249 ± 27	10595 ± 179	17862 ± 256	349 ± 5	0,300 ± 0,004	12,3 ± 0,7	1,47 ± 0,02	13,0 ± 0,3
Cação 2 (RJ)	1249 ± 74	10051 ± 372	12278 ± 339	2340 ± 81	0,7 ± 0,1	8,1 ± 0,4	0,78 ± 0,01	18,4 ± 0,5
Cação 3 (RJ)	1334 ± 48	9087 ± 224	12046 ± 227	491 ± 27	0,50 ± 0,02	12,7 ± 0,7	1,34 ± 0,07	16,0 ± 0,6

Tabela II.2.4. Frações de massa de macro e micronutrientes determinados por ICP OES em amostras de pescado de PE.

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)							
	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Pampo 1 (I)	596 ± 49	4744 ± 65	7834 ± 422	351 ± 66	0,24 ± 0,01	17 ± 1	0,60 ± 0,04	20,2 ± 0,1
Pampo 2 (I)	556 ± 9	4471 ± 154	7653 ± 269	426 ± 2,09	0,238 ± 0,005	17,9 ± 0,9	0,80 ± 0,07	19,3 ± 0,8
Pampo 3 (I)	832 ± 8	6382 ± 26	11654 ± 307	537 ± 68	0,48 ± 0,04	26,5 ± 0,1	1,33 ± 0,01	25,6 ± 0,1
Saramunete 1 (I)	1423 ± 33	10310 ± 247	19201 ± 473	1184 ± 8	0,38 ± 0,02	35 ± 1	1,68 ± 0,05	14,5 ± 0,4
Saramunete 2 (I)	1484 ± 25	11552 ± 114	20226 ± 78	2366 ± 94	0,254 ± 0,004	19,4 ± 0,5	1,3 ± 0,3	17,0 ± 0,4
Saramunete 3 (I)	1612 ± 122	10929 ± 793	20500 ± 1241	946 ± 66	0,31 ± 0,02	18 ± 2	0,92 ± 0,08	16 ± 1
Saramunete 4 (I)	1023 ± 63	7442 ± 465	13751 ± 534	395 ± 23	0,18 ± 0,03	13 ± 2	0,9 ± 0,1	12 ± 1
Cavala 1 (M)	1292 ± 77	9439 ± 291	18102 ± 589	167 ± 11	0,22 ± 0,01	39 ± 2	1,6 ± 0,1	14,2 ± 0,5
Cavala 2 (M)	1695 ± 28	10381 ± 92	17084 ± 151	469 ± 5	0,30 ± 0,01	22,0 ± 0,2	1,35 ± 0,02	29,6 ± 0,6
Xareu (M)	1335 ± 52	9787 ± 308	17884 ± 498	201 ± 7	0,23 ± 0,01	35 ± 2	1,6 ± 0,1	16,8 ± 0,9
Tainha 1 (MF)	1208 ± 10	9165 ± 171	16534 ± 187	639 ± 29	0,45 ± 0,01	30,2 ± 0,9	1,68 ± 0,01	17,4 ± 0,7
Tainha 2 (MF)	1157 ± 20	8834 ± 87	16987 ± 53	482 ± 23	0,34 ± 0,01	24,8 ± 0,9	2,36 ± 0,07	13,6 ± 0,2
Tainha 3 (MF)	1173 ± 9	8969 ± 42	17527 ± 156	405 ± 9	0,4 ± 0,1	21,0 ± 0,2	1,2 ± 0,3	17,0 ± 0,1
Cavala 1 (S)	1153 ± 58	9059 ± 409	16988 ± 726	321 ± 26	0,17 ± 0,01	20 ± 2	1,07 ± 0,09	14 ± 2
Cavala 2 (S)	1220 ± 49	9299 ± 160	17073 ± 557	559 ± 11	0,39 ± 0,01	59 ± 2	0,90 ± 0,03	15,3 ± 0,5
Cavala 3 (S)	1408 ± 138	10315 ± 332	17524 ± 343	370 ± 9	0,24 ± 0,02	27,8 ± 0,2	1,03 ± 0,1	19,4 ± 0,7
Cavala 4 (S)	1148 ± 45	9165 ± 228	16763 ± 443	418 ± 3	0,196 ± 0,005	22,2 ± 0,9	0,98 ± 0,03	15,5 ± 0,5
Cavala 5 (S)	1596 ± 27	10637 ± 138	18896 ± 177	360 ± 2	0,225 ± 0,003	10,8 ± 0,2	1,03 ± 0,03	27,3 ± 0,5
Cavala 6 (S)	1441 ± 11	10409 ± 57	18518 ± 27	329 ± 11	0,21 ± 0,01	10,7 ± 0,4	1,05 ± 0,01	21,7 ± 0,7
Cioba 1 (S)	1088 ± 39	7974 ± 200	15818 ± 391	520 ± 14	0,115 ± 0,005	7,1 ± 0,5	0,52 ± 0,02	15,0 ± 0,5
Cioba 2 (S)	1099 ± 41	7960 ± 101	15057 ± 393	646 ± 40	0,153 ± 0,003	15,2 ± 0,2	1,17 ± 0,04	16,0 ± 0,4
Enxada (S)	1079 ± 38	8578 ± 152	16674 ± 381	580 ± 15	0,42 ± 0,05	8,4 ± 0,5	0,57 ± 0,03	18,9 ± 0,9
Robalo 1 (S)	1193 ± 82	7199 ± 184	15403 ± 560	563 ± 56	0,35 ± 0,04	15 ± 1	0,77 ± 0,04	20 ± 1
Robalo 2 (S)	1088 ± 88	7151 ± 461	15611 ± 622	706 ± 67	0,35 ± 0,03	8,2 ± 0,7	0,86 ± 0,04	18,4 ± 0,8
Robalo 3 (S)	1226 ± 86	7662 ± 474	14132 ± 652	2664 ± 53	1,6 ± 0,1	5,3 ± 0,5	0,66 ± 0,06	20 ± 1

I: Itamaracá; M: Maracáipe; MF: Maria Farinha; S: Sirinhaém

Tabela II.2.5. Frações de massa de elementos potencialmente tóxicos determinadas por ICP OES em amostras de pescado (BA e RJ).

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)						
	Cr	Ni	As	Se	Sr	Mo	Ba
Camarão VG (BA)	0,86 ± 0,01	<0,003	12,50 ± 0,02	2,13 ± 0,04	32,0 ± 0,2	0,040 ± 0,002	0,31 ± 0,01
Robalo 1 (BA)	0,49 ± 0,01	<0,003	0,57 ± 0,07	2,43 ± 0,15	0,89 ± 0,09	<0,001	0,06 ± 0,01
Robalo 2 (BA)	0,552 ± 0,013	<0,003	4,34 ± 0,18	1,76 ± 0,03	18,7 ± 0,2	<0,001	0,14 ± 0,01
Abadejo (BA)	0,823 ± 0,040	<0,003	3,76 ± 0,08	2,50 ± 0,02	6,85 ± 0,58	<0,001	<0,003
Robalo 1 (RJ)	0,590 ± 0,052	<0,003	8,59 ± 0,05	2,12 ± 0,03	14,0 ± 0,6	<0,001	0,20 ± 0,02
Robalo 2 (RJ)	0,80 ± 0,07	<0,003	6,43 ± 0,24	1,96 ± 0,08	62,8 ± 3,6	<0,001	0,74 ± 0,12
Robalo 3 (RJ)	0,544 ± 0,051	<0,003	3,36 ± 0,06	2,05 ± 0,07	5,3 ± 1,1	<0,001	<0,003
Cação 1 (RJ)	0,515 ± 0,070	<0,003	26,0 ± 0,4	2,55 ± 0,05	1,82 ± 0,02	<0,001	<0,003
Cação 2 (RJ)	0,535 ± 0,006	<0,003	40,8 ± 0,5	2,76 ± 0,08	15,1 ± 0,5	<0,001	<0,003
Cação 3 (RJ)	0,791 ± 0,042	<0,003	31,9 ± 0,4	4,34 ± 0,04	2,95 ± 0,17	<0,001	0,14 ± 0,01

Tabela II.2.6. Frações de massa de elementos potencialmente tóxicos determinadas por ICP OES em amostras de pescado de PE.

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)						
	Cr	Ni	As	Se	Sr	Mo	Ba
Pampo 1 (I)	0,204 ± 0,011	<0,003	6,11 ± 0,04	1,95 ± 0,06	1,39 ± 0,15	<0,001	<0,003
Pampo 2 (I)	0,214 ± 0,038	<0,003	5,13 ± 0,22	1,79 ± 0,14	1,65 ± 0,12	<0,001	<0,003
Pampo 3 (I)	0,233 ± 0,014	<0,003	7,05 ± 0,72	2,43 ± 0,01	2,40 ± 0,43	<0,001	<0,003
Saramunete 1 (I)	1,89 ± 0,31	0,24 ± 0,03	42,1 ± 1,0	2,02 ± 0,01	5,7 ± 0,1	0,15 ± 0,02	<0,003
Saramunete 2 (I)	0,884 ± 0,006	0,063 ± 0,004	46,0 ± 0,5	1,76 ± 0,06	12,9 ± 0,6	<0,001	<0,003
Saramunete 3 (I)	1,29 ± 0,18	0,044 ± 0,010	37,5 ± 1,6	1,72 ± 0,08	4,0 ± 0,2	<0,001	<0,003
Saramunete 4 (I)	0,469 ± 0,412	<0,003	39,2 ± 3,5	1,47 ± 0,06	1,33 ± 0,11	<0,001	<0,003
Cavala 1 (M)	0,800 ± 0,036	0,258 ± 0,020	0,974 ± 0,097	1,91 ± 0,08	0,315 ± 0,036	<0,001	<0,003
Cavala 2 (M)	1,22 ± 0,05	<0,003	4,61 ± 0,03	2,79 ± 0,09	3,03 ± 0,13	<0,001	<0,003
Xareu (M)	0,403 ± 0,033	<0,003	1,20 ± 0,02	3,20 ± 0,28	0,444 ± 0,022	<0,001	<0,003
Tainha 1 (MF)	1,37 ± 0,13	<0,003	2,25 ± 0,05	1,44 ± 0,16	3,32 ± 0,22	<0,001	0,33 ± 0,04
Tainha 2 (MF)	0,159 ± 0,220	<0,003	2,45 ± 0,02	1,88 ± 0,13	2,6 ± 0,2	<0,001	0,174 ± 0,004
Tainha 3 (MF)	0,46 ± 0,08	0,03 ± 0,01	4,61 ± 0,03	1,71 ± 0,04	1,63 ± 0,36	<0,0004	0,045 ± 0,005
Cavala 1 (S)	0,836 ± 0,016	<0,003	7,45 ± 0,33	2,58 ± 0,10	0,68 ± 0,05	<0,001	<0,003
Cavala 2 (S)	0,650 ± 0,045	<0,003	7,71 ± 0,16	3,08 ± 0,04	1,60 ± 0,05	<0,001	<0,003
Cavala 3 (S)	0,558 ± 0,027	0,319 ± 0,007	5,35 ± 0,10	2,39 ± 0,23	1,43 ± 0,06	<0,001	<0,003
Cavala 4 (S)	0,778 ± 0,060	<0,003	7,71 ± 0,26	2,89 ± 0,04	1,11 ± 0,06	<0,001	<0,003
Cavala 5 (S)	0,51 ± 0,03	<0,003	6,55 ± 0,12	2,71 ± 0,03	1,24 ± 0,13	<0,001	<0,003
Cavala 6 (S)	0,394 ± 0,105	<0,003	5,18 ± 0,06	2,88 ± 0,06	0,83 ± 0,07	<0,001	<0,003
Cioba 1 (S)	0,696 ± 0,024	<0,003	4,09 ± 0,07	2,66 ± 0,08	1,46 ± 0,04	<0,001	<0,003
Cioba 2 (S)	1,28 ± 0,14	<0,003	3,57 ± 0,10	2,68 ± 0,05	2,55 ± 0,04	<0,001	0,176 ± 0,017
Enxada (S)	0,493 ± 0,062	<0,003	1,78 ± 0,01	4,16 ± 0,12	1,54 ± 0,46	<0,001	<0,003
Robalo 1 (S)	0,28 ± 0,01	<0,003	3,18 ± 0,18	1,88 ± 0,10	1,36 ± 0,14	<0,001	0,154 ± 0,020
Robalo 2 (S)	0,306 ± 0,033	<0,003	0,190 ± 0,011	7,44 ± 0,28	1,76 ± 0,24	<0,001	0,22 ± 0,02
Robalo 3 (S)	0,185 ± 0,035	<0,003	0,473 ± 0,074	3,56 ± 0,30	2,4 ± 0,2	<0,001	0,24 ± 0,04

I: Itamaracá; M: Maracaípe; MF: Maria Farinha; S: Sirinhaém

II.2.5. Determinação de elementos potencialmente tóxicos em amostras de pescado por espectrometria de massa em plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Instrumento e parâmetros instrumentais

A determinação dos elementos As, Cd, Cr, Hg e Pb foi realizada empregando um ICP-MS (Modelo 7800, Agilent Technologies, Tóquio, JHS, Japão) equipado com uma célula de reação e colisão pressurizada com He de alta pureza (99,9999%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil). Argônio de alta pureza (99,999%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado para geração do plasma, nebulização e gás auxiliar. Na **Tabela II.2.7** são apresentados os parâmetros operacionais instrumentais e isótopos monitorados.

Tabela II.2.7. Parâmetros instrumentais empregados na determinação As, Cd, Cr, Hg e Pb em digeridos de pescado por ICP-MS

Parâmetros Instrumentais	Condições de operação
Potência do plasma (W)	1.550
Profundidade de amostragem (mm)	10
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,0
Vazão de gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,42
Tempo de estabilização (s)	20
Tempo de integração (s)	0,3
Vazão do gás de diluição (L min ⁻¹)	0,6
Célula de colisão e reação, vazão do He (mL min ⁻¹)	4,5
Nebulizador	Micromist
Câmara de nebulização	Tipo Scott, duplo-passo
Isótopos	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁵² Cr, ²⁰² Hg, ²⁰⁶ Pb

Reagentes, soluções de referência e amostras

Dois materiais de referência certificados, TORT-3-hepatopancreas de lagosta (Canadian National Research Council - NRC, Canada) e DOLT-5-fígado de cação (Canadian National Research Council - NRC, Canada) foram utilizados para avaliar a exatidão do método.

Toda vidraria foi mantida em HNO₃ 10% v v⁻¹ por pelo menos 24 h e lavada com água ultrapura antes do uso. Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade < 18.2 MΩ cm (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA). As soluções de referência (concentrações até 50 µg L⁻¹) foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque 1000 mg L⁻¹ de As, Cd, Cr, Hg e Pb (Fluka, Buchs St. Gallen, Suíça).

Os digeridos das amostras (item 4.1) foram diluídos 1:10 v/v antes da determinação por ICP-MS a fim de compatibilizar a acidez aos requisitos instrumentais.

Resultados

A exatidão do método ICP-MS foi comprovada pela análise de dois materiais de referência certificados, fígado de peixe (DOLT-5) e hepatopancreas de lagosta (TORT-3), obtendo-se valores de recuperação entre 97 e 107% para todos os elementos (**Tabela II.2.8**). Nas condições operacionais adotadas nas determinações por ICP-MS e considerando a massa de amostra e volume final dos digeridos, os limites de detecção foram estimados em $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ Cr, $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ As, $0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ Cd, $0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ Hg e 3mg kg^{-1} Pb, com 99,7% de confiança.

Tabela II.2.8. Avaliação da veracidade do método por ICP-MS nos CRMs (DOLT-5) e (TORT-3). Resultados expressos pela média \pm desvio padrão ($n=3$), com recuperações (%) entre parênteses.

Analito	Fração de massa (mg kg^{-1})			
	DOLT-5		TORT-3	
	Valor determinado	Valor certificado	Valor determinado	Valor certificado
As	$35,56 \pm 4,38$ (103)	$34,6 \pm 2,4$	$55,93 \pm 5,42$ (94)	$59,5 \pm 3,8$
Cd	$15,43 \pm 1,54$ (106)	$14,5 \pm 0,6$	$44,31 \pm 3,85$ (105)	$42,3 \pm 1,8$
Cr	$2,220 \pm 0,024$ (94)	$2,35 \pm 0,58$	$2,01 \pm 0,018$ (103)	$1,95 \pm 0,24$
Hg	$0,473 \pm 0,019$ (107)	$0,44 \pm 0,18$	$0,217 \pm 0,035$ (96)	$0,225 \pm 0,018$
Pb	$0,151 \pm 0,021$ (93)	$0,162 \pm 0,032$	$0,312 \pm 0,056$ (106)	$0,292 \pm 0,022$

Os limites máximos tolerados (LMT) de elementos tóxicos são definidos para uma diversidade de alimentos na Resolução RDC N° 487 e, particularmente, na Instrução normativa 88, ambas de 26 de Março de 2021. O artigo 10 da RDC N° 487 define que os LMT são definidos com base em:

- I - estudos toxicológicos;
- II - avaliações de risco conduzidas por organismos internacionalmente reconhecidos;
- III - magnitude e severidade dos efeitos adversos à saúde provocados pela ingestão do contaminante;
- IV - dados analíticos sobre a incidência do contaminante no alimento;
- V - dados de consumo do alimento;
- VI - grupo populacional para o qual o produto é indicado;
- VII - forma de preparo e consumo do alimento;
- VIII - normas, recomendações ou diretrizes do Codex Alimentarius ou de outros organismos internacionalmente reconhecidos;
- IX - boas práticas agrícolas, pecuárias, industriais e analíticas;
- X - relevância comercial do alimento;

- XI - possibilidades tecnológicas, incluindo disponibilidade de metodologia analítica;
- XII - histórico dos problemas de contaminação do alimento e
- XIII - dados existentes na literatura científica.

Os valores LMT para pescados e crustáceos são apresentados na **Tabela II.2.9**, ressaltando que a IN 88 não estabelece valores limites para cromo em pescados.

Tabela II.2.9. Limites máximos tolerados (LMT) de elementos tóxicos em peixes e crustáceos de acordo com Instrução normativa 88, de 26 de Março de 2021.

Elemento		LMT (mg kg ⁻¹)
As	crustáceos	1,00
	peixes	
Cd	crustáceos	0,50
	peixes	0,05-0,30 ^a
Cr	crustáceos	1,0-10,0 ^b
	peixes	
Hg	crustáceos	0,50
	peixes	0,50-1,00
Pb	crustáceos	0,50
	peixes	0,30

a. LMR dependem do tipo de pescado; b. Valores não informados para pescados, faixa referente a outros alimentos.

Fonte: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598>

II.2.6. Conclusões parciais

As frações de massa de Cr, As, Hg, Cd e Pb determinadas nos pescados adquiridos em regiões contaminadas pelo derramamento de óleo (item 4.1) são apresentadas nas **Tabelas II.2.10 e II.2.11**. As frações de massa acima dos LMT (Tabela 3) foram **destacadas em vermelho**. Verifica-se, com base nos resultados analíticos que:

- (i) A maioria das amostras apresentou frações de massa de As total acima do LMT, o que é um indicativo de contaminação e representa um risco real à saúde dos consumidores, especialmente considerando que os resultados referem-se às partes comestíveis dos pescados mais consumidos em cada região. Considerando que a toxicidade e biodisponibilidade de espécies de As varia significativamente, estudos de especiação química seriam necessários para a melhor avaliação do impacto aos consumidores;
- (ii) Um número significativo de amostras apresentou frações de massa de Hg acima do LMT, especialmente nos pescados adquiridos na BA e RJ, igualmente representando um risco à saúde dos consumidores. Ressalta-se que, além do impacto direto pela contaminação do mar, as frações de massa nos pescados são

magnificadas pelo efeito cumulativo do Hg, especialmente considerando peixes carnívoros;

- (iii) Um número menos significativo de amostras apresentou frações de massa de Cr acima do LMT para alimentos, e somente nos pescados adquiridos em PE. Nesse caso, os resultados são pouco conclusivos, especialmente porque a legislação não estabelece os limites para esse contaminante em pescados;
- (iv) Os resultados obtidos para Cd são pouco conclusivos, visto que as frações de massa que superaram os LMT são, em geral, associadas a incertezas elevadas;
- (v) Nas amostras de pescado adquiridas na BA e RJ, as quantidades de Pb foram inferiores ao limite de detecção do método analítico, indicando baixo risco aos consumidores com relação a esse contaminante. Os resultados obtidos para os pescados adquiridos em PE não são conclusivos, devido às incertezas elevadas associadas aos resultados obtidos a partir de diferentes digeridos. Considerando que o protocolo analítico nas determinações por ICP-MS foi o mesmo adotado para a análise das amostras coletadas na BA e RJ, provavelmente, essas altas incertezas são um indicativo de contaminação na etapa de preparo de amostras, apesar de todos os cuidados inerentes a esse processo e à experiência dos laboratórios analíticos com a análise de traços.

Tabela II.2.10. Frações de massa de elementos tóxicos determinados por ICP-MS. Amostras de pescado provenientes dos Estados da Bahia e Rio de Janeiro.

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)*		
	Cr	As	Hg
Camarão VG (BA)	0,204±0,001	7,0±0,3	0,031±0,002
Robalo 1 (BA)	0,09±0,01	0,337±0,006	0,38±0,03
Robalo 2 (BA)	0,14±0,01	2,3±0,2	0,66±0,07
Abadejo (BA)	0,219±0,02	1,93±0,07	0,077±0,007
Robalo 1 (RJ)	0,12±0,02	4,5±0,1	0,63±0,01
Robalo 2 (RJ)	0,14±0,05	3,8±0,3	0,58±0,02
Robalo 3 (RJ)	0,13±0,04	2,06±0,06	0,66±0,06
Cação 1 (RJ)	0,117±0,039	16,6±0,2	0,48±0,05
Cação 2 (RJ)	0,109±0,015	23±1	1,03±0,02
Cação 3 (RJ)	0,238±0,011	16±1	0,326±0,005

*Em todas as amostras a fração de massa de Pb foi inferior ao limite de detecção: 0,003 mg kg⁻¹

Tabela II.2.11. Frações de massa de elementos tóxicos determinados por ICP-MS. Amostras de pescado provenientes do Estados de Pernambuco.

Amostra	Fração de massa (mg kg ⁻¹)				
	Cr	As	Cd	Hg	Pb
Pampo 1 (I)	0,20±0,04	5,2±0,4	0,27±0,07	0,15±0,05	8±11
Pampo 2 (I)	0,16±0,04	5,0±0,2	0,23±0,02	0,12±0,02	3±4
Pampo 3 (I)	0,09±0,03	5,2±0,3	0,3±0,2	0,04±0,02	5±4
Saramunete 1 (I)	4,4±0,6	29,1±0,6	0,2±0,1	0,01±0,02	3±3
Saramunete 2 (I)	0,61±0,05	33±1	0,3±0,2	0,074±0,002	4±5
Saramunete 3 (I)	1,0±0,2	27±3	0,4±0,2	< 0,0004	7±4
Saramunete 4 (I)	0,5±0,1	32,1±0,7	0,04±0,01	< 0,0004	0,24±0,05
Cavala 1 (M)	0,56±0,05	0,77±0,07	0,4±0,1	1,2±0,4	5±4
Cavala 2 (M)	0,9±0,1	2,41±0,04	0,08±0,08	0,44±0,05	0,3±0,1
Xareu (M)	0,16±0,04	1,02±0,08	0,4±0,2	1,2±0,1	6±3
Tainha 1 (MF)	1,0±0,1	1,6±0,1	0,06±0,01	0,02±0,02	0,9±0,3
Tainha 2 (MF)	0,3±0,1	1,7±0,3	0,02±0,02	0,013±0,003	0,4±0,3
Tainha 3 (MF)	0,21±0,01	3,00±0,07	0,026±0,002	0,08±0,03	0,45±0,05
Tainha 4 (MF)	< 0,001	4,53±0,9	0,3±0,4	0,13±0,04	5±8
Cavala 1 (S)	0,57±0,03	6,56±0,02	0,3±0,2	0,7±0,6	0,4±0,3
Cavala 2 (S)	0,40±0,09	6,5±0,4	0,09±0,01	0,9±0,1	1,14±0,03
Cavala 3 (S)	0,35±0,09	4,0±0,2	0,11±0,05	0,2±0,1	2±1
Cavala 4 (S)	< 0,001	8,6±0,6	0,13±0,09	0,750±0,003	2±2
Cavala 5 (S)	0,17±0,05	4,53±0,08	0,25±0,07	0,17±0,01	3±1
Cavala 6 (S)	0,064±0,008	3,6±0,4	0,08±0,05	0,33±0,01	1,2±1,2
Cioba 1 (S)	0,50±0,05	3,3±0,2	0,27±0,05	0,30±0,01	1,6±0,8
Cioba 2 (S)	1,1±0,2	3,0±0,1	0,7±0,6	0,31±0,02	12±10
Enxada (S)	0,27±0,04	1,26±0,02	0,4±0,3	0,11±0,01	5±6
Robalo 1 (S)	< 0,001	1,7±0,3	0,05±0,02	0,2±0,2	0,2±0,2
Robalo 2 (S)	< 0,001	0,5±0,2	0,2±0,1	1,2±0,8	2±3
Robalo 3 (S)	< 0,001	0,81±0,06	0,10±0,05	0,070±0,004	0,8±0,8

I: Itamaracá; M: Maracá; MF: Maria Farinha; S: Sirinhaém

III. BALNEABILIDADE E IMPACTOS NA SAÚDE DA POPULAÇÃO: AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA E SEDIMENTOS POR CONTAMINAÇÃO POR HPA E BTX

III.1. Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são amplamente disseminados em ambientes aquáticos como resultado de processos naturais como biossíntese por algas, bactérias e algumas espécies vegetais de pequeno porte e, principalmente, por processos antrópicos como petrogênicos e pirolíticos (Li et al., 2016). Esses compostos encontram-se entre os contaminantes de maior interesse no estudo da contaminação ambiental em função do seu potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico, além de sua relativa persistência no ambiente (hidrocarbonetos de cadeia longa) e a possibilidade de bioacumulação. É não menos importante do ponto de vista ambiental, tem-se os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) que estão incluídos nas listas da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer, da Organização Mundial da Saúde, e da Agência Norte-Americana de Saúde e Segurança Ocupacional como compostos cancerígenos e mutagênicos (Chen et al. 2011; Deng et al. 2013; Guo et al. 2012; Culotta, et al. 2006; Guzzella et al. 2005; Soliman et al. 2014).

Diante dos riscos à vida aquática e à saúde humana que esses compostos podem causar, e levando em consideração o derramamento de óleo cru no litoral brasileiro em 2019 que atingiu mais de 4.000 km do litoral brasileiro alcançando 11 estados do nordeste e sudeste, justifica-se a avaliação de BTEX e HPA nas águas e nos sedimentos marinhos; o que ainda poderá subsidiar possíveis ações de gerenciamento e até mesmo intervenções ambientais.

Desse modo, o presente trabalho teve o objetivo de determinar os compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e 16 HPA considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos em sedimentos marinhos coletados na costa brasileira, verificando a contaminação atual do oceano Atlântico pelo derramamento de óleo ocorrido em 2019. Além disso, este trabalho está inserido na linha 2 - Balneabilidade e impactos na saúde da população: Avaliação e monitoramento da qualidade da água e sedimentos por contaminação por HPA e BTX - do Programa Ciência do Mar do INCTAA.

As amostras de sedimento analisadas foram coletadas no litoral do Rio de Janeiro e Espírito Santo (amostras ES/RJ), sendo os pontos amostrais: Praia de Grussaí - São João da Barra (P1); Praia dos Sonhos - São Francisco do Itabapoana (P2); Praia das Castanheiras - Guarapari (P3); Praia de Setiba - Guarapari (P4); Praia Curva da Jurema - Vitória (P5); Área de Preservação Ambiental Praia Mole - Serra (P6); Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz - Putiri (P7); Terra indígena de Comboios - Aracruz (P8); Regência, próximo ao Rio Doce - Linhares (P9); Área de Relevante

Interesse Ecológico (ARIE) de Degredo (P10); Parque Estadual de Itaúnas – Conceição da Barra (P11). E também foram coletadas amostras do litoral de Pernambuco (amostras PE), citando os seguintes pontos amostrais: Deo 2 – Mangue de Gaibu; Toca do Caranguejo 3 - Mangue de Gaibu; Toca do Caranguejo 2 - Mangue de Gaibu; Petro Coral - Mangue de Gaibu; Leão 5 – Fernando de Noronha; Leão 7 – Fernando de Noronha e Leão 9 – Fernando de Noronha.

A metodologia utilizada (com adaptações) no preparo de amostras foi obtida no Procedimento Operacional Padrão - Amostragem, preparo e determinação de hidrocarbonetos de petróleo em matrizes ambientais e biológicas - elaborado pelo Grupo de Química Ambiental da UFPR e a determinação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). E toda a infraestrutura necessária ao desenvolvimento do trabalho foi fornecida por laboratórios do Departamento de Química da UFSCar.

Em síntese, este relatório apresenta o preparo das amostras de sedimento, a descrição dos métodos de extração dos analitos por *headspace* e ultrassom, a validação dos métodos de extração, assim como, dos métodos cromatográficos que foram otimizados para a determinação e, finalmente, as concentrações dos BTEX e HPA nas amostras coletadas.

III.2. Determinação de BTEX em sedimento marinho

Preparo de amostra e método de extração por headspace

As amostras foram preparadas pesando 2 g de sedimento e 1g de NaCl em um vial (com capacidade de 22 mL) e, posteriormente, foi adicionado um volume de 10 mL de água ultrapura (as amostras foram analisadas em triplicatas).

Os analitos de interesse foram extraídos por *headspace*, no autoamostrador acoplado ao GC-MS, onde foi utilizado uma temperatura de incubação de 80 °C e agitação de 300 rpm durante 50 minutos.

Determinação de BTEX por GC-MS

As amostras foram analisadas em um equipamento SHIMADZU GC-2010 PLUS, com coluna DB-5MS ultra inerte da Agilent (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm do filme). Em relação as condições cromatográficas, as temperaturas do injetor, da fonte de íons e da interface foram 280 °C, 230 °C e 295 °C, respectivamente; e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste. O programa de temperatura da coluna iniciou com a injeção à 40 °C e permaneceu nessa temperatura por 2 minutos. Em seguida, a temperatura aumentou a uma taxa de 4 °C min⁻¹ até atingir 105 °C e permaneceu por 2 minutos, gradiente de 2 °C min⁻¹ até 120 °C, seguido de aquecimento de 4 °C min⁻¹ até 145 °C, gradiente de 2 °C min⁻¹ até 160 °C, seguido de uma taxa de 4 °C min⁻¹ até 200 °C e, finalmente, aumento de 30 °C min⁻¹ até 290 °C por 2 minutos. A detecção

foi obtida no modo SIM com impacto de elétrons (EI) de 70 eV e foi utilizado o modo *splitless* para a injeção.

Os dados obtidos foram tratados no software GC SOLUTION (*PostRun*) e o processamento dos dados foi realizado em planilhas do Excel. A concentração dos analitos foi determinada por meio das curvas de calibração e os valores finais foram corrigidos de acordo com a recuperação obtida para cada analito.

Validação do método de extração por headspace e do método empregado no GC-MS

A validação do método de extração por *headspace* foi obtida por meio de ensaios de recuperação. O ensaio consistiu em obter a razão das áreas dos analitos a partir de amostras de sedimento e amostras em água ultrapura (branco) que foram fortificadas com a mesma concentração dos analitos de interesse (100 ug/L), conforme mostrado na **Equação III.1**.

$$R (\%) = \frac{\text{Área do analito Fortificado no sedimento}}{\text{Área do analito Fortificado em água ultrapura}} \times 100$$

Equação III.1

O método utilizado no GC-MS foi validado em termos de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

A linearidade foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (r^2) obtido por meio das curvas de calibração que foram preparadas variando as concentrações dos analitos de interesse de acordo com a faixa de trabalho adequada. Os valores de coeficientes de correlação (r^2) acima de 0,99 foram considerados aceitáveis, segundo a recomendação da ANVISA (RE nº 899 de 29/05/2003).

O limite de detecção e de quantificação foram calculados para cada analito utilizando o método baseado nos parâmetros da curva de calibração. Nesse método, o Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LOQ) podem ser expressos de acordo com as **Equações III.2 e III.3**.

$$LD = 3,3 \cdot s/a$$

Equação 2

$$LQ = 10 \cdot s/a$$

Equação 3

Em que: s é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a é o coeficiente angular da curva de calibração.

III.3. Resultados

III.3.1. Validação do método empregado no GC-MS e do método de extração por *headspace*

Os valores obtidos para os coeficientes de correlação, limites de detecção e limites de quantificação (para o método do GC-MS) podem ser visualizados na **Tabela III.1**, assim como, os valores dos ensaios de recuperação (para o método de extração por *headspace*) podem ser observados na **Tabela III.2**.

Tabela III.1. Valores de coeficientes de correlação (R^2), Limites de Detecção e Limites de Quantificação (ng/g_{sed}) do método empregado no GC-MS.

Composto	R^2	LOD	LOQ
Benzeno	0,9923	0,60	2,01
Tolueno	0,9980	0,14	0,46
Etil-benzeno	0,9970	0,10	0,31
o-xileno	0,9966	0,10	0,31
m-xileno+p-xileno	0,9909	0,16	0,54

O menor valor para o limite de detecção foi obtido para o etil-benzeno e o-xileno (0,10 ng/g sed) e o maior valor para o benzeno (0,60 ng/g sed) enquanto o limite de quantificação variou de 0,31 ng/g sed para o etil-benzeno e o-xileno à 2,01 ng/g sed para o benzeno. E os valores dos coeficientes de correlação ficaram acima de 0,99, sendo considerados aceitáveis de acordo com a RE nº 899 de 29/05/2003, da ANVISA.

Tabela III.2. Valores de recuperação (expressos em porcentagem) e desvio padrão relativo (entre parênteses) para as amostras coletadas no litoral do ES/RJ e PE.

Composto	R (%) – Amostras ES/RJ	R (%) – Amostras PE
Benzeno	54 (8)	94 (6)
Tolueno	39 (15)	113 (5)
Etil-benzeno	69 (2)	105 (2)
o-xileno	86 (2)	116 (3)
m-xileno+p-xileno	82 (2)	117 (3)

Os valores de recuperação para as amostras do litoral do ES/RJ ficaram no intervalo de 39% a 86% e o desvio padrão variou de 2% a 15%. Nas amostras coletadas em PE o menor valor de recuperação encontrado foi de 94% (6) para o benzeno e o maior valor foi de 117% (3) para

m-xileno+p-xileno. Os valores encontrados estão em concordância com a Diretiva 2002/657/EC da Comissão Europeia, em que, são aceitos valores de recuperação no intervalo de 50% a 120% para o nível de fortificação menor ou igual à $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

III.3.2. Ocorrência de BTEX nas amostras de sedimento marinho

Após a determinação dos analitos por GC-MS foi possível verificar que houve a presença apenas de etil-benzeno no ponto amostral P11 das amostras ES/RJ, registrando a concentração de 44,2 ng/g_{sed} , e não foram quantificados nenhum dos BTEX em estudo nas amostras PE, conforme mostrado nas **Tabelas III.3 e III.4**.

III.4. Determinação de HPAs em sedimento marinho

III.4.1. Preparo de amostra e método de extração por *headspace* para os compostos mais voláteis - naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno

Foi pesado 1 g de sedimento e 1g de NaCl em um vial (22 mL) e, em seguida, foi adicionado 10 mL de água ultrapura (ressalta-se que as amostras foram previamente fortificadas com padrão interno e foram analisadas em triplicatas).

Os analitos de interesse foram extraídos por *headspace* no autoamostrador acoplado ao GC-MS, sendo utilizada uma temperatura de incubação de 80 °C durante 50 minutos e agitação de 300 rpm.

III.4.2. Determinação por GC-MS para os compostos mais voláteis naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno

As amostras foram analisadas em um equipamento SHIMADZU GC-2010 PLUS, com coluna DB-5MS Ultra Inerte da Agilent (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de filme). Foi utilizado gás hélio como gás de arraste e as temperaturas do injetor, fonte de íons e interface foram 250 °C, 200 °C e 250 °C, respectivamente. O programa de temperatura da coluna iniciou em 45 °C e manteve-se por 1 minuto. Posteriormente, a uma taxa de 45 °C min^{-1} atingiu-se a temperatura de 130 °C, seguido de aquecimento de 6 °C min^{-1} até 180 °C, gradiente de 5 °C min^{-1} até 240 °C e, finalmente, aquecimento de 5 °C min^{-1} até 310 °C, em que, manteve-se em isoterma por 5 minutos. A detecção foi obtida no modo SIM com impacto de elétrons (EI) de 70 eV e foi utilizado o modo *splitless* para a injeção.

Tabela III.3. Concentrações (ng/g_{sed}) de BTEX nas amostras ES/RJ

Concentração em ng/g _{sed}											
Composto	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Benzeno	<LOQ										
Tolueno	<LOQ										
Etil-benzeno	<LOQ	44,2									
o-xileno	<LOQ										
m-xileno+p-xileno	<LOQ										

Tabela III.4. Concentrações (ng/g_{sed}) de BTEX nas amostras PE

Concentração em ng/g _{sed}				
Composto	Deo 2	Toca do Caranguejo 2	Toca do Caranguejo 3	Petro Coral
Benzeno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Tolueno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Etil-benzeno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
o-xileno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
m-xileno+p-xileno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

III.4.3. Validação do método empregado no GC-MS para os compostos mais voláteis - naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno - e do método de extração por *headspace*

O método utilizado no GC-MS foi validado em termos de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação e o método de extração por *headspace* foi validado a partir de ensaios de recuperação, conforme descrito na seção III.1.

III.4.4. Resultados

III.4.4.1. Validação do método empregado no GC-MS para os compostos mais voláteis - naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno - e do método de extração por *headspace*

Em relação à linearidade, o menor valor obtido para o coeficiente de correlação foi para o naftaleno (0,9901) e o maior valor para o fluoreno (0,9934); todos os valores determinados encontram-se acima de 0,99 (RE nº 899 de 29/05/2003 – ANVISA).

O limite de detecção variou no intervalo de 0,02 ng/g_{sed} à 0,48 ng/ g_{sed} para os compostos acenaftileno e fluoreno, respectivamente. O menor limite de quantificação obtido foi de 0,07 ng/g_{sed}, para o acenaftileno, e o maior valor foi de 1,60 ng/g_{sed} para o fluoreno. Os valores dos parâmetros avaliados estão sumarizados na **Tabela III.5**.

Tabela III.5. Valores de coeficientes de correlação (R²), Limites de Detecção e Limites de Quantificação (ng/g_{sed}) do método empregado no GC-MS.

Composto	R ²	LOD	LOQ
Naftaleno	0,9901	0,30	1,00
Acenaftileno	0,9903	0,02	0,07
Acenafteno	0,9918	0,04	0,13
Fluoreno	0,9934	0,48	1,60

Já os valores de recuperação, para as amostras ES/RJ, variaram entre 41% (acenaftileno) e 103% (acenafteno), conforme mostrado na **Tabela III.6**. Embora a Diretiva 2002/657/EC da Comissão Europeia aceite valores de recuperação no intervalo de 50% a 120% para o nível de fortificação menor ou igual à 1 µg kg⁻¹, quando se encontram recuperações com valores inferiores a esse intervalo é necessário que haja um desvio padrão relativo de até 20% e no caso do acenaftileno (41%) seu desvio padrão foi de 4%. E a recuperação obtida para as amostras PE (Tabela 6) ficaram no intervalo de 51% (4) para o fluoreno e 108% (10) para o acenaftileno.

Tabela III.6. Valores de recuperação (expressos em porcentagem) e desvio padrão relativo (entre parênteses) para as amostras coletadas no litoral do ES/RJ e PE.

Composto	R (%) – Amostras ES/RJ	R (%) – Amostras PE
Naftaleno	66 (3)	56 (2)
Acenaftileno	41 (4)	108 (10)
Acenafteno	103 (7)	90 (14)
Fluoreno	91 (2)	51 (4)

III.4.4.2. Ocorrência dos HPA - naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno - nas amostras de sedimento marinho

Não houve a detecção dos compostos, naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno, no sedimento marinho das amostras ES/RJ (P1 ao P11) e amostras PE (Deo 2, Toca do Caranguejo 2, Toca do Caranguejo 3 e Petro Coral), conforme mostrado na **Tabela III.7** e **Tabela III.8**.

III.4.5. Preparo de amostra e método de extração por ultrassom para os demais HPA investigados

Foi pesado 0,5 g de sedimento em tubos (15 mL) para centrífuga com tampa rosca e o sedimento foi fortificado com padrão interno (na concentração de 100 µg/L). O processo de extração foi iniciado com a adição de 5 mL de uma solução extratora, composta de acetonitrila e diclorometano, na proporção 1:5 (v/v), ao tubo com o sedimento. Em seguida, os tubos foram tampados e sonicados por 30 minutos. Após a extração, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio. O procedimento descrito foi repetido por 2 vezes, totalizando 15 mL de sobrenadante coletado. Os extratos foram secos em um *dry-block* sob baixo fluxo de N₂ e, finalmente, as amostras foram reconstituídas em 500 µL de hexano e foi analisada por GC-MS (todas as amostras foram analisadas em triplicatas).

III.4.6. Determinação por GC-MS para os demais HPA investigados

As amostras foram analisadas em um equipamento SHIMADZU GC-QP2010, com coluna capilar SLB-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm do filme), da Sigma-ALODrich. Foi utilizado gás hélio como gás de arraste, a temperatura do injetor foi de 300 °C e da fonte de íons 250 °C. O programa de temperatura da coluna iniciou em 45 °C e manteve-se por 1 min. Posteriormente, à uma taxa de 45 °C min⁻¹ atingiu-se a temperatura de 130 °C, seguido de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até 180 °C, gradiente de 5 °C min⁻¹ até 240 °C e finalmente, aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 310 °C, onde manteve-se em isoterma por 5 minutos. O EM foi

operado no modo de impacto de elétrons (EI) com energia de ionização de 70 eV e foi utilizado o monitoramento de íon selecionado (SIM) para o modo de registro de íon. As amostras foram injetadas no modo *splitless*.

III.4.7. Resultados

III.4.7.1. Validação do método de extração por ultrassom e do método empregado no GC-MS para os demais HPA investigados.

Os resultados obtidos na validação do método utilizado no GC-MS para a determinação dos HPA menos voláteis, como os coeficientes de correlação, limites de detecção e limites de quantificação, assim como, os valores obtidos nos ensaios de recuperação, para validar o método de extração por ultrassom empregado neste trabalho, são mostrados na **Tabela III.9**.

Os valores dos coeficientes de correlação variaram no intervalo de 0,9910 (para o pireno) à 0,9996 (para o benzo(a)antraceno), ou seja, apresentaram seus valores acima de 0,99 e, portanto, estão em concordância com a RE nº 899 de 29/05/2003 – ANVISA.

O menor valor para o limite de detecção foi observado para o fluoranteno (0,40 ng/g_{sed}) e o maior valor para o dibenzo(a,h)antraceno (2,38 ng/g_{sed}). Já os limites de quantificação variaram na faixa de 1,34 ng/g_{sed} e 7,94 ng/g_{sed} para o fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno, respectivamente.

A recuperação dos analitos permaneceu no intervalo de 60% (dibenzo(a,h)antraceno) a 118% (criseno), sendo os valores encontrados considerados aceitável pela Diretiva 2002/657/EC (para o nível de fortificação de menor ou igual à 1 µg kg⁻¹).

III.4.7.2. Ocorrência dos demais HPA nas amostras de sedimento marinho

A partir dos resultados obtidos na determinação dos HPA menos voláteis no sedimento marinho RJ/ES (mostrados na **Tabela III.10**), nota-se que o ponto amostral P11 foi o local onde encontrou-se o maior número dos compostos investigados, sendo observadas as seguintes concentrações (ng/g_{sed}): 32,1 para o fenantreno; 35,2 para o antraceno; 169,4 para o fluoranteno; 147,0 para o pireno; 32,6 para o benzo(a)antraceno; 86,1 para o criseno; 36,5 para o benzo(b)fluoranteno; 154,0 para o benzo(k)fluoranteno; 22,5 para o indeno(1,2,3-cd)pireno e 81,5 para o benzo(g,h,i)perileno. Não foi encontrado o dibenzo(a,h)antraceno.

Tabela III.7. Concentrações (ng/g_{sed}) de naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno nas amostras ES/RJ.

Concentração em ng/g _{sed}											
Composto	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Naftaleno	< LOD										
Acenaftileno	< LOD										
Acenafteno	< LOD										
Fluoreno	< LOD										

Tabela III.8. Concentrações (ng/g_{sed}) de naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno nas amostras PE.

Concentração em ng/g _{sed}				
Composto	Deo 2	Toca do Caranguejo 2	Toca do Caranguejo 3	Petro Coral
Naftaleno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Acenaftileno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Acenafteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Fluoreno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Tabela III.9. Valores de coeficientes de correlação (R^2), Limites de Detecção e Limites de Quantificação (ng/g_{sed}) do método empregado no GC-MS.

Composto	R^2	LOD	LOQ	REC
Fenantreno	0,9957	1,54	5,14	115 (5)
Antraceno	0,9924	1,19	3,95	86 (5)
Fluoranteno	0,9920	0,40	1,34	110 (7)
Pireno	0,9910	0,65	2,17	104 (5)
Benzo(a)antraceno	0,9996	0,53	1,75	69 (2)
Criseno	0,9958	1,77	5,91	118 (14)
Benzo(b)fluoranteno + Benzo(k)fluoranteno	0,9952	1,86	6,20	80 (16)
Benzo(a)pireno	0,9938	1,48	4,94	79 (3)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9956	2,24	7,49	107 (5)
Dibenzo(a,h)antraceno	0,9928	2,38	7,94	60 (5)
Benzo(g,h,i)perileno	0,9988	2,06	6,87	71 (18)

No ponto P10 foram encontrados os compostos fenantreno ($18,6 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$), fluoranteno ($54,9 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$), pireno ($55,8 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$) e criseno ($26,5 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$).

Já nos pontos P9 e P7 foram encontrados os compostos fluoranteno e pireno. As concentrações de $16,6 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ e $18,7 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ foram obtidas para o composto fluoranteno nos pontos P9 e P7, respectivamente. E as concentrações de pireno foram $20,6 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ para P9 e $23,2 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ para P7.

Nos pontos P5 e P6 foi verificado somente a presença de pireno nas concentrações de $20,2 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ e $18,6 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$, respectivamente. Nos demais pontos (P1 ao P4) não foram detectados nenhum dos contaminantes investigados.

Em relação a determinação dos HPA nas amostras PE (**Tabela III.11**), para o ponto amostral Deo 2 os compostos antraceno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno ficaram abaixo do limite de quantificação. Já os compostos benzo(a)antraceno, criseno, fenantreno, fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno variaram suas concentrações na faixa de $20,4 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ à $38,8 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$. E os compostos benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno e pireno mantiveram suas concentrações em $44,0 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$, $58,9 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$ e $106,1 \text{ ng/g}_{\text{sed}}$, respectivamente.

O ponto amostral Toca do Caranguejo 2 variou suas concentrações de 8,9 ng/g_{sed} à 27,8 ng/g_{sed} para os compostos indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(a)antraceno, fenantreno, criseno, benzo(g,h,i)perileno e benzo(a)pireno; e de 32,0 ng/g_{sed} à 49,9 ng/g_{sed} para o antraceno, fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno. O pireno foi o composto encontrado em maior concentração (72,7 ng/g_{sed}), e o benzo(b)fluoranteno em conjunto com o benzo(k)fluoranteno ficaram abaixo do limite de quantificação.

Já o ponto amostral Toca do Caranguejo 3 teve suas maiores concentrações para os compostos pireno (138,8 ng/g_{sed}), benzo(g,h,i)perileno (131,9 ng/g_{sed}), indeno(1,2,3-cd)pireno (97,7 ng/g_{sed}) e benzo(a)pireno (75,9 ng/g_{sed}). E os compostos dibenzo(a,h)antraceno, antraceno, benzo(a)antraceno, fluoranteno, fenantreno e criseno variaram suas concentrações entre 33,2 ng/g_{sed} e 59,9 ng/g_{sed}. Os benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno ficaram abaixo do limite de quantificação.

De maneira geral, o ponto amostral Petro Coral apresentou os maiores valores de concentração para os analitos investigados. Os maiores valores obtidos foram para criseno (1650,0 ng/g_{sed}), pireno (710,0 ng/g_{sed}), benzo(a)antraceno (319,6 ng/g_{sed}), benzo(k)fluoranteno (294 ng/g_{sed}), fluoranteno (232,5 ng/g_{sed}), benzo(a)pireno (200,0 ng/g_{sed}) e benzo(b)fluoranteno (175,1 ng/g_{sed}). O fenatreno, dibenzo(a,h)antraceno, antraceno e benzo(g,h,i)perileno mantiveram suas concentrações em 98,1 ng/g_{sed}, 87,4 ng/g_{sed}, 84,1 ng/g_{sed} e 40,7 ng/g_{sed}, respectivamente. E o menor valor obtido para a concentração foi de 19,1 ng/g_{sed} para o Indeno(1,2,3-cd)pireno.

Em relação aos pontos amostrais Leão 5, Leão 7 e Leão 9, não foi possível a obtenção da concentração dos analitos estudados. Esses pontos possuíam características muito distintas dos demais pontos amostrais, eram sedimentos completamente oleosos, conforme pode ser visto na **Figura III.1**. Portanto, foi preciso otimizar um preparo de amostra para os referidos pontos e quando foi possível injetá-los no GC-MS, houve a supressão do sinal analítico. E como foi enviado uma pequena quantidade de amostras para tais pontos (o que também é possível visualizar na Figura 1, que é o ponto Leão 7 após a liofilização) não foi possível otimizar um novo método cromatográfico e reinjetá-las.

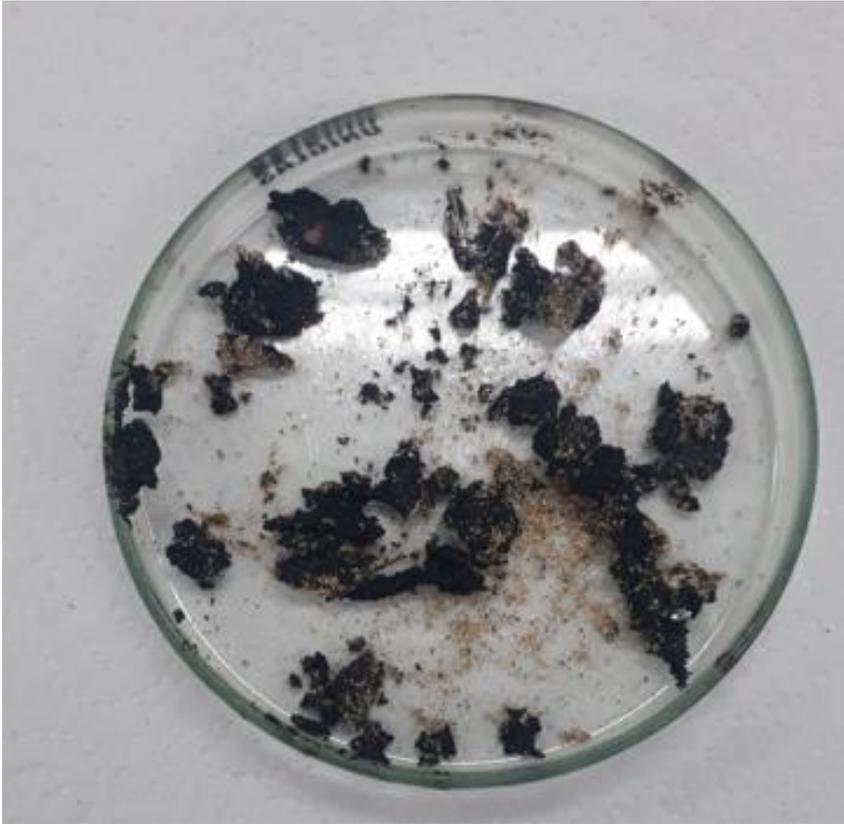


Figura III.1. Ponto Leão 7 após liofilização; as amostras dos pontos Leão 5 e Leão 9 são similares a esta.

III.5. Conclusões

Diante do proposto, no presente trabalho, foi possível realizar a determinação de BTEX e HPA em sedimentos marinhos coletados no litoral do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Pernambuco, em que, foram utilizados padrões isotopicamente marcados para assegurar a qualidade analítica e a rastreabilidade dos resultados, sendo os dados obtidos compartilhados com as instituições parceiras.

Tabela III.10. Concentrações (ng/g_{sed}) dos demais HPA nas amostras de sedimento RJ/ES.

Composto	Concentração em ng/g _{sed}										
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Fenantreno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18,6 (5)	32,1 (4)
Antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	35,1 (2)
Fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18,5 (7)	< LOD	16,6 (15)	54,9 (11)	169,4 (9)
Pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	20,2 (5)	18,6 (3)	23,2 (8)	< LOD	20,6 (6)	55,8 (2)	147,0 (20)
Benzo(a)antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	32,6 (3)
Criseno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	26,5 (10)	86,1 (10)
Benzo(b)fluoranteno + Benzo(k)fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	36,5 (18)
Benzo(a)pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	154,0 (24)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	22,5 (12)
Dibenzo(a,h)antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo(g,h,i)perileno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	81,5 (12)

Tabela III.11. Concentrações (ng/g_{sed}) dos demais HPA nas amostras de sedimento PE.

Composto	Concentração em ng/g _{sed}			
	Deo 2	Toca do Caranguejo 2	Toca do Caranguejo 3	Petro Coral
Fenantreno	38,8 (2)	24,9 (8)	55,9 (8)	98,1 (3)
Antraceno	<LOQ	32,0 (6)	37,6 (5)	84,1 (2)
Fluoranteno	37,1 (4)	32,1 (1)	49,7 (9)	232,5 (11)
Pireno	106,1 (2)	72,7 (2)	138,8 (9)	710,0 (12)
Benzo(a)antraceno	20,4 (7)	18,6 (6)	43,6 (5)	319,6 (20)
Criseno	24,6 (2)	25,4 (10)	59,9 (1)	1650 (3)
Benzo(b)fluoranteno + Benzo(k)fluoranteno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	175,1 (12) benzo(b) 294,0 (13) benzo(k)
Benzo(a)pireno	44,0 (3)	27,8 (2)	79,5 (12)	200,0 (4)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	32,8 (2)	8,9 (10)	97,7 (20)	19,1 (8)
Dibenzo(a,h)antraceno	35,7 (2)	49,9 (10)	33,2 (11)	87,4 (13)
Benzo(g,h,i)perileno	58,9 (4)	25,5 (6)	131,9 (14)	40,7 (19)

III.4. Determinação de HPA em amostras de água e sedimentos do Estado do Espírito Santo e Norte do Estado do Rio de Janeiro.

III.4.1. Locais de coleta

A **Figura III.4.1** exibe os locais onde foram coletadas as amostras de água e sedimentos analisadas.

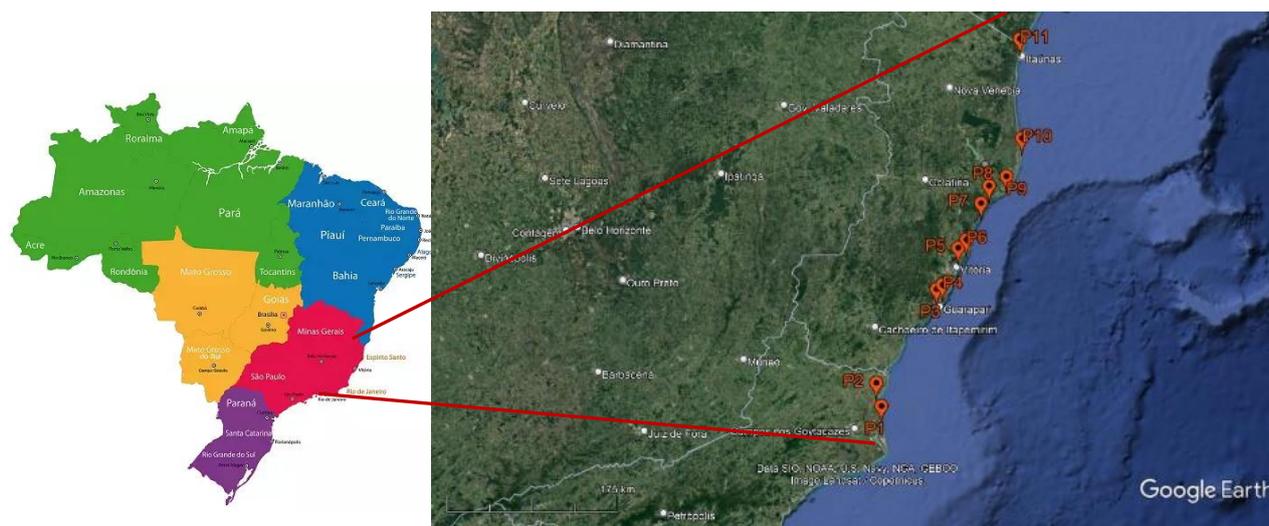


Figura III.4.1. Localização dos pontos de amostragem de água e sedimentos para análise de HPA.

Dentre as 11 praias listadas na **Tabela II.4.1**, em 7 delas foram encontradas possíveis manchas do petróleo derramado em 2019, e 3 praias são de controle, sendo a Praia Mole/Serra uma Área de Preservação Ambiental (P6). As praias P6 a P11 foram amostradas com a colaboração do Prof. Dr. Jefferson Rodrigues de Souza e as praias P1 a P5 foram amostradas pela Prof. Dr. Maria Cristina Canela com auxílio dos alunos do GPQA- CCT/UENF. As amostras de água foram coletadas na camada abaixo de 30 cm da lâmina d'água e as amostras de sedimentos (com profundidade a partir de 1 m de água e apenas nos primeiros 20 cm de sedimento). As amostras provenientes das praias impactadas pelo derramamento situadas no Norte do Estado do Espírito Santo que foram coletadas pela bióloga e Dra. Vanessa Simões e gentilmente compartilhadas com a equipe do INCTAA.

Todos os materiais utilizados nas coletas foram devidamente escolhidos de acordo com a amostra (material de vidro e sem *headspace*), previamente descontaminados com solução de Extran conforme protocolo redigido pelo grupo da UFPR. As amostras foram mantidas refrigeradas até as análises.

Todas as amostras de água tiveram os parâmetros de pH e condutividade determinados.

Tabela III.4.1. Locais de amostragem e suas características.

Sigla	Local	UF	Encontrada contaminação em 2019	Coordenadas (UTM)	Data Amostragem
P1	Praia de Grussaí - São João da Barra	RJ	Sim	21.695499°S 41.024148°W	24/02/2022
P2	Praia dos Sonhos - São Francisco do Itabapoana		Sim	21.501236°S 41.069601°W	24/02/2022
P3	Praia das Castanheiras – Guarapari	RJ	Sim	20.672119°S 40.496642°W	12/02/2022
P4	Praia de Setiba - Guarapari		Não	20.634971°S 40.435616°W	12/02/2022
P5	Praia Curva da Jurema - Vitória		Sim	20.308729°S 40.288724°W	11/02/2022
P6	Área de Preservação Ambiental Praia Mole - Serra*		Não	20.239680°S 40.213161°W	15/01/2022
P7	Refúgio de Vida Silvestre de Santa Cruz - Putiri*	ES	Sim	19.902201S 40.096272W	16/01/2022
P8	Terra indígena de Comboios – Aracruz		Não	19.753606°S 40.001596°W	17/01/2022
P9	Regência, próximo ao Rio Doce - Linhares*		Sim	19.673614°S 39.882374°W	19/01/2022
P10	Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) de Degredo*	ES	Sim	19.302064°W 39.689446°S	20/01/2022
P11	Parque Estadual de Itaúnas - Conceição da Barra*		Sim	18.404734°S 39.694117W	23/01/2022

*Unidades de conservação

III.4.2. Resultados obtidos

III.4.2.1 Características visuais das amostras

As amostras de água do mar possuíam aparência límpida, transparente, incolor e inodoro, somente as amostras P2 e P10 apresentaram um pouco de sedimento inicialmente suspenso, mas que se depositou como corpo de fundo (**Figura III.4.2**).

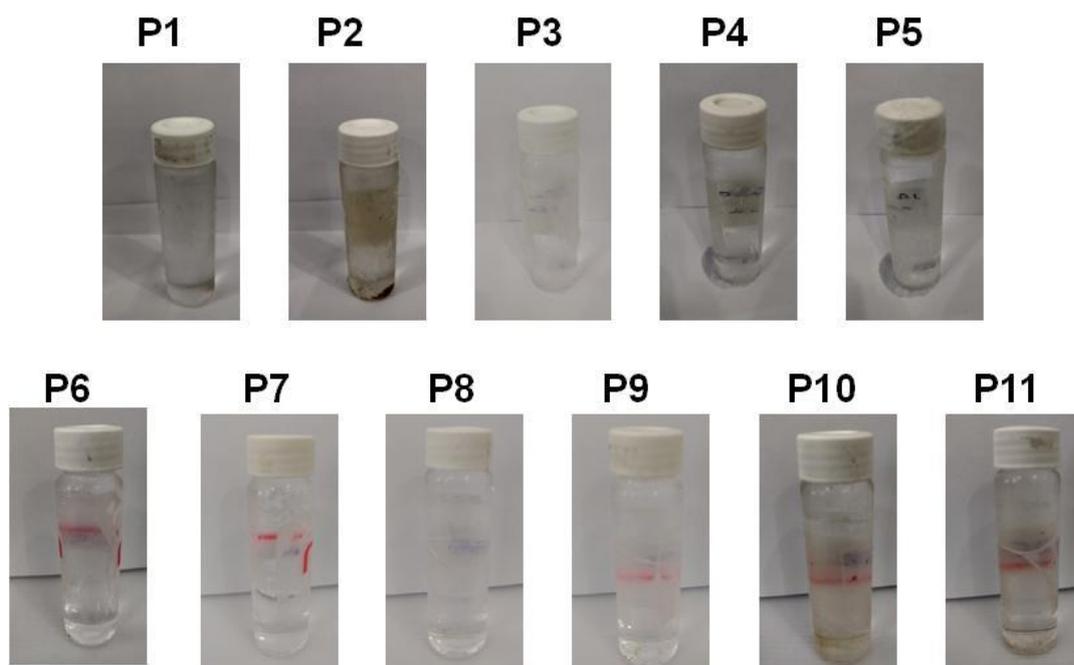


Figura III.4.2. Características visuais das amostras de água do mar.

Os sedimentos possuíam características diferentes entre si. As amostras P1, P3, P4, P6, P7 e P8 possuíam uma coloração mais clara que os demais, que possuíam uma coloração mais escura, principalmente P10 e P11, conforme **Figura IV.3**. Quanto à granulometria, P1 a P5, P8 e P9 possuíam característica mais arenosa com sedimentos grossos; P6 possuía sedimentos de tamanhos mistos, sendo uma parte arenosa e um pouco lamosa. P7, P10 e P11 possuíam mais característica de lama, principalmente o sedimento P11, que também tinha a menor granulometria de todas as amostras (GARRISON, 2016)



Figura III.4.3. Características visuais das amostras de sedimento marinho.

III.4.2.2. Parâmetros físico-químicos

As amostras de água do mar foram avaliadas quanto a pH e condutividade; o pH variou na faixa de 7,25 a 8,17, e condutividade variou de 22310 a 74670 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os valores estão descritos na **Tabela III.4.2**.

Tabela III.4.2. Dados de pH e condutividade das amostras.

Amostra	pH	Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$
P1	7,15	70360
P2	7,45	22310
P3	7,35	74670
P4	7,25	74210
P5	7,26	73620
P6	8,17	50720
P7	8,14	53570
P8	8,16	54060
P9	8,15	50890
P10	8,10	57410
P11	8,05	58510

Os resultados de pH e condutividade são coerentes com águas salinas, embora os pontos de P1 a P5 se diferem dos pontos seguintes. A causa pode ser o uso de equipamento diferente, pois os parâmetros dos pontos de 6 a 11 foram medidos em campo com sonda paramétrica e os anteriores no laboratório da UENF. Por outro lado, os valores de pH dos dados obtidos no campo são mais similares aos valores determinados em água do mar, mostrando que as amostras trazidas ao laboratório podem também ter sofrido algum tipo de degradação microbiológica alterando os seus resultados. No que diz respeito ao interesse do trabalho, que são os compostos orgânicos, todas as amostras foram tratadas da mesma maneira, acondicionadas a frio e analisadas imediatamente a sua chegada ao laboratório.

III.4.2.3. Ocorrência de BTEX nas amostras de água e sedimento

Ocorrência de BTEX nas amostras de água e sedimentos marinhos

A maioria das amostras de água apresentaram concentrações dos compostos abaixo do limite de detecção. Nas amostras P6, P7, P8, P10 e P11 foi detectado o-Xileno, porém abaixo do limite de quantificação, conforme a **Tabela III.4.3**.

Tabela III.4.3. Valores de concentração de BTEX em amostras de água.

Amostras de água do mar	Benzeno* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tolueno** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Etilbenzeno** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	m+p-Xileno** ($\mu\text{g L}^{-1}$)	o-Xileno**/** ($\mu\text{g L}^{-1}$)
P1A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P2A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P3A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P4A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P5A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P6A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LQ
P7A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LQ
P8A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
P9A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P10A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
P11A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ

*LOD Benzeno = 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ **LOD = 0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$; *** LOQ = 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$

Para a maior parte das amostras de sedimentos, as concentrações destes compostos estavam abaixo do limite de detecção, e a amostra P8 que foi detectado o-Xileno, porém abaixo do limite de quantificação, conforme **Tabela III.4.4.**

Ocorrência de BTEX nas amostras de sedimentos marinhos liofilizados

Os BTEX também foram analisados nas amostras de sedimento após a liofilização por GC-MS por *headspace* e foi possível verificar a presença apenas de etilbenzeno no ponto amostral P11, registrando a concentração de 44,2 ng.gsed^{-1} , conforme descrito na **Tabela III.4.5.**

Tabela III.4.4. Valores de concentração de BTEX em amostras de sedimentos úmidos - UENF.

Amostras de sedimentos	Benzeno* (ng gsed ⁻¹)	Tolueno** (ng gsed ⁻¹)	Etilbenzeno** (ng gsed ⁻¹)	m+p-Xileno** (ng gsed ⁻¹)	o-Xileno*** (ng gsed ⁻¹)
P1S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P2S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P3S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P4S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P5S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P6S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P7S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P8S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
P9S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P10S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
P11S	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

*LOD Benzeno = 0,8 ng gsed⁻¹**LOD = 1,65 ng gsed⁻¹; *** LOQ = 3,25 ug L⁻¹

Tabela III.4.5. Concentração (ng g sed⁻¹) de BTEX em amostras de sedimentos liofilizados - UFSCar.

Amostras de sedimentos*	Benzeno* (ng g sed ⁻¹)	Tolueno (ng g sed ⁻¹)	Etilbenzeno (ng g sed ⁻¹)	m+p-Xileno (ng g sed ⁻¹)	o-Xileno (ng g sed ⁻¹)
P1S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P2S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P3S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P4S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P5S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P6S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P7S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P8S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P9S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P10S	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
P11S	<LOQ	<LOQ	44,2	<LOQ	<LOQ

- LOQ – Benz=2,01 ng gsed⁻¹; Tol= 0,46 ng gsed⁻¹; Etil e m-p-xi= 0,31 ng gsed⁻¹; o-xi= 0,54 ng gsed⁻¹

III.4.2.4. Ocorrência de HPA nas amostras de sedimento

Ocorrência dos HPA, naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno, nas amostras de sedimento marinho

Não houve a detecção dos compostos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno, nas amostras de sedimento marinho de todos os pontos amostrais (P1 ao P11), conforme mostrado na **Tabela III.4.6**.

Como os BTEX, estes compostos também são bastante voláteis e, portanto, apenas contaminações recentes e análises imediatas à coleta poderiam detectá-los com maior probabilidade.

Ocorrência dos demais HPA nas amostras de sedimento marinho

Nos pontos P1 ao P4 e P8, nenhum dos contaminantes investigados foram identificados. Nos pontos P5 e P6 foram verificados somente a presença de pireno nas concentrações de 20,2 ng g⁻¹ sed e 18,6 ng g⁻¹ sed, respectivamente.

Já nos pontos P7 e P9 foram determinados apenas os compostos fluoranteno e pirano, sendo as concentrações de 18,7 ng g⁻¹ sed e 16,6 ng g⁻¹ sed de fluoranteno nos pontos P7 e P9, respectivamente e as concentrações de pireno, foram 23,2 ng g⁻¹ sed para P7 e 20,6 ng g⁻¹ sed para P9.

Tabela III.4.6. Concentrações (ng g sed⁻¹) de naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno nas amostras de sedimento.

Amostras de sedimentos liofilizados*	Naftaleno (ng g ⁻¹ sed)	Acenaftileno (ng g ⁻¹ sed)	Acenafteno] (ng g ⁻¹ sed)	Fluoreno (ng g ⁻¹ sed)
P1S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P2S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P3S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P4S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P5S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P6S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P7S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P8S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P9S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P10S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
P11S	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

*LOD Naf = 0,30 ng g⁻¹ sed; Acenaftileno = 0,02 ng g⁻¹ sed; acenafteno = 0,04 ng g⁻¹ sed;

Flu = 0,48 ng g⁻¹ sed

No ponto P10 foram encontrados os compostos fenantreno (18,6 ng g⁻¹ sed), fluoranteno (54,9 ng g⁻¹ sed), pireno (55,8 ng g⁻¹ sed) e criseno (26,5 ng g⁻¹ sed). Nota-se que o P11 foi o ponto amostral em que foi determinado o maior número dos compostos investigados, sendo encontradas as concentrações (ng g⁻¹ sed): 32,1 para o fenantreno; 35,2 para o antraceno; 169,4 para o fluoranteno; 147,0 para o pireno; 32,6 para o benzo(a)antraceno; 86,1 para o criseno; 36,5 para o benzo(b)fluoranteno; 154,0 para o benzo(k)fluoranteno; 22,5 para o indeno(1,2,3-cd)pireno e 81,5 para o benzo(g,h,i)perileno. Não foi encontrado o dibenzo(a,h)antraceno. Todos os valores de concentração de HPA estão descritos na **Tabela III.4.7**. Na **Tabela III.4.8** estão descritos os valores de LOD e LOQ para estes compostos em sedimentos.

Tabela III.4.7. Concentrações (ng g⁻¹ sed) dos demais HPA nas amostras de sedimento.

Concentrações dos HPA em ng g ⁻¹ sed								
Composto	P1 a P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Fenantreno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18,6 (5)	32,1 (4)
Antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	35,1 (2)
Fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	18,5 (7)	< LOD	16,6 (15)	54,9 (11)	169,4 (9)
Pireno	< LOD	20,2 (5)	18,6 (3)	23,2 (8)	< LOD	20,6 (6)	55,8 (2)	147,0 (20)
Benzo(a)antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	32,6 (3)
Criseno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	26,5 (10)	86,1 (10)
Benzo(b)fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	36,5 (18)
Benzo(k)fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	154,0 (24)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	22,5 (12)
Dibenzo(a,h)antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo(g,h,i)perileno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	81,5 (12)

Tabela III.4.8. Valores de recuperação (expressos em porcentagem) e desvio padrão relativo (entre parênteses), coeficientes de determinação (R^2), Limites de Detecção e Limites de Quantificação (ng g^{-1} sed).

Composto	R (%)	R^2	LOD	LOQ
Fenantreno	115 (3)	0,9957	1,54	5,14
Antraceno	86 (4)	0,9924	1,19	3,95
Fluoranteno	110 (7)	0,9920	0,40	1,34
Pireno	104 (2)	0,9910	0,65	2,17
Benzo(a)antraceno	69 (2)	0,9996	0,53	1,75
Criseno	118 (14)	0,9958	1,77	5,91
Benzo(b)fluoranteno + Benzo(k)fluoranteno	80 (16)	0,9952	1,86	6,20
Benzo(a)pireno	79 (3)	0,9938	1,48	4,94
Indeno(1,2,3-cd)pireno	107 (5)	0,9956	2,24	7,49
Dibenzo(a,h)antraceno	60 (5)	0,9928	2,38	7,94
Benzo(g,h,i)perileno	71 (18)	0,9988	2,06	6,87

Com auxílio da Figura 4, podemos visualizar uma tendência de aumento da concentração de HPA, a medida que o ponto de amostragem esteja mais ao norte, nesta região estudada. O ponto P10 apresentou uma concentração de HPA total de 7,7 vezes maior que o Ponto P5, enquanto o ponto P11 possui uma concentração 40 vezes maior que o ponto P5.

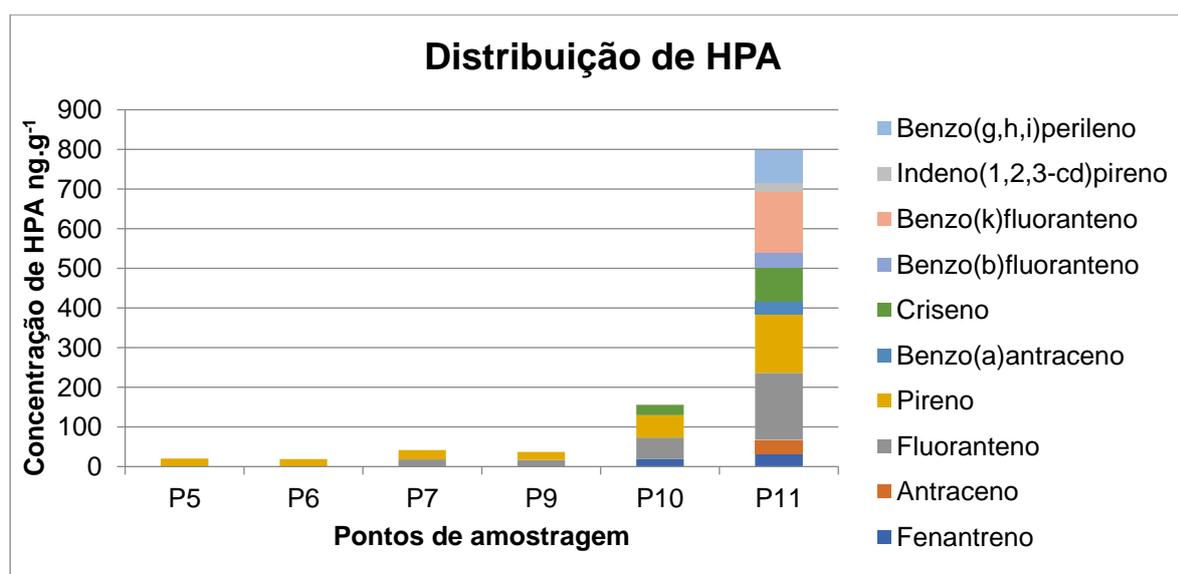


Figura III.4.4. Distribuição de HPA nas amostras de sedimentos.

Em comparação com outros estudos, temos que os valores encontrados estão dentro da faixa de concentração de HPA totais já relatada na literatura. OKOBUE et al, (2017) encontraram concentração total de HPA na faixa de 0,001 a 0,014 ng.g⁻¹ em sedimentos numa região próxima a despejo de água residual de plataformas. HASSAN et al, (2018) encontraram concentrações de 3.146 a 14.350 ng.g⁻¹ em sedimentos superficiais da Zona Econômica Marítima do Catar, região com exploração e produção de petróleo e gás. YANG et al, 2020 encontraram a faixa de 4 a 3700 ng.g⁻¹ em sedimentos marítimos costeiros, numa baía semi-fechada, que possui alto escoamento de resíduos domésticos, industriais, agrícolas e tráfego de navio e transporte de petróleo; porém nos pontos mais próximos a margem encontraram uma faixa de 100 a 700 ng.g⁻¹. E BOITSOV et al (2021) encontraram uma faixa de 558 a 6995 ng.g⁻¹ em sedimento marinho superficial numa área próxima de exploração de petróleo. Por outro lado, conhecendo o histórico da região estudada, sabe-se que o ponto 10 (Área de interesse ecológico de Degredo-ES) e o ponto 11 (Parque Estadual de Itaúnas-ES) chegaram a identificar a mancha de petróleo do acidente de 2019. Em campanha recente ao Parque Estadual de Itaúnas (abril de 2023), observou-se em área de preservação a presença de fragmentos de petróleo na praia (**Figura III.4.5**).



Figura III.4.5. Fragmentos de petróleo encontrados na praia da Trilha do Pescador no Parque Nacional de Itaúnas-ES em abril de 2023.

III.4.2.5. Possíveis fontes da ocorrência HPA nas amostras

Em relação ao perfil de composição dos HPA encontrados, podemos separá-los de acordo com a quantidade de anéis aromáticos. Conforme mostrado na **Figura III.4.6**, todas as amostras em que foram detectados HPA possuíam compostos de 4 anéis aromáticos, enquanto 4 amostras possuíam compostos de 3 anéis e somente uma amostra possuiu compostos de 5 anéis.

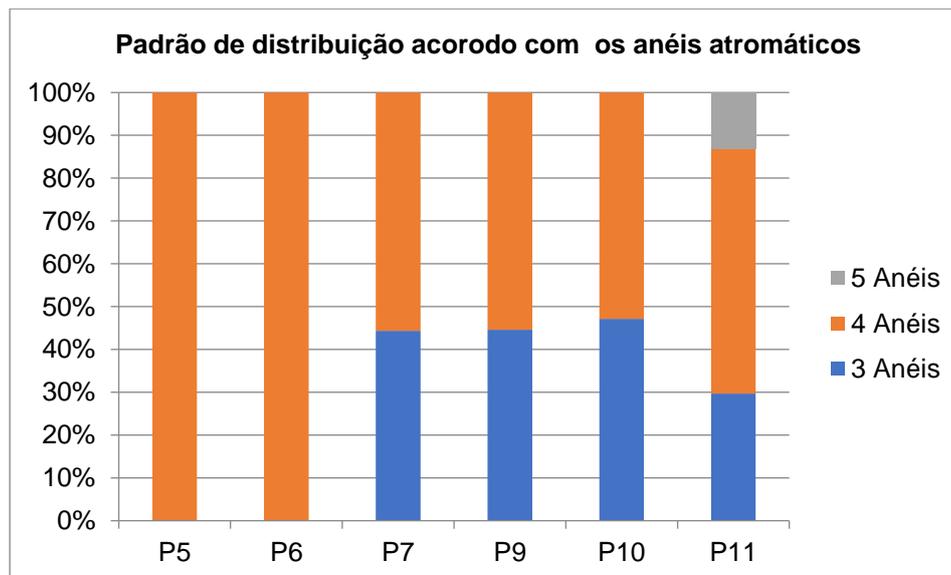


Figura III.4.6. Padrão de distribuição de HPA nas amostras de sedimentos de acordo com a quantidade de anéis aromáticos.

De acordo com a quantidade de anéis aromáticos, podemos dividir em dois grupos: 1) Baixa massa molecular (2 a 3 anéis) e 2) Alta massa molecular (4 a 6 anéis). Através da razão entre esses dois grupos é possível ter o primeiro indicador qualitativo aqui citado, o qual indica a origem desses compostos nos pontos de amostragem. Como mostrado na **Figura III.4.7**, esse indicador aponta para uma fonte Pirolítica e não Petrogênica, por ter mais HPA de alta massa molecular e menos de HPA de baixa massa molecular.

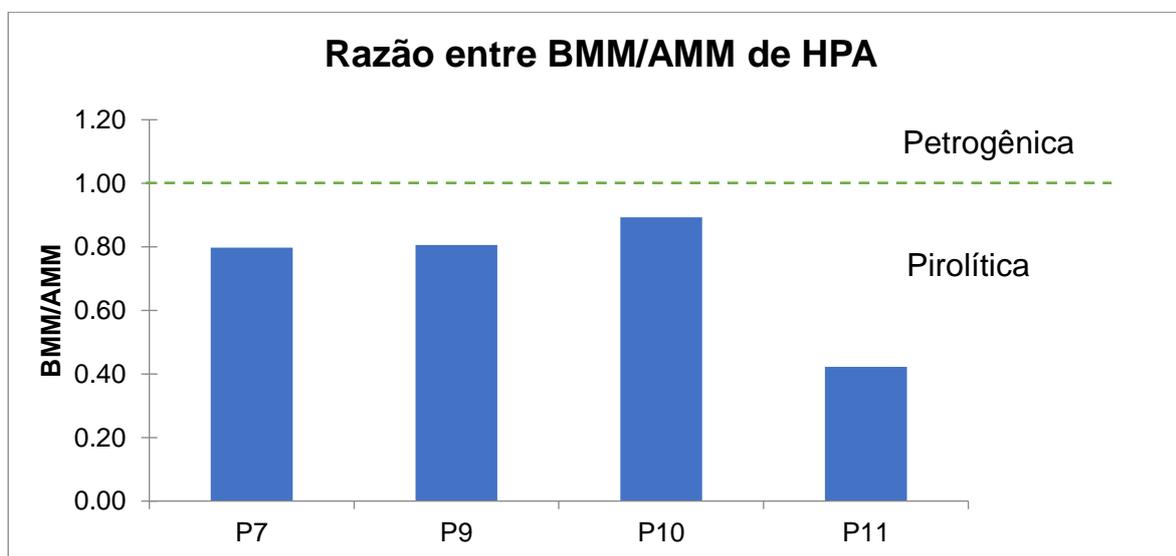


Figura III.4.7. Razão entre HPA de baixa massa molecular por alta massa molecular.

Outros indicadores podem ser usados para uma avaliação mais abrangente. As razões entre Fluoranteno/Fluoranteno+Pireno, também pode ser utilizado como indicador de fonte de HPA. Nesse

trabalho, esses foram os principais compostos determinados e foi possível analisar essas razões nos pontos P7, P9, P10 e P11 (**Figura III.4.8**). Como resultado, os pontos P7, P9 e P10 ficaram na faixa de combustão de petróleo, enquanto o ponto P11 ficou na faixa de combustão de biomassa, madeira e carvão.

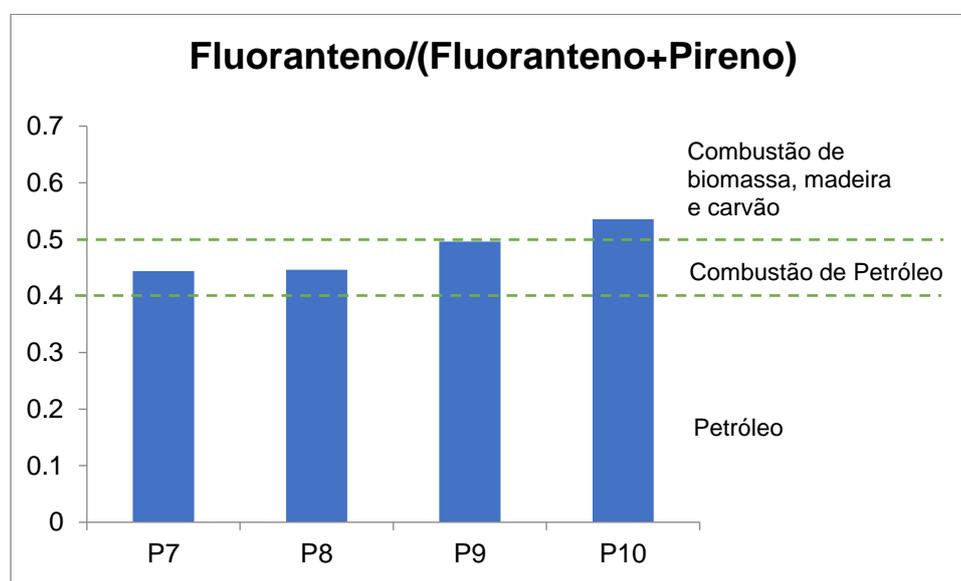


Figura III.4.8. Razão entre concentração de Fluoranteno pela soma das concentrações de Fluoranteno e Pireno como indicador de fonte de HPA.

Uma vez que apenas no ponto P11 foi encontrada maior quantidade de diferentes HPA, os indicadores foram escolhidos de acordo com os compostos presentes nesse ponto. O indicador Fenantreno/Antraceno (**Figura III.4.9-A**) indicou fonte Pirolítica; o indicador Indeno(1,2,3-cd)pireno/Indeno(1,2,3-cd)pireno +Benzo(ghi)perileno (**Figura III.4.9-B**) indicou fonte de combustão de produtos de petróleo apesar de a razão ficar muito próximo a divisa entre combustão de produtos de petróleo e contaminação por petróleo; o indicador Antraceno/Antraceno+Fenantreno (**Figura III.4.9-C**) indicou fonte de combustões; e o indicador Benzo(a)antraceno/Benzo(a)antraceno+Criseno. (**Figura III.4.9-D**) indicou fontes mistas.

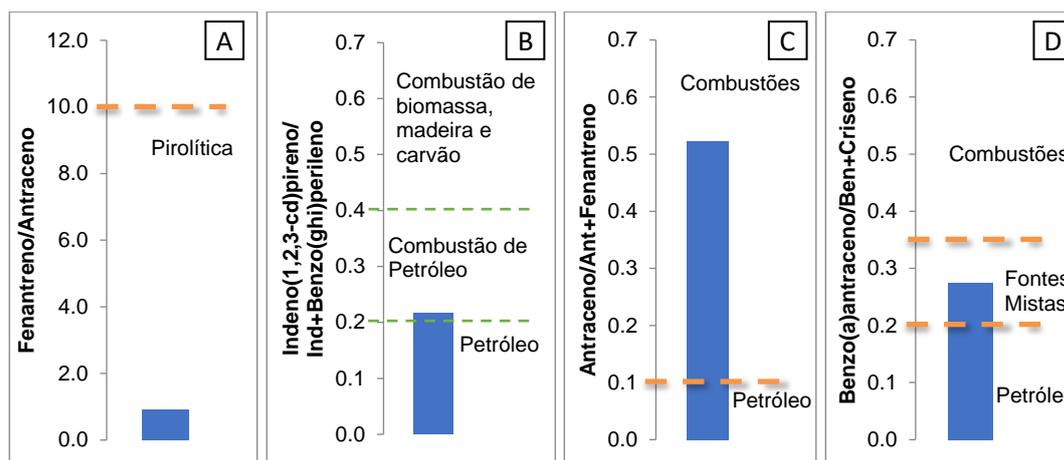


Figura III.4.9. Indicadores de fontes de HPA: **A)** Fenantreno/Antraceno; **B)** Indeno(1,2,3-cd)pireno/Indeno(1,2,3-cd)pireno+benzo(g,h,i)perileno; **C)** Antraceno/Antraceno+Fenantreno; **D)** Benzo(a)antraceno/Benzo(a)antraceno+Criseño.

Portanto pelos indicadores qualitativos, as contaminações de HPA ocorreram por fontes mistas, principalmente pela combustão de produtos de petróleo, seguidos de fontes pirolíticas como a combustão de biomassa, madeira e carvão, e por último por contaminação de petróleo.

Outro fator importante de ser analisado é a distribuição geográfica das concentrações de HPA encontradas; como é possível observar na **Figura III.4.10**. A distribuição de HPA pelas amostras não tem indícios de fontes aleatórias e independentes de cada local, nos pontos mais ao sul P1 a P4 não foram identificados HPA acima do limite de detecção do método de análise. Os pontos P5 e P6 tiveram concentrações próximas de Pireno. Os pontos P7 e P9 tiveram o mesmo HPA dos pontos P5 e P6 (pireno) e acrescido do Fluoranteno, e assim ocorre até chegar ao P11 com maior concentração de HPA. Com exceção do ponto P8 que não teve HPA determinado.

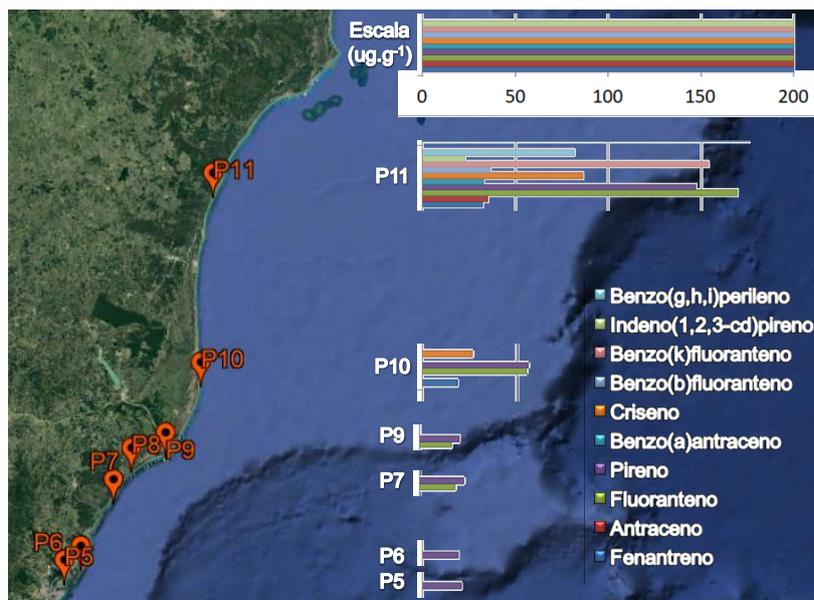


Figura III.4.10. Distribuição geográfica das concentrações de HPA.

Estes resultados fornecem indicativos de uma fonte de HPA na direção Norte, que decai de acordo com a corrente marítima. Essa teoria está de acordo com a corrente marítima do litoral brasileiro, conforme a **Figura III.4.11**. No litoral do Brasil tem uma corrente marítima que começa no nordeste brasileiro e vai até o sul do Brasil.

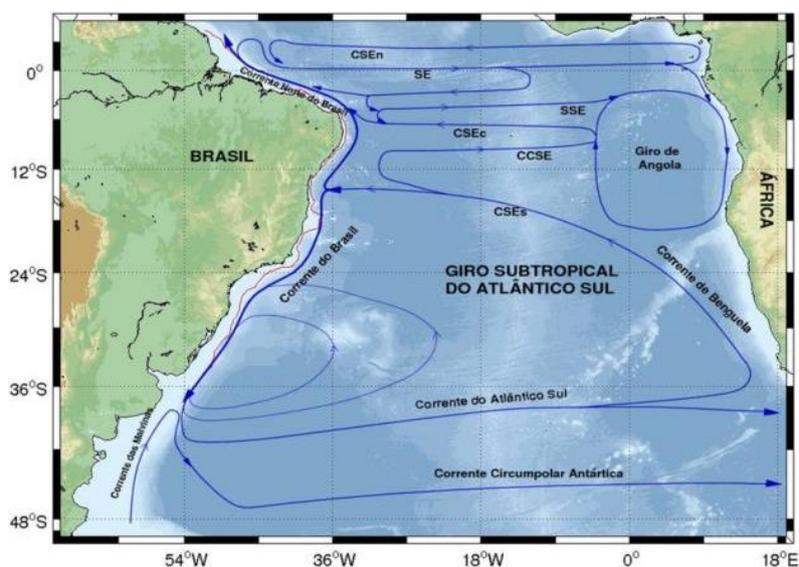


Figura III.4.11. Mapa das correntes marítimas no Atlântico Sul: Corrente Sul Equatorial se divide em quatro ramos e corre da África até o Brasil e, ao chegar ao litoral brasileiro, ocorre uma bifurcação na altura do estado da Paraíba. **Fonte:** BBC News Brasil

A hipótese de que a contaminação tenha sido de fonte biogênica é eliminada, tanto por não ser indicado em nenhum dos indicadores qualitativos, quanto pela literatura relatar o Perileno como indicador

de HPA biogênico, pois pode ser produzido *in situ* através de degradação de precursores biológicos (BAUMARD et al, 1998).

Uma segunda hipótese seria a contaminação gerada por alguma área de exploração de petróleo, ou vazamento de ductos de transporte de petróleo. Para isso é necessário avaliar suas respectivas localizações. Os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo possuem importantes áreas de exploração de petróleo, principalmente com a bacia de Campos, que se estende de Cabo Frio/RJ até Vitória/ES, porém o ponto com maior contaminação não está nessa região. E considerando o sentido da maré do norte para o sul, elimina a possibilidade que essa contaminação tenha originado dessa bacia.

Na região mais ao norte do estado do Espírito Santo, acima da capital Vitória, temos o Terminal Norte Capixaba, localizado na Área Rural de Campo Grande Distrito de Barra Nova, São Mateus/ES e o ponto P11 é mais ao norte, diminuindo as chances de que a contaminação seja desse ponto. Além disso, uma contaminação dessa fonte, originaria mais HPA de baixa massa molecular, menos indícios de fontes mistas e pirolíticas.

Outra hipótese seria correlacionar com o derramamento de petróleo que ocorreu em 2019, que começou no litoral do nordeste brasileiro e se estendeu até o Rio de Janeiro; e de fato no presente trabalho, as maiores concentrações estão na direção norte do estado do Espírito Santo. LIU et al, 2016 em seus estudos mostraram que o intemperismo e o ambiente deposicional de contaminação de HPA determinam sua composição e concentração no meio ambiente; além de mostrarem que após 1 ano de derramamento de óleo em *Deepwater Horizon* no Golfo do México, o óleo depositado em sedimentos sofreu apenas degradação leve a moderada. O ponto P11 recebeu contaminação deste acidente, o que pode aumentar a probabilidade que os valores obtidos para os HPA sejam provenientes desta contaminação. No caso do derramamento de 2019, o volume de petróleo foi menor e o tempo de amostragem foi mais distante da data de contaminação, o que poderia causar intemperismo dos HPA de baixa massa molecular, levando os indicadores qualitativos a indicarem fontes mistas e pirolíticas, mesmo que estes tendem a levar em consideração a cinética e estabilidade termodinâmica relativa, por serem indicadores mais gerais e qualitativos.

Esta última hipótese é corroborada pelo estudo de MAGALHÃES et al, 2022 que analisaram 194 organismos do litoral de Pernambuco e encontraram 8,71 a 418 ng.g⁻¹ de HPA totais. Eles encontraram frequentemente em suas amostras, três HPA também encontrados nesse estudo, fenantreno (80% de frequência de ocorrência), fluoranteno (24%) e pireno (43%). Levando em consideração a concentração de HPA em mais de uma área na região do nordeste, eles associaram a presença desses HPA a um único evento agudo e não a uma contaminação crônica. O que indica uma relação com os dados obtidos nesse estudo, pois animais expostos a derramamento tendem a acumular HPA de baixa massa molecular, por não metabolizá-los.

III.4.2.6. Classificação de contaminação por HPA

É possível classificar o nível de contaminação encontrado, utilizando a classificação de BAUMARD (1998). Como mostrado na **Figura III.4.12**, os pontos P10 e P11 apresentam contaminação moderada, enquanto os demais pontos em que tiveram HPA detectados são classificados como contaminação leve.

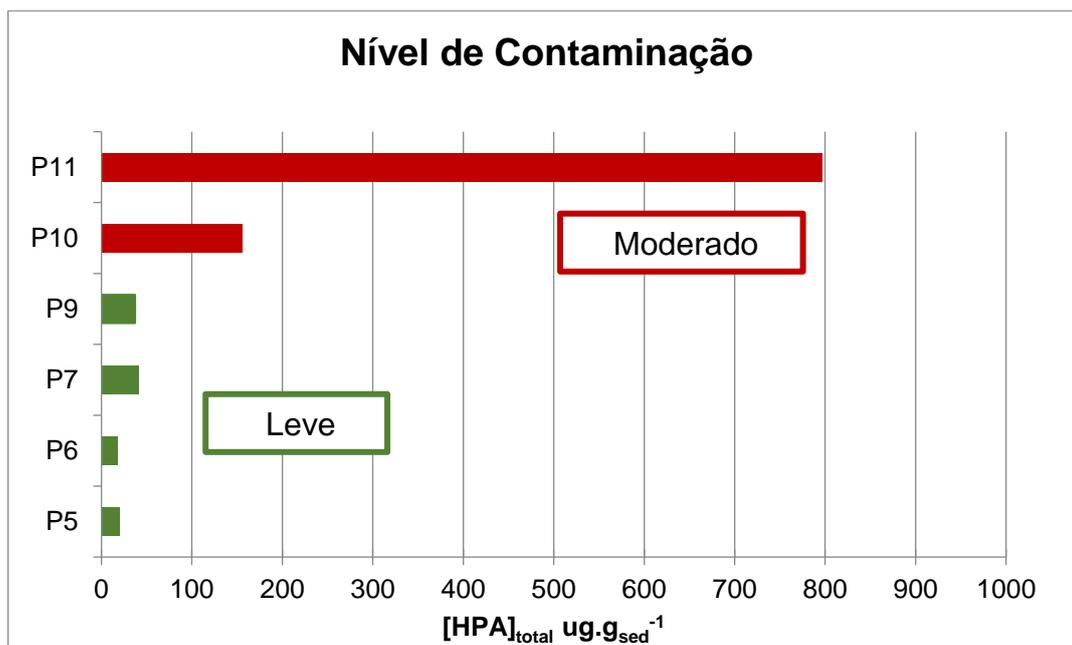


Figura 12. Nível de contaminação das amostras seguindo a classificação de BAUMARD 1998.

Outro parâmetro para avaliar o risco ambiental é através da avaliação de risco da concentração HPA em sedimentos com base no método de risco de Kalf, que leva em consideração valores de referência de Concentração Negligenciável e Concentração Máxima Permitida de cada composto. Na **Figura III.4.13**, temos em escala de cor, os pontos catalogados em risco baixo, moderado e alto. Observa-se que a maioria dos pontos P5 a P9 tiveram risco baixo, com exceção da concentração de Pireno, com risco moderado. O ponto P10 com risco moderado para quatro compostos, e o ponto P11 com risco moderado em nove dos compostos analisados e o Pireno representando alto risco.

	Risco Baixo	Risco Moderado	Risco Alto
Fenantreno	Green	Green	Green
Antraceno	Green	Green	Green
Fluoranteno	Green	Green	Green
Pireno	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Benzo(a)antraceno	Green	Green	Green
Criseno	Green	Green	Green
Benzo(b)fluoranteno	Green	Green	Green
Benzo(k)fluoranteno	Green	Green	Green
Indeno(1,2,3-cd)pireno	Green	Green	Green
Benzo(g,h,i)perileno	Green	Green	Green
	P5	P6	P7
	P9	P10	P11

Figura III.4.13. Avaliação de risco da concentração PAH em sedimentos com base no método de risco de Kalf.

Ainda é possível avaliar quanto ao teste de toxicidade biológica, que leva em consideração o intervalo de baixo e médio efeito através do método do Quociente ERM, que classifica a toxicidade em categorias de porcentagem de incidência de causar efeitos biológicos adversos nas espécies marinhas locais. De acordo com esse teste, os pontos P5 a P9 estão na categoria 1, com 9% de incidência de respostas altamente tóxicas; enquanto os pontos P10 e P11, estão na categoria 2, com 21% de incidência de respostas altamente tóxicas (**Figura III.4.14**).

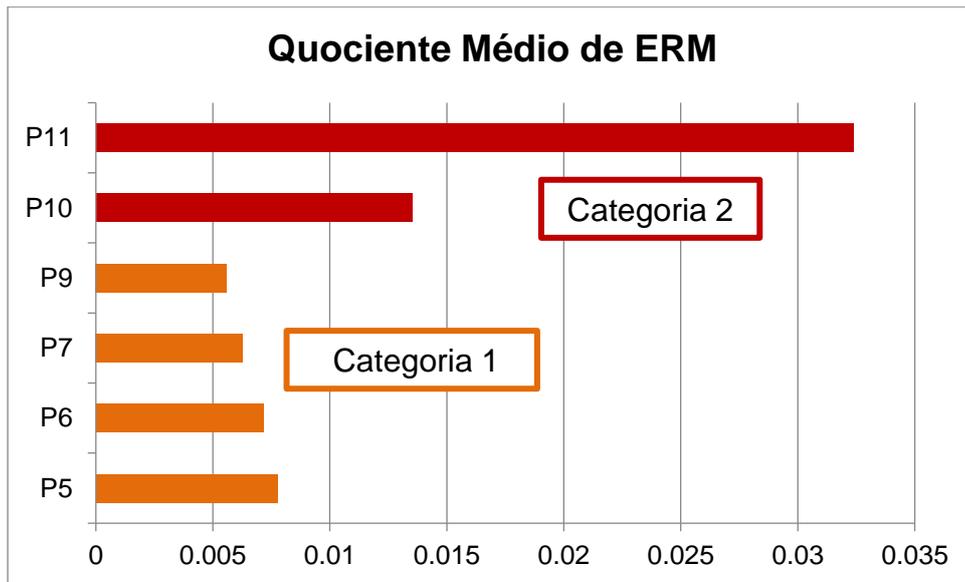


Figura III.4.1. Teste de toxicidade biológica de acordo com o quociente médio de ERM.

III.4.2.7. Identificando um congênere indicador

Métodos estatísticos de análise têm sido empregados no estudo de poluição ambiental (LIU et al, 2015) e dessa forma é possível investigar as correlações entre HPA individuais e Totais, a fim de encontrar uma substância que seja congênere e que indique a previsão de poluição de uma classe de substância. (QIAN et al, 2016). A equação de regressão geral é mostrada na **Equação III.4.1**.

$$\Sigma\text{HPA} = a.\text{Concentração do Homólogo} + b \quad \text{Equação III.4.1}$$

Como o pireno estava presente na maioria das amostras, foi realizado um Teste de Regressão linear, a fim de avaliar sua correlação com a concentração de HPA totais, a plotagem da curva de regressão linear, está apresentada na **Figura III.4.15**.

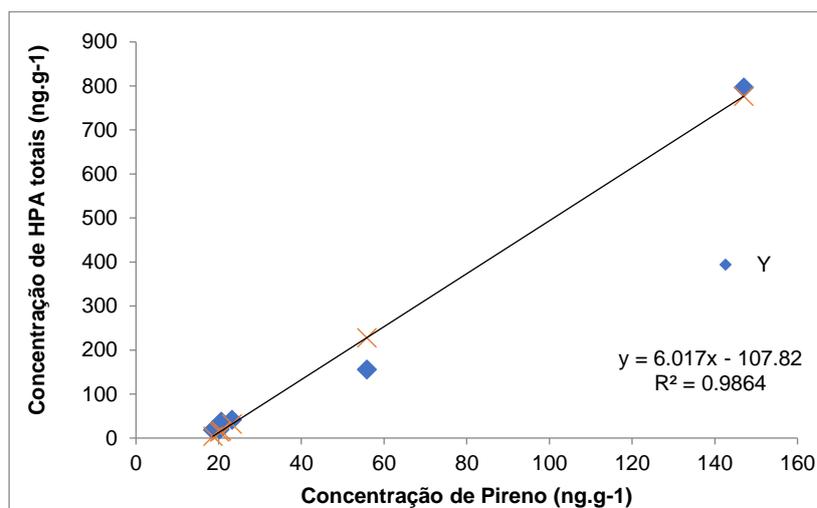


Figura III.4.15. Curva de regressão linear para o pireno em relação a concentração total de HPA.

O coeficiente de determinação (R^2) determinado foi de 98,64%, sendo considerado de alto valor, o que permite mostrar a representatividade da variável para explicar este comportamento. Para avaliar de forma mais ampla, foram realizados o teste de variância e teste F, conforme a **Tabela III.4.9**.

Tabela III.4.9. Análise de Variância e Teste F

Teste F	gl	SQ	MQ	F
Regressão	1	558589,5	558589,5374	33,3
Resíduo	4	67088,1	16772,01487	

É possível observar que tem apenas um grau de liberdade, já que apenas um parâmetro foi associado com uma variável independente. O F calculado foi de 33,3 sendo maior que o F tabelado (7,146), o que traz evidências da existência de uma relação linear, entre a concentração de Pireno e a concentração de HPA totais no meio.

Para maiores evidências é necessário realizar o cálculo de Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), que é um método de análise multivariada, que propõe provar similaridade e diferenças entre conjuntos de dados (LIU et al, 2015)

III.5. Referências:

- Baumard, Pascale; Budzinski, Helene; Garrigues, Philippe. Environmental Chemistry POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SEDIMENTS AND MUSSELS OF THE. **Environmental Toxicology**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 765–776, 1998.
- Boitsov, S., Newman, B.K.; Muiambo, H.F.; Chauque, E.F.C.; Serigstad, B.; Malauene, B.S. Distribution and possible sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals in marine surface sediments off northern Mozambique. *Marine Pollution Bulletin*, v. 163, 111952, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111952>
- Chen, C.W. & Chen, C.F. 2011. Distribution, origin, and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, 63: 417–423.
- Culotta, L., Stefano, C.D., Gianguzza, A., Mannino, M.R., Orecchio, S. 2006. The PAH composition of surface sediments from Stagnone coastal lagoon, Marsala (Italy). *Marine Chemistry*, 99: 117–127.
- Deng, W., Li, X.G., Li, S.Y., Ma, Y.Y., Zhang, D.H. 2013. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment of mud areas in the East China Sea using diagnostic ratios and factor analysis. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2): 266–273.
- Garrison, T. **Fundamentos de Oceanografia**. 4ª ed. [s.l.] 2016.
- Guo, G.H., Wu, F.C., He, H.P., Zhang, R.Q., Li, H.X., Feng, C.L. 2012. Distribution characteristics and ecological risk assessment of PAHs in surface waters of China. *Science China Earth Sciences*, 55(6): 914–925.
- Guzzella L., Roscioli C., Viganò L., Saha M., Sarkar S.K., Bhattacharya A. 2005. Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. *Environmental International*, 31: 523–534.
- Hassan, Hassan Mustafa; Castillo, Azenith B.; Yigiterhan, Oguz; Elobaid, Elnaiem Ali; Al-Obaidly, Abdulrahman; Al-Ansari, Ebrahim; Obbard, Jeffrey Philip. Baseline concentrations and distributions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in surface sediments from the Qatar marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 126, n. November 2017, p. 58–62, 2018. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.093.
- Li, X., Hou, L., Li, Y., Liu, M., Lin, X., Cheng, L. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon in intertidal sediments of China coastal zones: concentration, ecological risk, source, and their relationship. *Science of the Total Environment*, 566–567: 1387–1397.
- Liu, Guorui; CAI, Zongwei; Zheng, Minghui; Jiang, Xiaoxu; NIE, Zhiqiang; Wang, Mei. Identification of indicator congeners and evaluation of emission pattern of polychlorinated naphthalenes in industrial stack gas emissions by statistical analyses. **Chemosphere**, [S. l.], v. 118, n. 1, p. 194–200, 2015. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.041>.
- Liu, Zhanfei; Liu, Jiqing; Gardner, Wayne S.; Shank, G. Christopher; OSTROM, Nathaniel E. The impact of Deepwater Horizon oil spill on petroleum hydrocarbons in surface waters of the northern Gulf of Mexico. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, [S. l.], v. 129, p. 292–300, 2016. DOI: 10.1016/j.dsr2.2014.01.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2014.01.013>.
- Magalhães, Karine Matos; Carreira, Renato Silva; Rosa Filho, José Souto; Rocha, Pedro Palmeira; Santana, Francisco Marcante; YOGUI, Gilvan Takeshi. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fishery resources affected by the 2019 oil spill in Brazil: Short-term environmental health and seafood safety. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 175, n. January, 2022. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113334.
- Okogbue, C. O.; Oyesanya, O. U.; Anyiam, O. A.; Omonona, V. O. Assessment of pollution from produced water discharges in seawater and sediments in offshore, Niger Delta. **Environmental Earth Sciences**, [S. l.], v. 76, n. 10, 2017. DOI: 10.1007/s12665-017-6682-x.
- Soliman, Y.S., Ansari, E.M.S.A., Wade, T.L. 2014. Concentration, composition and sources of PAHs in the coastal sediments of the exclusive economic zone (EEZ) of Qatar, Arabian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 85: 542–548.
- Yang, Wei; Zhang, Huashuang; Lang, Yin Hai; LI, Zhengyan. Pollution status of PAHs in surface sediments from different marginal seas along China Mainland: A quantitative evaluation on a national scale. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 263, p. 114431, 2020. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114431. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114431>.

IV. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO PROVENIENTES DO DERRAMAMENTO OCORRIDO EM 2019.

Esta atividade visou o desenvolvimento, otimização e validação de método analítico para determinação de metais em petróleo oriundo de derramamentos. Métodos como o descrito a seguir são necessários para caracterização do petróleo quanto ao seu conteúdo inorgânico e auxiliar na correlação de possíveis contaminações detectadas em água, sedimentos e biota com episódios de derramamento.

IV.1. Materiais e Métodos

Descrição das amostras

As amostras de óleo foram obtidas de rios e estuários próximos às praias do litoral de Pernambuco, também foram obtidas amostras em Fernando de Noronha, advindas de uma grande mancha de óleo que surgiu na região a posteriori. A identificação das amostras, assim como sua localização de origem estão contidas no **Quadro IV.1** a seguir.

Quadro IV.1. Local e identificação das amostras de óleo

Amostra	Local	identificação
1	Porto de Galinhas	-
2	Itapuama	-
3	Gaibú	Toca do caranguejo 1
4	Gaibú	Toca do caranguejo 2
5	Gaibú	Toca do caranguejo 3
6	Gaibú	DEO 1
7	Gaibú	DEO 2
8	Gaibú	Petro Coral
9	Fernando de Noronha	Mangue (submerso)
10	Fernando de Noronha	Leão 1
11	Fernando de Noronha	Leão 2
12	Fernando de Noronha	Leão 3
13	Fernando de Noronha	Leão 4
14	Fernando de Noronha	Leão 5
15	Fernando de Noronha	Leão 6
16	Fernando de Noronha	Leão 7

Os testes iniciais foram realizados com a amostra 1, por ser a mais densa visualmente e provavelmente a mais difícil de digerir, devido às suas características físicas.

Decomposição das amostras de óleo

Inicialmente foram realizados testes univariados a fim de se identificar as melhores condições. Nestes testes, variou-se a concentração de ácido nítrico (14,34; 11,03; 7,72; 4,41 e 1,1 mol/L) e fixou-se a massa de amostra (0,1 g) e o volume de peróxido de hidrogênio (4 mL) utilizados.

Em seguida, novos testes foram feitos aumentando a massa de amostra (0,2 g), mantendo o volume de peróxido (4 mL) e variando a concentração de ácido nítrico (14,34; 10,75; 7,17 e 3,59 mol/L)

A partir dos resultados obtidos nos testes univariados, foram realizados os testes multivariados com auxílio de um planejamento de experimentos, como mostra a **Tabela IV.1**. As digestões no modelo multivariado, foram realizadas variando a concentração de ácido nítrico, o volume de peróxido de hidrogênio (30 %) e a massa de amostra, mantendo o volume total de 10 mL.

Tabela IV.1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para a digestão de amostras de óleo, com ponto central

Nível	Concentração de HNO ₃ (mol/L)	Volume de H ₂ O ₂ (mL)	Massa de amostra (g)
-	2,34	3	0,05
0	8,34	4	0,10
+	14,34	5	0,15

Considerando os resultados obtidos no primeiro planejamento, foi realizado um novo planejamento fatorial onde aumentou-se a concentração de ácido nítrico e a massa de amostra, mantendo o volume de peróxido de hidrogênio (30 %) e o volume total de 10 mL (**Tabela IV.2**).

Tabela IV.2. Nova matriz do planejamento fatorial 2^3 para a digestão de amostras de óleo, com ponto central, com maior massa de amostra de óleo

Nível	Concentração de HNO ₃ (mol/L)	Volume de H ₂ O ₂ (mL)	Massa de amostra (g)
-	4,34	3	0,1
0	9,34	4	0,2
+	14,34	5	0,3

De posse dos resultados dos testes iniciais, foi realizado um planejamento experimental do tipo composto central, que nada mais é do que um planejamento 2^3 (2 níveis e três fatores) com a inserção de um ponto central. O parâmetro de resposta dos planejamentos foi o teor de carbono dissolvido. O planejamento foi realizado de acordo com a **Tabela IV.3**, com o objetivo de avaliar a influência das três variáveis na decomposição das amostras de óleo: massa de amostra, concentração de ácido nítrico e volume de peróxido de hidrogênio adicionado.

Na digestão, 50 mg das amostras de óleo foram previamente pesadas diretamente em frascos de TFM para a digestão em forno micro-ondas. Aos respectivos tubos, adicionou-se o volume de 5 mL de ácido nítrico nas diferentes concentrações e volumes variáveis de H₂O₂ 30% v/v. Em seguida, as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos e, então, foram levadas ao forno micro-ondas, sendo submetidas ao programa de aquecimento mostrado na **Tabela IV.4**.

Tabela IV.3 - Matriz do planejamento fatorial 2³ para a digestão das amostras, com ponto central.

Fatores	(-)	(0)	(+)
A: Massa de amostra (g)	0,1	0,2	0,3
B: Concentração de HNO ₃ (mol L ⁻¹)	4,34	9,34	14,34
C: Volume de H ₂ O ₂ (mL)	3	4	5

Ensaio	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela IV.4. Rampa de aquecimento do forno de micro-ondas para a digestão das amostras de óleo. Após o resfriamento, o digerido é diluído em 25 ml de água destilada em um tubo de polipropileno. O

Temperatura, °C	Rampa, min	Tempo, min	Pressão, bar	Potência máxima, W
200	20	15	55	1050

branco foi preparado com a mesma mistura ácida e o programa de aquecimento descritos anteriormente.

Medida do tamanho das partículas

Através do método de espalhamento dinâmico da luz - DLS, foram medidos os tamanhos das partículas das amostras 1, 2, 8 e 12. Cada uma delas faz referência a uma região avaliada, para que assim se possa ter um parâmetro do tipo de partícula encontrado em cada região. Primeiramente as amostras passaram por um banho ultrassônico para fins de homogeneização e, em seguida, foram analisadas no equipamento. O equipamento Zetasizer Nano ZS90 (modelo ZEN3690) foi utilizado para a leitura das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de metais por ICP-OES

Após a digestão, os teores de Cd, Cu, Cr, Pb e Zn das amostras de óleo foram diretamente determinados empregando-se ICP OES. Uma solução padrão de 1000 mg.L⁻¹ ítrio (Y) foi utilizada como padrão interno nas determinações. As soluções para a curva de calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque multielementar de 100 mg.L⁻¹ em solução de HNO₃ 5%. A faixa linear da curva de calibração foi de 0,05 a 1,0 mg.L⁻¹ de Cd, Cr, Cu, Pb e Zn e todos os pontos da curva obtiveram uma concentração final de 0,50 mg.L⁻¹ de padrão interno de Ítrio. Abaixo, a **Tabela IV.5** mostra as condições operacionais do equipamento.

Tabela IV.5. Parâmetros operacionais utilizados nas determinações multielementares por ICP OES.

Parâmetros	Especificações
Potência de radiofrequência (kW)	1,3
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,8
Tempo de integração (s)	7
Número de replicatas	3
Nebulizador	Fluxo cruzado
Câmara de nebulização	Scott
Vista de observação do plasma	Axial
Leitura multielementar	Simultânea
Comprimento de onda de detecção (nm)	C - 193,025
	Cd - 228,802
	Cr - 267,716
	Cu - 327,393
	Pb - 220,353
	Zn - 206,200

IV.2. Resultados e Discussão

IV.2.1. Testes iniciais

Os testes iniciais univariados da digestão das amostras com a mistura de HNO₃ e H₂O₂ (4 mL) são mostrados Figura 1. Foi possível perceber que a digestão com 0,1 g de amostra (**Figura IV.1-a**) apresenta soluções mais límpidas do que as digestões com 0,2 g (**Figura IV.1-b**). Além da coloração escura, verifica-se também a formação do material que decantou em cada tubo após certo tempo, comportamento que pode

ser um indício de que as amostras da **Figura IV.1-b**, são digeridas de forma incompleta. Percebe-se também que em concentrações maiores de ácido nítrico a digestão é melhor do que em concentrações menores.

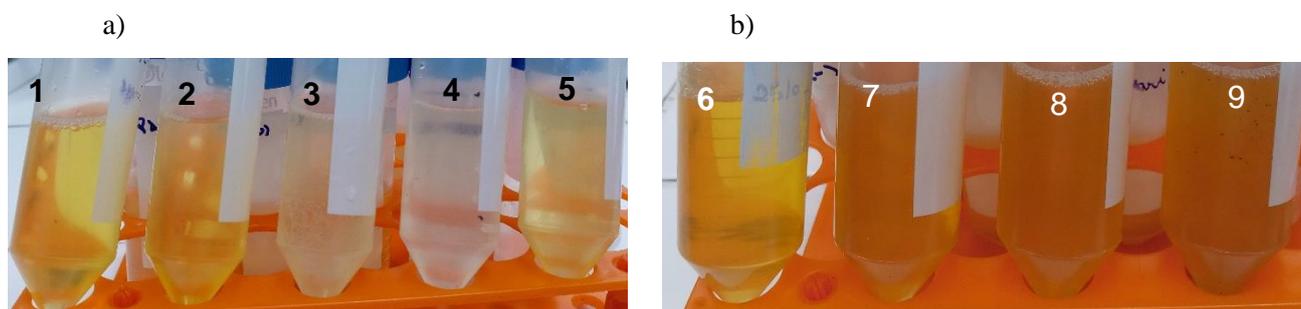


Figura IV.1. Amostras digeridas obtidas nos testes univariados com massa de a) 0,1 g de amostra e concentrações de 14,34; 11,03; 7,72; 4,41 e 1,1 mol/L HNO_3 , respectivamente e b) 0,2 g de amostra e concentrações de 14,34; 10,75; 7,17 e 3,59 mol/L de HNO_3 , respectivamente.

As condições dos testes 4 e 5 (**Figura IV.1-a**) mostram que a amostra praticamente não digeriu. A cor clara aparece porque a baixa concentração do ácido não foi suficiente nem para dar a coloração caramelo forte, como visto nos testes da **Figura IV.1-b** nas amostras do teste 2 que digeriram parcialmente. A partir destes testes, pode-se concluir que a melhor massa de amostra a se trabalhar é de cerca de 0,1 g, e que concentrações maiores de HNO_3 são mais eficientes na digestão.

Os resultados dos testes multivariados variando a massa de amostra e concentração de HNO_3 , são mostrados na **Figura IV.2**.

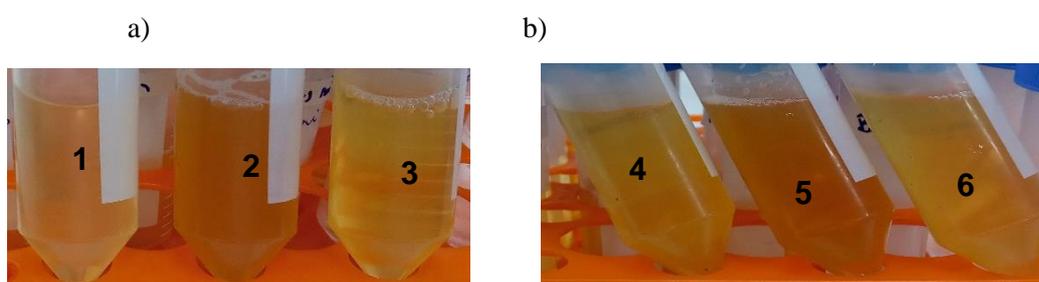


Figura IV.2. Digeridos dos ensaios a partir dos testes multivariados com a amostra 1 do óleo. ensaios 1 a 3) massa de amostra variando de 0,05 g a 0,15 g e HNO_3 variando de 2,34 a 14,34 mol/L; ensaios 4 a 6) massas de 0,1 a 0,3 g e HNO_3 de 4,34 a 14,34 mol/L, volume de H_2O_2 variando de 3 a 5 mL em todos os ensaios.

Os testes com massas de amostras de 0,2 e 0,3 g (**Figura IV.2-b**) apresentaram forte coloração, apesar das altas concentrações de ácido. Já nos testes com 0,1 g de amostras, observa-se uma boa digestão nos ensaios 1) e 3) (**Figura IV.2-a**), sendo que a melhor condição foi aquela com a maior concentração de ácido. Então, infere-se que uma menor massa de amostra trará um resultado com melhores digestões.

Por análise visual, observa-se que o digerido 1 da **Figura IV.2-a**, mostrou também bons resultados e, portanto, o menor volume de H₂O₂ foi suficiente para decompor a amostra de óleo. Com as melhores decomposições nas maiores concentrações de ácido nítrico, reafirma-se que esta é a melhor condição de trabalho. Deste modo, a partir dos testes realizados nestas etapas, mantendo o volume de HNO₃ fixo em 5 mL, buscou-se reduzir a massa de amostra e adotou-se as condições para a realização do planejamento de experimentos, conforme mostra a **Tabela IV.6**.

IV.2.2. Planejamento fatorial

A partir dos resultados dos testes iniciais, foi possível ter uma noção dos parâmetros que deveriam ser empregados na decomposição das amostras de óleo. Portanto, foi proposta a matriz do planejamento fatorial 2³, com repetição do ponto central, conforme mostra a **Tabela IV.6**.

Tabela IV.6. Matriz do planejamento fatorial 2³ para a digestão das amostras de óleo, com ponto central.

Fatores	(-)	(0)	(+)
A: Massa de amostra (g)	0,05	0,075	0,1
B: Concentração de HNO ₃ (mol L ⁻¹)	8,34	11,34	14,34
C: Volume de H ₂ O ₂ (mL)	3	4	5
Ensaio	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

As amostras de óleo foram digeridas e os ensaios são mostrados na **Figura IV.3**. Conforme pode ser observado nesta figura, somente os ensaios 5, 7 e 8, apresentarem coloração. O ensaio 5 também resultou em corpo de fundo, indicando a possibilidade de digestão incompleta. Os demais ensaios resultaram em soluções límpidas, com destaque para o ensaio 1 que empregou menor massa (0,05 g), menor concentração de HNO₃ (8,34 mol L⁻¹) e menor volume de H₂O₂ (3 mL) e apresentou aparência semelhante aos demais ensaios.

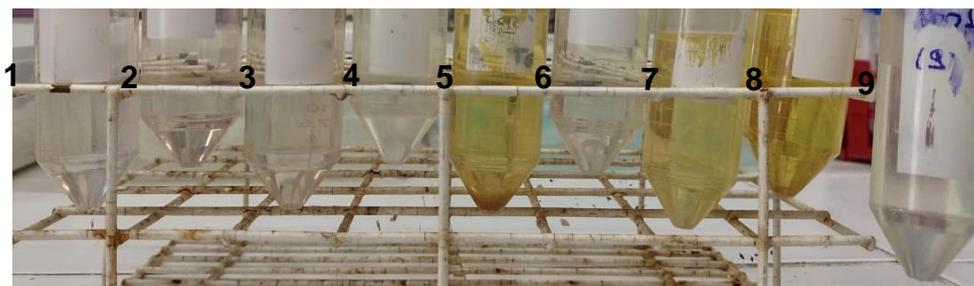


Figura IV.3. Amostras de óleo digeridas a partir dos testes multivariados mostrados na Tabela 6. Ensaios de 1 a 9, com variação da massa de amostra (0,05; 0,075 e 0,10 g), concentração de HNO₃ (8,34, 11,34 e 14,34 mol L⁻¹) e volume de H₂O₂ (3, 4 e 5 mL)

IV.2.3. Carbono orgânico dissolvido e acidez residual

Considerando que o parâmetro de resposta do planejamento foi o teor de carbono orgânico dissolvido, medidas foram realizadas nas amostras digeridas para selecionar o melhor ensaio do planejamento. A curva analítica de carbono apresentou linearidade na faixa de 10 a 4000 mg/L de carbono ($S = 433,15 C - 2670,9$ e $R^2 = 0,9950$, sendo S, sinal e C, concentração, em mg/L).

Os resultados para quatro ensaios do planejamento são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Teor de carbono orgânico dissolvido para os ensaios do planejamento fatorial

Ensaio	Carbono orgânico dissolvido (mg/L)
1	281,4 ± 4,3
2	307,4 ± 0,7
3	161,7 ± 0,5
4	291,8 ± 1,0
6	219,4 ± 1,3
9	405,9 ± 0,4
10	211,2 ± 1,6

Os resultados de carbono indicam que, embora visualmente os ensaios tenham amostras límpidas, os teores de carbono orgânico dissolvido estão elevados. O menor teor foi obtido para o ensaio 3 (0,05 g amostra, 14,34 mol/L HNO₃ e 3 mL H₂O₂) portanto, selecionou-se esta condição para decompor todas as amostras estudadas no trabalho.

IV.2.4. Decomposição das amostras de óleo

As digestões foram realizadas nas amostras de óleo originadas do derrame de petróleo, obtendo-se os digeridos mostrados na **Figura IV.4**.

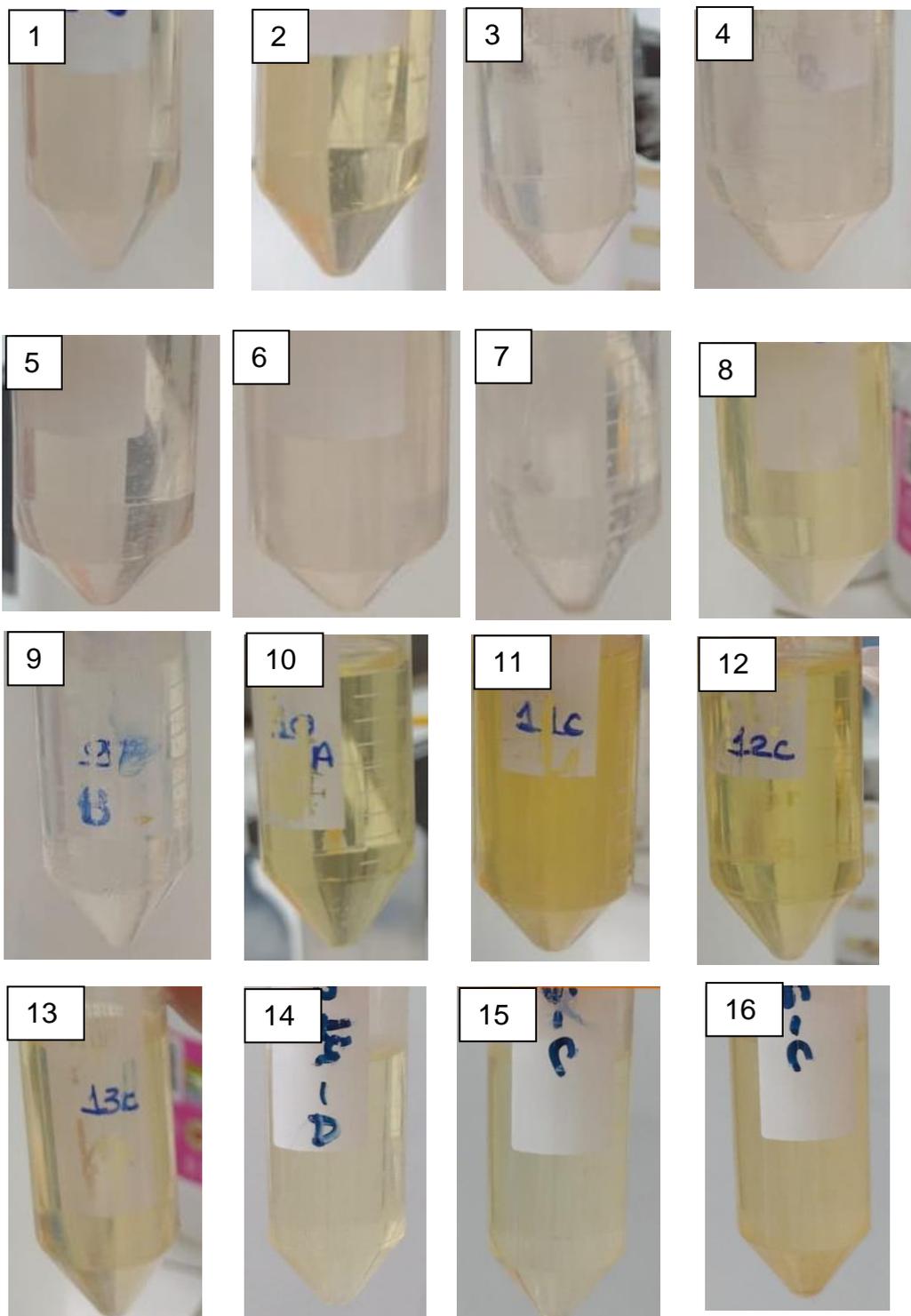


Figura IV.4. Amostras de óleo (1 a 16) digeridas com 5 mL de HNO_3 14,34 mol/L, 3 mL de H_2O_2 (30%) e 0,05 g de amostra.

As amostras decompostas apresentaram variações em sua coloração final após a digestão. Algumas ficaram com a coloração amarelo intenso, caramelo, outras levemente amareladas, enquanto outras ficaram transparentes. A variação de cor se deve provavelmente ao resultado da reação de oxidação dos componentes do óleo com o ácido nítrico, que pode liberar gases como produto dessa oxidação.

A adição do H₂O₂ na digestão é de fundamental importância, pois o mesmo melhora significativamente o resultado de decomposições realizadas. A capacidade de regeneração do HNO₃ em presença de H₂O₂ faz com que as digestões sejam mais eficientes em misturas que contenham os dois, pois o peróxido fornece gás oxigênio para o mesmo se regenerar, o que, juntamente com o gradiente de temperatura, possibilita a ocorrência deste fato.

IV.2.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os resultados para os cálculos de LD e LQ, a equação da curva analítica e os valores de R², obtidos a partir da curva analítica, para os analitos C, Ni, V, Fe, Cu, Co, Cd, Mn, Pb e Zn se encontram na **Tabela IV.10**.

Tabela IV.10. Valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), em mg L⁻¹, e coeficiente de determinação (r²) para os respectivos analitos

Analito	LD	LQ	Equação	R ²
Cd	0,058	0,190	Y = 68667x + 2553,6	0,9997
Co	0,051	0,167	Y = 73707x + 1973,1	0,9997
Cu	0,055	0,183	Y = 317778x + 12263	0,9997
Fe	0,298	0,983	Y = 137877x -24041	0,9909
Mn	0,056	0,184	Y = 1x106x + 48809	0,9997
Ni	0,061	0,203	Y = 51853x +1908,3	0,9996
Pb	0,060	0,199	Y = 6898,9x + 361,43	0,9996
V	-0,634	-2,093	Y = -285,5x + 294,89	0,9960
Zn	0,078	0,258	Y = 12874x + 833,42	0,9994

Os menores valores de LD e LQ foram encontrados para o cobalto e os mais altos para o carbono. Os valores de R² variaram de 0,9909 à 1, indicando a adequação das curvas ao modelo linear.

III.3. Determinação do teor de metais nas amostras por ICP OES

O procedimento de decomposição foi aplicado em amostras reais para determinação do teor de Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn em 16 amostras de óleo usando ICP OES. Os teores de Cd, Co, Cu, Ni e Pb

estavam baixo do limite de detecção (<LD) em todas as amostras. Os resultados são mostrados na **Tabela IV.11**.

Tabela IV.11. Composição mineral das amostras de óleo, em mg/L.

Amostra	Fe	Mn	V	Zn
1	<LD - 0,325	<LD	<LD	<LD
2	1,036 – 1,163	<LD	<LD	<LD
3	8,159 -10,15	<LD – 0,069	3,307 – 4,422	<LD
4	10,58-13,30	0,066 – 0,086	4,157 - 4,773	<LD
5	11,81- 12,63	0,075 - 0,079	4,340 - 4,555	<LD - 0,216
6	14,06-15,09	0,091-0,133	3,837-34,31	<LD
7	10,71 - 12,76	<LD	4,016 – 4,511	<LD
8	0,426 - 0,578	<LD	<LD	<LD
9	1,212 – 1,269	0,077-0,093	5,217-6,160	<LD
10	0,929-1,027	<LD-0,072	7,223-12,51	<LD
11	0,858-2,633	<LD - 0,079	<LD - 8,102	<LD
12	0,465- 7,645	<LD	5,424-5,982	<LD
13	0,394-0,759	<LD	2,205-4,726	<LD
14	0,504-1,370	<LD	19,73-25,54	<LD
15	<LD - 1,262	<LD	11,52-33,52	<LD - 28,14
16	0,632-0,788	<LD	27,19-45,64	<LD

< LD: menor que o limite de detecção

O Zn foi encontrado em apenas duas amostras, de regiões distintas, em Gaibu e Fernando de Noronha. Já o Mn foi encontrado em 7 amostras, a maioria das amostras de Gaibu que foram retiradas da toca do caranguejo, no manguezal e em Fernando de Noronha. O V que é conhecido como um marcador para o óleo, apresentou concentrações variáveis e foi encontrado em todas amostras de Gaibu e de Fernando de Noronha. Por fim, o Fe foi encontrado na maioria das amostras analisadas.

V. Controle e remediação: construção de uma biblioteca multi-espectral de petróleo comercializados ou produzidos no Brasil e desenvolvimento de método de identificação e caracterização de origem.

O INCTAA propôs, como parte de atendimento à demanda emergencial, a elaboração de uma biblioteca multi-espectral de petróleo comercializados ou produzidos no Brasil, como forma de subsidiar ações de reconhecimento de origem de petróleo envolvidos em episódios de derramamento. Para isso, o INCTAA se dispôs a empregar a infraestrutura instrumental analítica disponível em seu laboratório sede e associados para obter informações da composição orgânica e inorgânica das amostras de petróleo.

Esta base de dados, uma vez constituída seria empregada junto a técnicas avançadas quimiométricas exploratórias e de classificação e inteligência artificial visando produzir um método automático rápido e eficaz de identificação de origem de petróleo coletados em locais atingidos por derramamentos. Assim, as autoridades competentes iriam dispor de uma ferramenta importante para caracterizar a origem de derramamentos quando eles ocorrerem.

As técnicas analíticas disponíveis nos laboratórios do INCTAA e que seriam empregadas nesta atividade são: Espectroscopia de Emissão Óptica Induzida por Laser (LIBS - Laser Induced Breakdown Spectroscopy), Espectroscopia Molecular Isotópica por Ablação por Laser (LAMIS - Laser Ablation Molecular Isotopic Spectroscopy), Espectroscopia de Refletância e Transmitância no Infravermelho Próximo (NIRS), Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia Raman, Ressonância Nuclear de prótons de baixo campo e técnicas cromatográficas de separação. O caráter complementar das informações estruturais químicas capazes de serem obtidas com o uso destas técnicas permitem prever uma alta especificidade e sensibilidade na classificação de petróleo e sua origem.

Porém, realização desta ação é totalmente dependente do acesso as amostras de petróleo que, no Brasil, são detidas pela ANP e Petrobras. Em todas as ocasiões em que o grupo de pesquisadores envolvidos no atendimento da demanda emergencial se reuniu o coordenador do INCTAA manifestou esta dependência e fez gestões junto ao CNPq e MCTI para que estes órgãos conseguissem junto à Petrobras e outros possíveis importadores acesso às amostras para possibilitar o desenvolvimento da biblioteca.

Até o momento nenhum dos órgãos se manifestou sobre a demanda do coordenador do INCTAA. Portanto esta ação, embora considerada muito relevante, não pode ser executada até o momento.

O INCTAA, enquanto estiver vigente manterá seu compromisso em relação a esta ação e se dispõe a executá-la, se o acesso as amostras necessárias for conseguido.

VI. Controle e remediação: Desenvolvimento de sensor espectroscópico de baixo custo para uso in situ no monitoramento de hidrocarbonetos.

VI.1. Introdução

O crescimento cada vez mais rápido das atividades industriais, sobretudo da indústria química e dos transportes, tem proporcionado diversos avanços à vida moderna, mas também tem suscitado preocupações em torno dos impactos causados ao meio ambiente, principalmente no que tange à liberação de gases nocivos à atmosfera, como os Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs, do inglês, *Volatile Organic Compounds*), NO₂, NO, CO, CO₂ e SO₂ (THANGAMANI; PASHA, 2021). Dentre esses compostos, os BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno) constituem um grupo de compostos orgânicos voláteis mais produzidos no mundo (CHAUHAN *et al.*, 2014). Suas principais fontes de entrada no meio ambiente são os vazamentos em postos de gasolina, pontos de armazenamento de combustíveis, tráfego rodoviário e também produtos domésticos e agroindustriais, como tintas, solventes, ceras e pesticidas, dentre outros (FAVARD *et al.*, 2019; KURANCHIE *et al.*, 2019). Episódios de derramamento acidental de petróleo durante o processo de extração ou transporte também contribuem para o aporte destas substâncias. Devido à sua presença quase que universal nessas fontes, a exposição crônica aos BTEX por habitantes e trabalhadores torna-se mais fácil (ZHANG *et al.*, 2013).

Os BTEX são altamente tóxicos e de natureza cancerígena, no entanto, seus efeitos adversos à saúde dependem principalmente das concentrações e da duração da exposição (RAFIEE *et al.*, 2022). Alguns estudos têm demonstrado que a exposição a longo prazo aos BTEX pode levar à leucemia, câncer do trato biliar e câncer de pulmão (RAFIEE *et al.*, 2018; SONG *et al.*, 2017; LIMA; JUNIOR; PIMENTEL, 2011). A espécie mais perigosa dos BTEX é o benzeno, que foi classificado como cancerígeno humano do Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) e cancerígeno humano Classe A pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (GARG; GUPTA, 2019; GHAFARI *et al.*, 2021). Efeitos tóxicos diretos sobre os rins e deficiências congênitas estão entre os efeitos não cancerígenos mais importantes da exposição a BTEX (TANEEPANICHSKU *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2011).

Os métodos analíticos convencionais para determinação de BTEX em água geralmente envolvem técnicas cromatográficas e requerem, antes da separação e detecção, etapas de preparo de amostra, incluindo extração, purificação e pré-concentração (HYLTON; MITRA, 2007). Muitos dos métodos comumente empregados para o preparo das amostras e quantificação do BTEX são caros, demorados e frequentemente levam à perda de analitos durante o preparo da amostra (KIM; KIM; LEE, 2012).

Uma alternativa para a análise de BTEX em águas está relacionada ao emprego de sensores ópticos com detecção na região do infravermelho próximo (VALDERRAMA *et al.*, 2020). Lima *et al.* (2011) propuseram um método para a determinação simultânea de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em água, baseado no uso de uma fase sensora de polidimetilsiloxano (PDMS), utilizando a espectroscopia NIR e

ferramentas quimiométricas. Essa técnica se baseia na extração dos analitos da amostra de água pela fase sensora polimérica hidrofóbica, eliminando interferentes presentes na amostra e evitando os problemas decorrentes da absorção da água na região do infravermelho próximo. Silva *et al.* (2018), por sua vez, avaliaram filmes de PVC contendo o estabilizante 2-(2-hidroxi-5-terc-octilfenil)benzotriazol (Tinuvin) e o plastificante di-2-etilhexilftalato (DOP) como fases sensoras para determinação de BTEX com base em medições de transmitância na região MIR.

Outra inovação na análise de BTEX é a aplicação da espectroscopia Raman, uma vez que permite além da medida dos orgânicos na fase sensora de PDMS, também prever as características de partição desta fase (NWANESHIUDU; YU; SCHWARTZ, 2012). Há ainda a possibilidade da análise direta dos orgânicos em água, principalmente devido à baixa resposta da água quando comparado à espectroscopia infravermelho, o que permite a diferenciação dos analitos na amostra (MOREAU; RINNERT, 2015).

Considerando a necessidade da quantificação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em águas, como traçadores de contaminação de águas por petróleo proveniente de derramamentos, descreve-se a seguir os principais resultados obtidos utilizando monólitos de PDMS como fase sensora na determinação desses compostos aromáticos em águas empregando a espectroscopia Raman, em complementação aos trabalhos anteriores, que foram realizados com detecção na região do infravermelho próximo.

VI.2. Experimental

VI.2.1. Reagentes e Soluções

As soluções estoques foram preparadas pela diluição de quantidades adequadas de benzeno, tolueno ou xilenos em álcool metílico P.A. As concentrações das soluções estoques foram de 1000 mg L⁻¹ para todos os compostos. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ diretamente nos frascos de ensaio contendo o monólito de PDMS e a barra magnética. Os volumes dos frascos foram determinados pela diferença entre a massa dos frascos secos contendo a barrinha magnética e a massa de água deionizada que preenche totalmente o frasco. Este procedimento foi adotado para evitar a presença de *headspace*.

VI.2.2. Preparo dos Monólitos de PDMS

A fase sensora de polidimetilsiloxano (PDMS) foi usada na forma de um monólito cilíndrico, os quais foram obtidos cortando-se cordões de PDMS comercial de 3,2 mm de diâmetro adquiridos da empresa Silicoflex. Durante a fase de otimização das condições de análise, foram preparados monólitos de 2,0 mm,

5,0 mm e 10 mm de comprimento. O corte dos monólitos foi feito utilizando-se um suporte de teflon produzido no laboratório o qual permite que diferentes comprimentos do cordão de PDMS sejam previamente selecionados antes do corte (**Figura VI.1**).

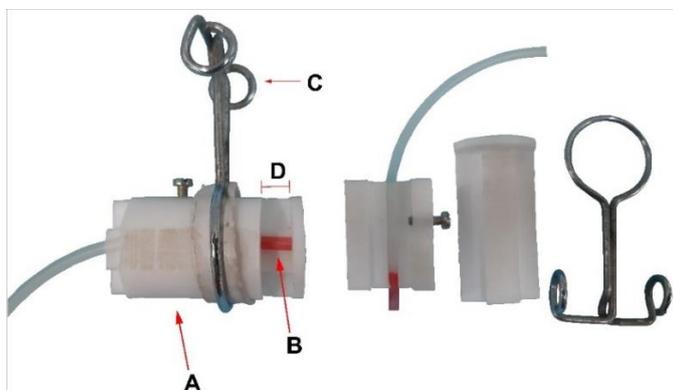


Figura VI.1: A) Suporte utilizado para o corte do cordão de PDMS. B) Cordão de PDMS. C) Mecanismo de trava do suporte após a definição do comprimento selecionado. D) Espaço variável para a introdução do bisturi visando o corte do cordão de PMDS.

VI.2.4. Obtenção dos espectros Raman

Um laser de diodo operando em $784,8 \pm 0,5$ nm, largura de banda de 40 pm e potência ajustável em 0 e 500 mW (Cobolt série 08) foi utilizado para medidas de espalhamento Raman. Durante a obtenção dos espectros Raman foi utilizada, na saída do laser, a potência máxima de emissão, entretanto, apenas cerca de 10% da potência alcançava efetivamente a amostra devido a presença de filtros ASE (do inglês, *Amplified Spontaneous Emission*). O espectrômetro Raman foi desenvolvido em nosso laboratório, sendo mostrado na **Figura VI.2**.

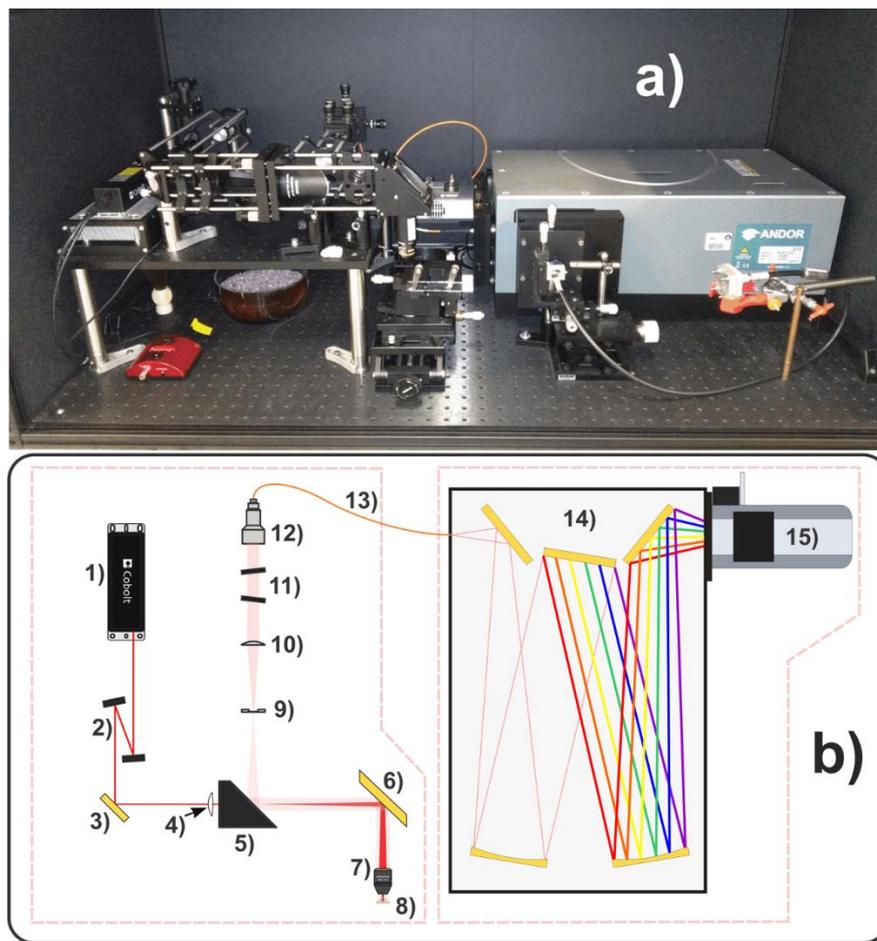


Figura VI.2. a) Imagem do espectrofotômetro Raman montado no laboratório. b) Desenho esquemático do sistema óptico. 1) laser, 2) filtros ASE, 3) espelho dicróico, 4) lente de abertura do *spot*, 5) espelho parabólico de 2" revestimento de prata, 6) espelho de prata, 7) lente da amostra, 8) amostra, 9) fenda de 0,6 mm, 10) lente colimadora, 11) filtros *notch*, 12) lente da fibra óptica e 13) fibra óptica 50 μm , 14) monocromador e 15) câmera CCD.

VI.2.5. Procedimento de extração dos hidrocarbonetos aromáticos da solução e obtenção dos espectros Raman

As determinações experimentais foram realizadas introduzindo a fase sensora em frascos de vidro de aproximadamente 25 mL contendo a solução de trabalho com o hidrocarboneto aromático. Os frascos foram vedados sem deixar espaço confinante (*headspace*) para evitar a transferência do analito da fase líquida para a fase gasosa. As soluções contendo a fase sensora foram agitadas com agitador magnético. Ao final dos ensaios, a fase sensora era retirada da solução, imediatamente seca com papel absorvente e levada para obtenção do espectro. Foram realizados estudos para a otimização do tempo de extração, do comprimento do monólito e da concentração de NaCl.

As misturas foram preparadas a partir de diferentes concentrações de benzeno, tolueno e xilenos. Primeiramente, foram preparadas misturas de benzeno e tolueno, em 3 proporções diferentes de

concentrações para cada composto, como mostrado na **Tabela VI.1**. A soma das concentrações dos hidrocarbonetos nessas misturas foi mantida constante em 100 mg L⁻¹. O branco analítico foi obtido pela imersão do monólito de PDMS em solução aquosa contendo 10% de metanol.

Tabela VI.1. Concentrações das misturas.

Misturas	Benzeno (mg L ⁻¹)	Tolueno (mg L ⁻¹)
Mistura 1	20,0	80,0
Mistura 2	50,0	50,0
Mistura 3	80,0	20,0

As leituras das fases sensoras contendo os hidrocarbonetos sorvidos foram realizadas utilizando 180 segundos de exposição ao laser, com integração a cada 60 segundos. Assim, cada espectro obtido representa uma média de 3 varreduras com tempos de integração de 60 segundos para cada replicata. Os espectros dos compostos BTEX puros foram obtidos com os solventes contidos em uma cubeta de quartzo com tampa, seguindo os mesmos parâmetros de tempo de aquisição para as demais amostras.

Para a obtenção dos espectros, inicialmente o monólito de PDMS foi colocado no suporte mostrado na Figura 3. Posteriormente, a distância do monólito em relação a lente da amostra (**Figura VI.2**) foi ajustada com auxílio de uma mesa de elevação até alcançar o máximo sinal de emissão para a banda de 487 cm⁻¹ referente ao PDMS. Em seguida, o monólito de PDMS foi mergulhado em tolueno puro por um período de 5 segundos. Posteriormente, o monólito foi retirado do tolueno, seco com um papel absorvente posicionado novamente no suporte. Um novo ajuste da mesa foi realizado visando agora obter o maior sinal para a banda de 1002 cm⁻¹ referente ao tolueno.

A repetibilidade do posicionamento da amostra em relação ao foco do laser foi avaliada pela medida de 20 monolitos considerando o sinal máximo da banda de PDMS em 487 cm⁻¹ na altura de máximo sinal do PDMS. A reprodutibilidade com relação a posição da amostra em relação ao foco do laser foi avaliada pela construção de curvas analíticas de calibração em diferentes dias.

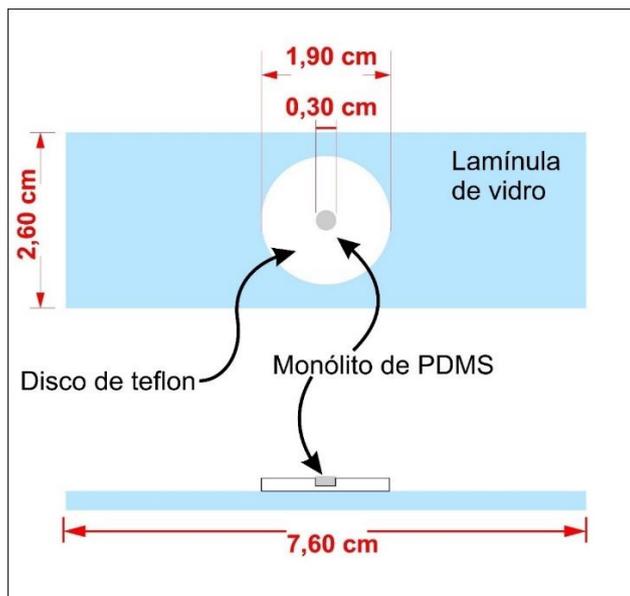


Figura VI.3. Suporte utilizado para a análise dos monólitos. Suas dimensões são de 7,60 cm x 2,60 cm. O disco de teflon no qual é apoiado o PDMS possui 1,90 cm de diâmetro e o monólito apresenta 0,30 cm de diâmetro e 0,20 cm de comprimento.

VI.2.6. Determinação de Benzeno, Tolueno e Xilenos por Raman portátil

Os experimentos empregando um Raman portátil foram realizados no Departamento de Engenharia Química, da UFPE (Recife, PE), sob supervisão da Profa. M. Fernanda Pimentel. Os resultados obtidos empregando espectrômetro Raman de bancada foram comparados com os resultados obtidos com um Raman portátil da Metrohm, modelo Mira DS Advanced. Testes de otimização para extração e coleta dos espectros foram realizados e as curvas analíticas para os aromáticos (benzeno, tolueno e xilenos) foram construídas. Um modelo PLS empregando planejamento experimental do tipo Composto Central de Face Centrada (CFCCD) foi construído a partir de amostras de água do mar e soluções de NaCl 2,0 mol L⁻¹ contaminadas com diferentes concentrações de aromáticos. As amostras de água do mar tiveram sua concentração de NaCl corrigida para 2,0 mol L⁻¹, considerando uma concentração inicial de 0,6 mol L⁻¹, por meio da adição de NaCl nas amostras.

As concentrações de aromáticos utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 2. Algumas misturas preparadas em água do mar foram inseridas na calibração para corrigir desvios decorrentes de erros sistemáticos e melhorar os parâmetros dos modelos PLS.

Tabela VI.2. Concentrações de aromáticos (mg L⁻¹) usadas na construção do modelo PLS.

Calibração			Previsão		
Benzeno	Tolueno	Xilenos	Benzeno	Tolueno	Xilenos
10	15	20	20	30	40
50	15	20	35	45	20
10	45	20	30	25	40
50	45	20	50	15	25
10	15	60	50	25	45
50	15	60	10	20	55
10	45	60	10	30	60
50	45	60	20	40	50
10	30	40	30	35	40
50	30	40	45	25	20
30	15	40	50	15	40
30	45	40	30	25	25
30	30	20	55	30	30
30	30	60	20	45	20
30	30	40	40	30	50
15	15	20	25	25	40
25	45	60	50	20	45
45	30	20	30	25	50
10	20	60	50	35	20
20	40	40	25	45	30
35	30	35			
30	35	50			
55	45	30			
50	30	35			

VI.2.6. Processamento dos dados espectrais

Os pré-processamentos dos dados espectros e a construção de modelos de calibração foram feitos em ambiente MATLAB. O tratamento dos dados consistiu na aplicação de funções para a correção de efeitos provenientes da matriz de PDMS e de desvios instrumentais, como os deslocamentos da linha base e ruídos instrumentais. Os ruídos foram minimizados pela aplicação do filtro Savitzky-Golay com janela de suavização de 15 pontos e polinômio de segunda ordem a todos os espectros.

VI.3. Resultados e discussão

VI.3.1. Identificação Espectral

Os espectros Raman obtidos para os compostos puros estão apresentados na **Figura VI.4**. Os espectros foram obtidos a partir de um tempo de aquisição de 180 segundos e potência do laser de 500 mW.

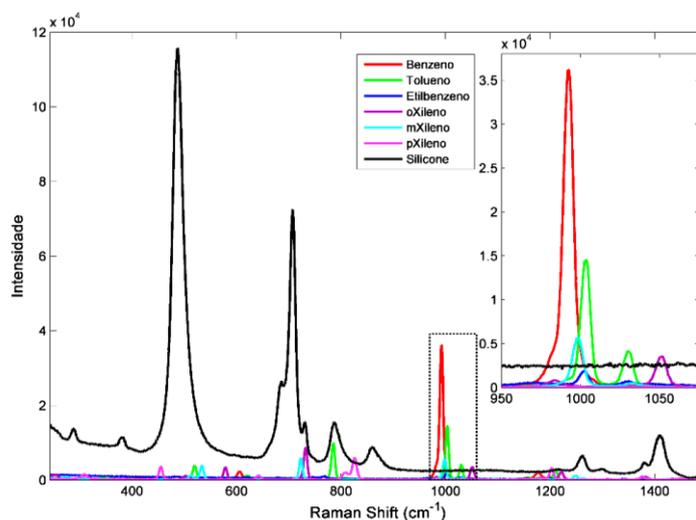


Figura VI.4. Espectros Raman obtidos para a fase de silicone e para os compostos puros.

A partir dos espectros da **Figura VI.4**, nota-se que o p-xileno não é passível de identificação e/ou quantificação no intervalo de deslocamento Raman estudado, especialmente no intervalo correspondente ao espalhamento decorrente do anel aromático em torno de 1000 cm⁻¹. O benzeno apresenta maior sinal de espalhamento quando comparado aos demais compostos, formando uma banda em 991 cm⁻¹, seguido pelo tolueno, com pico em 1002 cm⁻¹ e uma banda fraca em 1029 cm⁻¹. O m-xileno, por fim, apresenta deslocamento Raman em 999 cm⁻¹. Apesar do etilbenzeno apresentar espalhamento em aproximadamente 1002 cm⁻¹, sua análise no monólito de silicone não é possível devido à linha de base do espectro do PDMS apresentar sinal que se sobrepõe ao pico de espalhamento do etilbenzeno.

VI.3.2. Efeito do Tamanho do Monólito de PDMS

O efeito do tamanho do monólito de PDMS foi avaliado pela leitura espectral de monólitos de 2, 5 e 10 mm de comprimento. Os tarugos foram imersos em soluções de tolueno a 150 mg L⁻¹ e agitados por 60 min à temperatura ambiente. Cada ensaio foi realizado em triplicata e os espectros apresentados na **Figura VI.5** são a média dos três espectros para cada tamanho de monólito. Todos os testes foram realizados em soluções salinas de concentração de 2,0 mol L⁻¹ de NaCl.

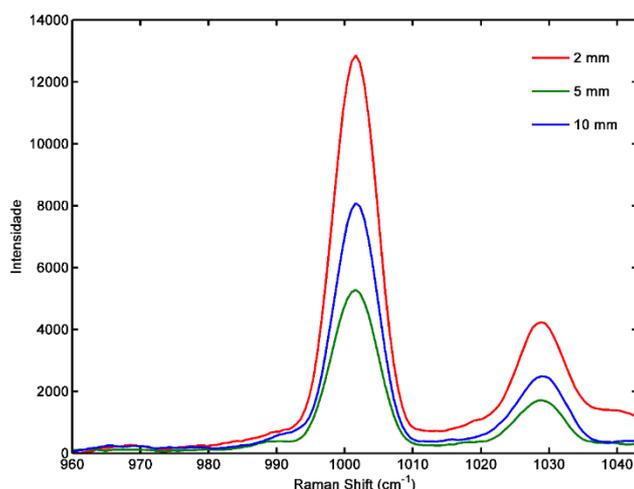


Figura VI.5. Espectros de tolueno a 150 mg L^{-1} em fases de tamanhos diferentes.

Os espectros obtidos foram tratados com primeira derivada para corrigir os efeitos de linha-base. Os valores absolutos de intensidade foram somados e utilizados como medida do sinal. A **Figura VI.6** mostra os espectros derivados, demonstrando que os monólitos de 2 mm foram os que apresentaram maior sinal em 1002 cm^{-1} , referente ao sinal do tolueno.

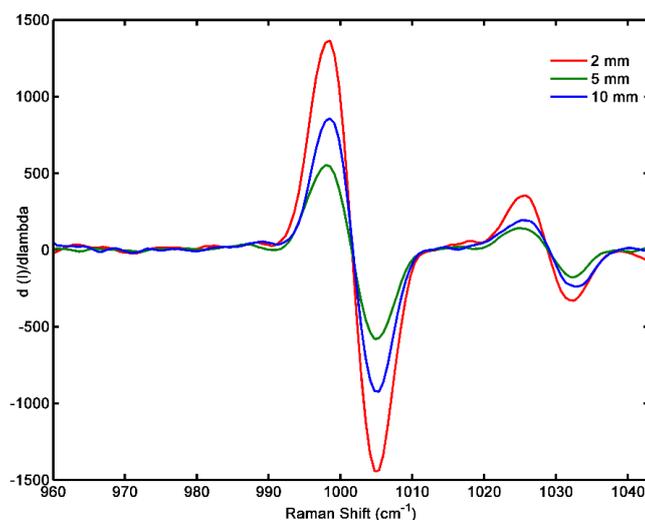


Figura VI.6. Espectros derivados de tolueno para fases sensoras de tamanhos diferentes.

A **Tabela VI.3** mostra os resultados obtidos para esse teste. As médias observadas são as médias das triplicatas obtidas para as intensidades absolutas das bandas (soma das intensidades positiva e negativa) para cada espectro. Pelos dados da Tabela, os valores de intensidade para os monólitos de 5 e 10 mm são menores que aqueles, enquanto para o monólito de 2 mm apresenta intensidade quase duas vezes maior que os demais. É possível que esse efeito seja causado pela saturação do monólito de 2 mm, o que aumenta a concentração do tolueno extraído na superfície do tarugo.

Tabela VI.3. Dados dos espectros derivados de tolueno em fases de diferentes tamanhos.

	2 mm	5 mm	10 mm
Média (Intensidades absolutas)	2808,30	1128,40	1778,20
Desvio Padrão	9,68	22,97	26,66
Desvio Padrão Relativo (%)	0,76	4,39	3,35

VI.3.3. Efeito do Tempo de Extração

O tempo de extração foi também avaliado com base nas leituras espectrais de soluções salinas ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl) de tolueno a 150 mg L^{-1} , todas em triplicata, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos e com monolitos de 2 mm. A **Figura VI.7** mostra os espectros médios obtidos para cada um dos ensaios. Pela análise da Figura é possível verificar que a diferença de sinal entre o tempo de 120 min e 60 min é muito pequena, não representando um ganho de sinal considerável. Portanto, o tempo de 60 minutos foi adotado como o tempo adequado para os testes futuros.

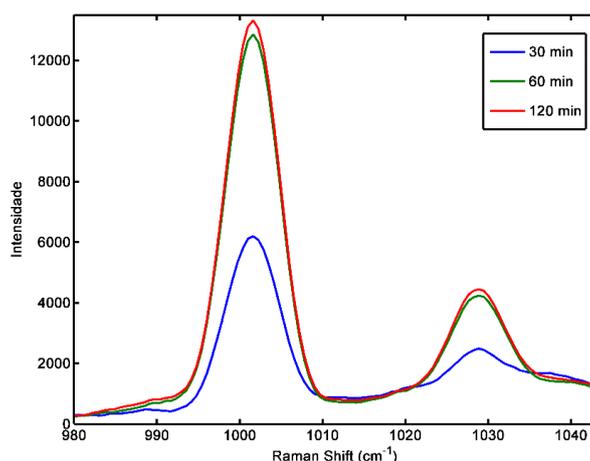


Figura VI.7. Espectros obtidos para o tolueno a 150 mg L^{-1} em três tempos de extração.

VI.3.4. Curvas de Calibração

Curvas de calibração foram preparadas para o benzeno, tolueno, m-xileno e p-xileno. Etilbenzeno e p-xileno não apresentaram resposta de espalhamento Raman na região entre 950 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , região considerada neste estudo para quantificação dos analitos. Todos os testes foram realizados com tempo de extração de 60 minutos, concentração de NaCl de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e os parâmetros de análise do Raman foi com tempo de exposição de 180 segundos e com potência do laser de 500 mW.

A **Figura VI.8** mostra os espectros e a curva analítica para o benzeno, tolueno, o-xileno e m-xileno. Pelos resultados obtidos nota-se que a benzeno apresente maior sensibilidade, denotada pela inclinação da curva obtida (ou coeficiente angular da reta, a), seguido pelo tolueno. Os compostos m-xileno e o-xileno

apresentam menores sensibilidades para a técnica, quando comparados aos dois primeiros. Essa diferença reflete as mudanças de polarizabilidade molecular desses compostos, que se mostra mais intensa no benzeno, que possui um anel aromático sem ramificação.

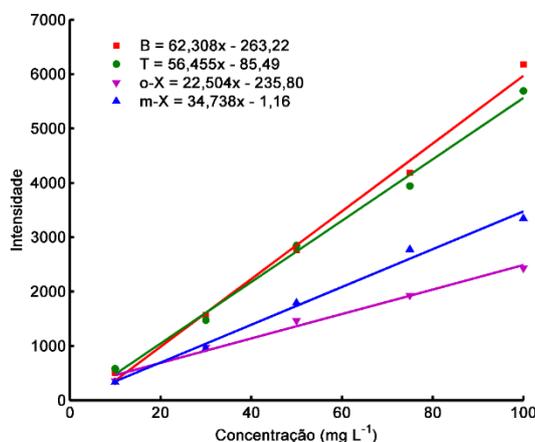


Figura VI.8. Curvas analíticas obtidas em 2,0 mol L⁻¹ de NaCl por 60 min para benzeno, tolueno, o-xileno e m-xileno.

VI.3.5. Análise de misturas de benzeno e tolueno

Com o objetivo de verificar possíveis interferências espectrais entre o benzeno e o tolueno, misturas de concentrações conhecidas desses dois compostos em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ foram. As concentrações dos dois hidrocarbonetos foram definidas de tal maneira que não fosse ultrapassado o total de 100 mg L⁻¹ de aromáticos, evitando-se o risco de saturar a fase sensora. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela VI.4**. Os dados mostram que não foram observadas interferências na determinação de benzeno e tolueno presentes em uma mesma amostra. Neste caso, se apenas estes hidrocarbonetos estiverem presentes, é possível empregar calibração do tipo univariada para cada composto.

Tabela VI.4. Resultados obtidos para as três misturas de benzeno e tolueno. Nesses experimentos as misturas foram preparadas em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹. Tempo de extração de 60 min e medidas realizadas em triplicatas.

Misturas	CM Benz. ± SD (mg L ⁻¹)	CR Benz. (mg L ⁻¹)	Erro Relativo (%) Benz.	CM Tol. ± SD (mg L ⁻¹)	CR Tol. (mg L ⁻¹)	Erro Relativo (%) Tol.
Mistura 1	22,5 ± 1,7	20,0	12,0	76,2 ± 1,7	80,0	-4,8
Mistura 2	49,2 ± 2,4	50,0	-1,5	50,3 ± 3,4	50,0	0,5
Mistura 3	73,0 ± 9,3	80,0	-8,8	20,5 ± 2,4	20,0	2,4

CM = Concentração Medida; CR = Concentração Real; Benz. = Benzeno; Tol. = Tolueno

VI.3.6. Figuras de mérito

A reprodutibilidade do método foi avaliada pela construção de 3 curvas de calibração na faixa de 10 a 100 mg L⁻¹, empregando os monólitos nas condições otimizadas. Duas curvas foram preparadas no mesmo dia, enquanto uma terceira foi preparada em um dia diferente com nova solução estoque. As informações das curvas estão apresentadas na **Tabela VI.5** e as curvas obtidas estão apresentadas na **Figura VI.9**. Obteve-se um CV de 1,4 % associado à inclinação das curvas. Nota-se que as retas são paralelas e que os coeficientes lineares são diferentes, indicando a possibilidade de um erro constante, o qual não foi identificado até este momento.

Tabela VI.5. Dados das curvas analíticas do tolueno obtidas para a reprodutibilidade da técnica. As curvas foram construídas na faixa de 10 a 100 mg L⁻¹ em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ durante 60 min e sob agitação.

Curvas	R ²	Coef. Linear	Coef. Angular
Curva 1 - Dia 1	0,9997	161,3	76,8
Curva 2 - Dia 1	0,9802	558,5	78,5
Curva 3 - Dia 2	0,9934	365,1	76,5
Média			77,3
Desvio Padrão			1,1
CV (%)			1,4

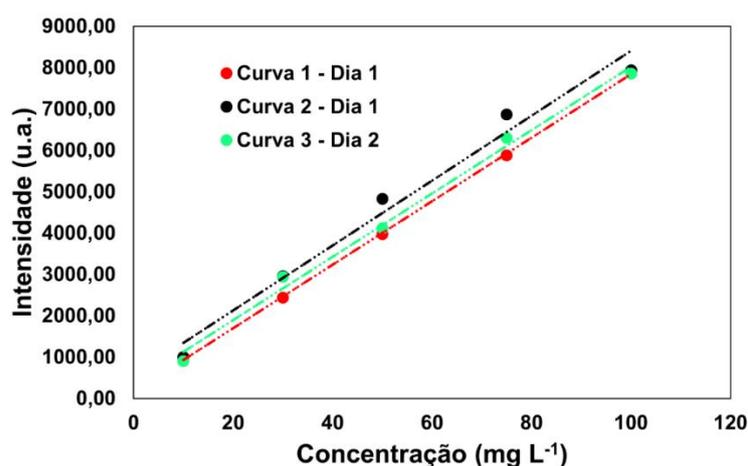


Figura VI.9. Curvas analíticas obtidas em dias diferentes sob condições otimizadas: concentração de NaCl 2,0 mol L⁻¹, tempo de extração de 60 min e sob agitação.

Os resultados obtidos para os Limites de Detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ) estão apresentados na **Tabela VI.6**. Os LODs obtidos neste trabalho são menores que aqueles reportados por

outros autores que empregaram espectroscopia Raman para análise desses compostos em água, como mostrado na **Tabela VI.7** (WITTKAMP; TILOTTA, 1995; STELLMAN *et al.*, 1998; JAGER; MCCLINTIC; TILOTTA, 2000).

Tabela VI.6. LOQ e LOD para benzeno e tolueno. Parâmetros das curvas analíticas obtidas na faixa de 10 a 100 mg L⁻¹ em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ sob agitação.

	Benzeno	Tolueno
Faixa Linear (mg L ⁻¹)	10-100	10-100
Coefficiente de Correlação (R ²)	0,9982	0,9980
Inclinação da Curva Analítica	85,61	71,85
LOD (mg L ⁻¹)	0,95	1,06
LOQ (mg L ⁻¹)	3,18	3,53

Tabela VI.7. Limites de Detecção e Quantificação para o tolueno encontrados neste trabalho e para estudos relatados na literatura.

	Este Trabalho		Wittkamp; Tilotta (1995)		Stellman <i>et al.</i> (1998)		Jager; Mcclintic; Tilotta (2000)
	Benzeno	Tolueno	Benzeno	Tolueno	Benzeno	Tolueno	BTEem-X totais
LOD (mg L ⁻¹)	0,95	1,06	3,4	2,5	8,9	30,2	2,4 – 2,7
LOQ (mg L ⁻¹)	3,18	3,53	11,3	8,3	29,6	100,6	7,8 - 9,0

VI.3.7. Espectrômetro Raman Portátil

O efeito do tamanho do monólito empregado no espectrômetro Raman portátil foi estudado pela medida da intensidade do sinal do tolueno em dois tamanhos diferentes, em 3,0 mm e em 1,5 mm, após extração do analito em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ por 60 minutos. Os resultados estão apresentados na Figura 10. As melhores medidas foram obtidas quando foi utilizado um tamanho de 1,5 mm. Portanto, todos os experimentos foram realizados em essa medida de monólito.

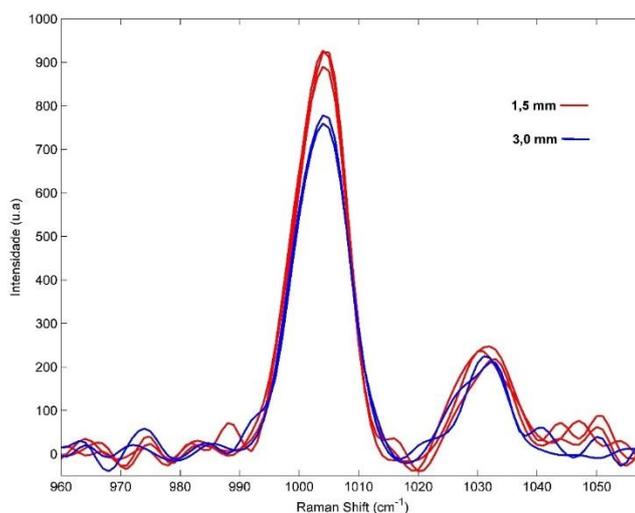


Figura VI.10. Espectros do tolueno obtidos em dois tamanhos diferentes de monólitos de PDMS. Tempo de extração de 60 min, concentração de NaCl de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

O tempo de acumulação e a potência do laser adotados foram os máximos permitidos pelo equipamento (tempo de 160 s e potência de 100 mW). O tempo de extração dos aromáticos foi de 60 minutos para todos os experimentos, conforme otimizado no espectrômetro Raman de bancada. Para este equipamento, foram empregadas soluções com mistura de xilenos em razão da indisponibilidade de soluções de cada um dos isômeros isolados. Foram construídas curvas em solução de NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com as curvas dos mesmos analitos em água do mar, após correção da salinidade. A correção da salinidade ocorreu através da adição de NaCl às amostras até que sua concentração atingisse um valor de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, considerando uma concentração inicial de $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados estão apresentados na **Tabela VI.8** e na **Figura VI.11**.

Tabela VI.8. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os aromáticos em solução de NaCl e em água do mar. Tempo de extração de 60 min. Tamanho do monólito de 1,5 mm.

Parâmetros da Curva	Coef. Angular	Intercepto	R ²
Benzeno – Solução NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$	23,8	-76,9	0,9882
Benzeno – Água do Mar	22,7	-40,9	0,9959
Tolueno – Solução NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$	17,4	-2,1	0,9821
Tolueno – Água do Mar	18,2	-25,8	0,9982
Xilenos – Solução NaCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$	14,7	48,9	0,9731
Xileno – Água do Mar	13,5	12,7	0,9978

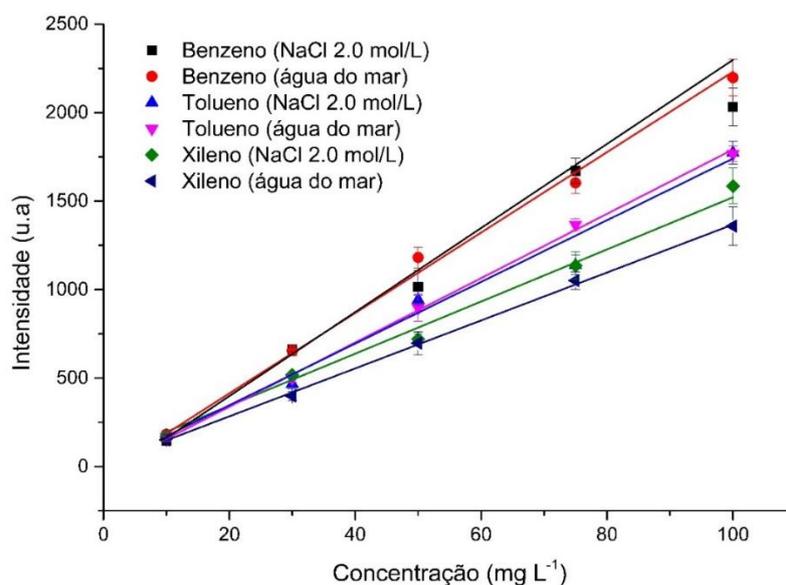


Figura VI.11. Curvas analíticas dos aromáticos preparadas no equipamento Raman portátil. Tempo de extração de 60 min. Tamanho do monólito de 1,5 mm.

Os dados da Tabela 8 mostram que, tal como foi observado no espectrômetro Raman de bancada, no Raman portátil o benzeno apresentou maior sensibilidade, indicado pelo coeficiente angular, seguido pelo tolueno e pela mistura de isômeros de xilenos. Além disso, a diferença entre as curvas preparadas em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹ e em água do mar foram bastante pequenas, indicando que nesse sistema ocorre pouca interferência de matriz.

Análise de Misturas de Benzeno e Tolueno

Com o objetivo de verificar a viabilidade de analisar misturas de benzeno e tolueno em uma mesma amostra, foram preparadas soluções contendo esses dois analitos. Essas misturas foram preparadas em água do mar após correção da concentração de NaCl. As concentrações de benzeno e tolueno empregadas nesse experimento estão descritas na **Tabela VI.9**. As concentrações foram definidas a fim de não ultrapassassem os 100 mg L⁻¹.

Tabela VI.9. Concentrações das misturas

Misturas	Benzeno (mg L ⁻¹)	Tolueno (mg L ⁻¹)
Mistura 1	20,0	80,0
Mistura 2	50,0	50,0
Mistura 3	80,0	20,0

Os espectros das misturas estão apresentados na **Figura VI.12**.

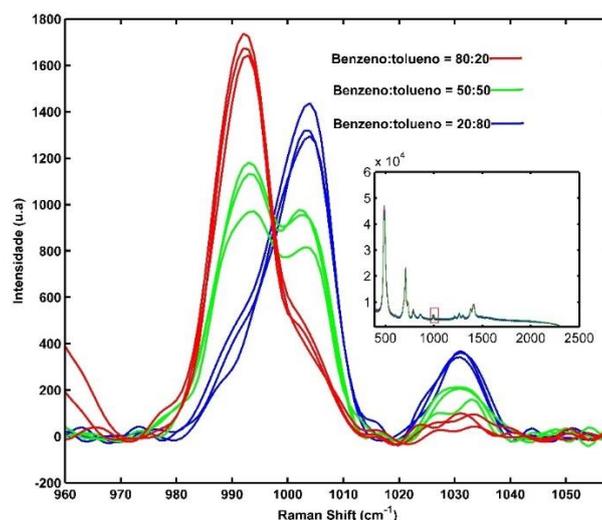


Figura VI.12. Espectros das misturas de benzeno e tolueno. Tempo de extração de 60 min. Tamanho do monólito de 1,5 mm

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela VI.10**. Os valores medidos foram calculados com base nas informações da curva analítica construída em solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹. Os erros obtidos em condições de alta concentração de benzeno e baixa de tolueno podem ser explicados pelas diferenças nas condições de medição das soluções empregadas nas curvas analíticas (NaCl 2,0 mol L⁻¹) e nas amostras das misturas (água do mar), uma vez que os coeficientes angulares das duas curvas podem afetar a exatidão das medidas. Além disso, o benzeno apresenta maior intensidade quando comparado ao tolueno, o que pode resultar em sobreposição espectral e prejudicar sua exatidão.

Tabela VI.10. Resultados obtidos para as três misturas de benzeno e tolueno utilizando as informações das curvas analíticas preparadas com solução de NaCl 2,0 mol L⁻¹. Tempo de extração de 60 min e medidas realizadas em triplicatas

Misturas	CM Benz. ±	CR Benz.	Erro Relativo	CM Tol. ± SD	CR Tol.	Erro Relativo
	SD (mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(%) Benz.	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(%) Tol.
Mistura 1	23,1 ± 3,1	20,0	15,7	77,7 ± 4,4	80,0	-2,9
Mistura 2	50,9 ± 1,6	50,0	1,7	51,5 ± 4,0	50,0	3,0
Mistura 3	73,8 ± 2,2	80,0	-7,7	23,2 ± 2,3	20,0	16,0

CM = Concentração Medida; CR = Concentração Real; Benz. = Benzeno; Tol. = Tolueno

Modelo PLS – Raman Portátil

Os espectros obtidos para as amostras do conjunto de calibração e de previsão estão apresentados na **Figura VI.13**.

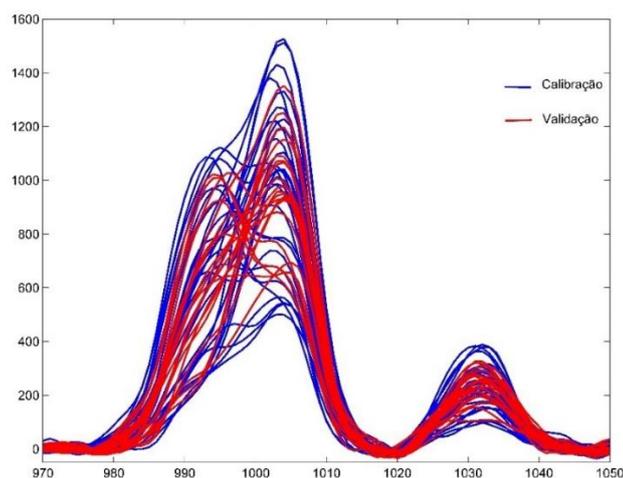


Figura VI.13. Espectros Raman obtidos para os conjuntos de calibração e validação empregados na construção do modelo PLS.

Os resultados obtidos para o modelo PLS preparado no Raman portátil estão resumidos na **Tabela VI.11**. Os parâmetros estatísticos do modelo PLS para o tolueno e xilenos não foram considerados neste estudo, uma vez que, devido à forte interferência espectral que ocorre entre os dois e a baixa resolução do equipamento, optou-se apenas por utilizar os dados da soma desses dois aromáticos, além dos aromáticos totais e do teor de benzeno.

Tabela VI.11. Parâmetros estatísticos do modelo PLS construído para as três variáveis consideradas

Parâmetros do modelo	Benzeno	Tolueno + Xilenos	Aromáticos Totais
Pré-processamento	1ª Derivada (SG 2ª ordem polinomial), janela de 9 pontos; MC	1ª Derivada (SG 2ª ordem polinomial), janela de 17 pontos; MC	1ª Derivada (SG 2ª ordem polinomial), janela de 9 pontos; MC
VL	3	2	3
R ²	0,970	0,931	0,923
RMSEC	2,4636	5,3598	6,5806
RMSECV	3,1191	5,7456	7,6654
RMSEP	2,3034	4,2849	6,5223
Bias Calibração	0	-1,4211.10 ⁻¹⁴	-2,8422.10 ⁻⁴⁴
Bias Previsão	-0,3681	0,076487	-0,047897
CV Bias	0,0187	0,089359	0,34052

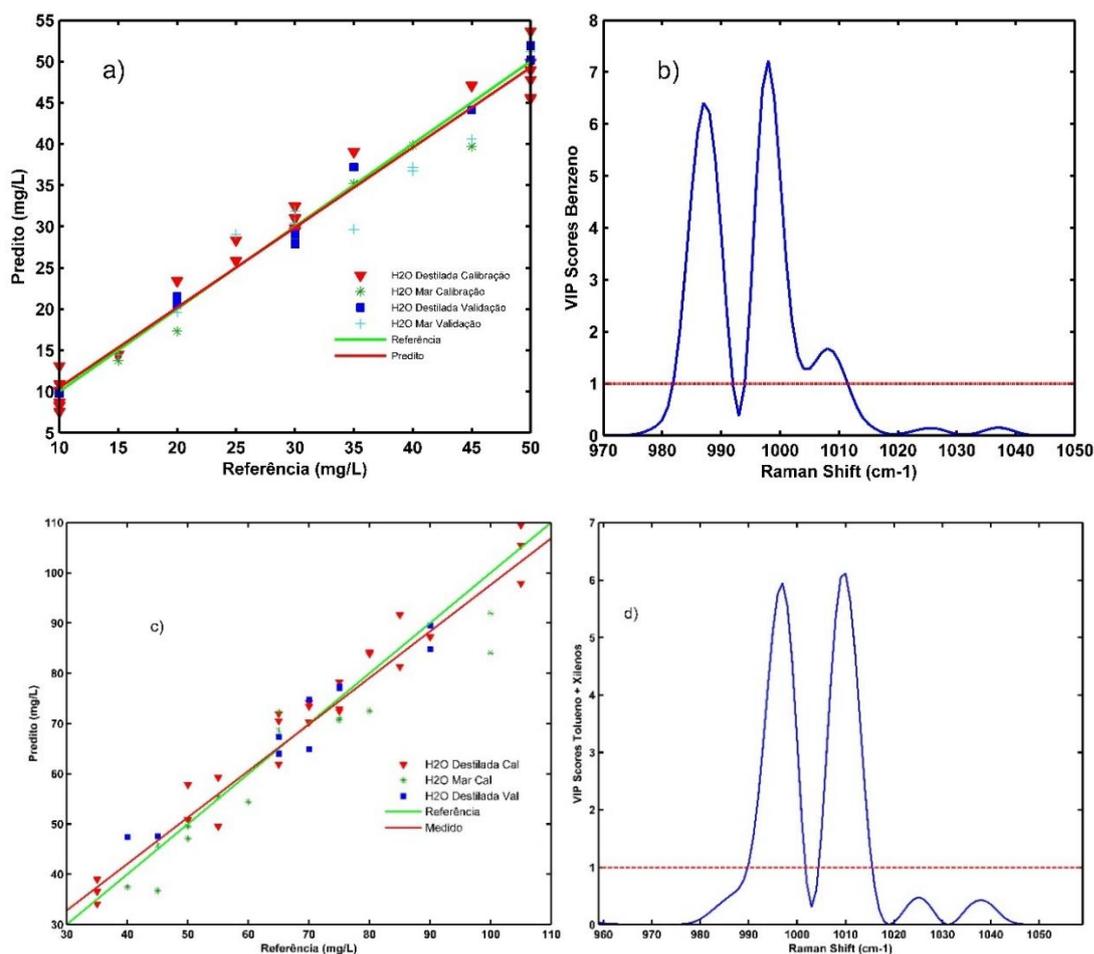
VL = Variáveis Latentes; SG = Savitzky-Golay; MC = Centralização na Média

A **Figura VI.14** mostram os gráficos dos teores de referência *versus* teores preditos para as concentrações de benzeno (Fig. 14. a), total de tolueno e xilenos (Fig. 14. c) e aromáticos totais (Fig. 14. e).

Todas as amostras tiveram os espectros obtidos em triplicata e apenas o espectro médio foi utilizado no modelo. Algumas amostras do conjunto de calibração precisaram ser substituídas por outra amostra do conjunto de validação externa, de acordo com o gráfico T^2 de Hotelling vs Q residual. Todas as amostras de calibração e previsão empregadas neste trabalho são distribuídas ao longo da linha bissetriz.

A Figura 14 (b, d, f) refere-se às variáveis selecionadas pelo algoritmo SIMPLS. Essas variáveis representam as regiões com informações químicas relevantes sobre o composto analisado, como aquelas ao redor de 986 e 996 cm^{-1} , que representam os dois conjuntos que mais provavelmente refletem, dentro da faixa utilizada neste trabalho, as informações relacionadas ao benzeno. Comportamentos semelhantes foram observados para os demais compostos.

Os resultados evidenciam que o modelo PLS construído para o espectrômetro Raman portátil é capaz de prever concentrações de benzeno, tolueno e xilenos totais, além do total de BTX em amostras de água do mar com baixos erros de previsão e com erro sistemático não significativo.



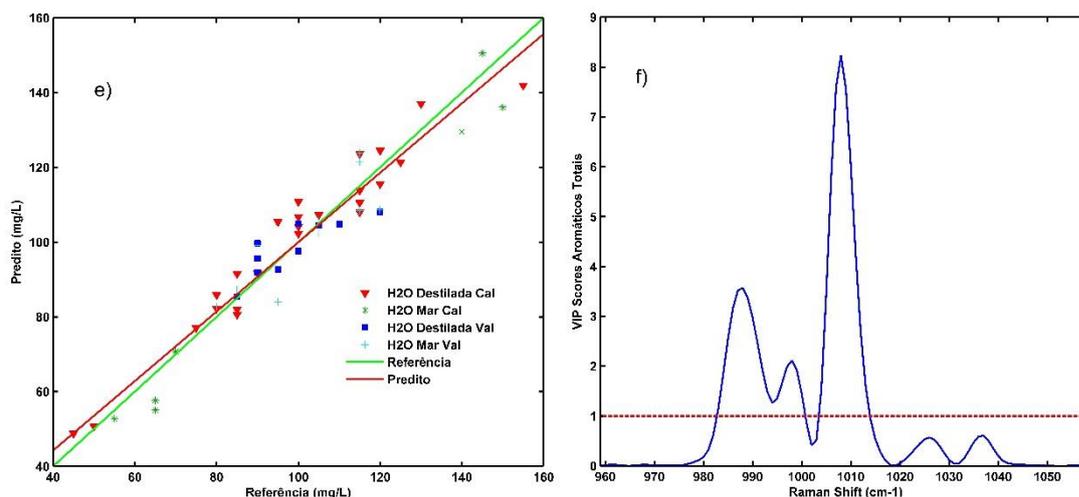


Figura VI. 14. Gráficos de referência vs predito (a, c, e) e VIP scores de variáveis (Variable Importance Projection Scores) (b, d, f) para o conjunto de calibração e validação.

VI.4. Conclusões parciais

Os resultados obtidos até o presente momento demonstram que a técnica utilizada apresenta potencial para ser empregadas na análise de amostras reais com capacidade para detectar quantidades superiores a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de benzeno e de tolueno. Embora esses limites sejam considerados altos e, portanto, insatisfatórios para análises rotineiras de potabilidade, o método pode ser empregado para monitoramento em áreas próximas a derramamentos de petróleo, óleo combustível e gasolina como alternativa para a rápida identificação e quantificação desses contaminantes em água tanto em laboratório quanto *in loco*, com emprego de espectrômetro Raman portátil. Além disso, o modelo multivariado preparado em equipamento portátil permite que sejam analisados simultaneamente benzeno, tolueno e xilenos em água, bem como BTX totais. Para a determinação desses contaminantes empregando espectrômetro Raman de bancada, novos testes serão realizados a fim de comparar os resultados. Testes adicionais com a finalidade de empregar amostras de água contaminadas com gasolina tipo A (sem adição de etanol) e comparar os resultados obtidos em Raman de bancada com um método de referência, como cromatografia gasosa, também serão realizados.

O protocolo de amostragem é muito simples e emprega um sensor em estado sólido de baixo custo constituído de um pequeno disco ou cilindro de silicone. O protocolo foi desenvolvido de forma que as comunidades costeiras poderão se envolver no processo monitoramento *in situ* da água de mar e manguezais de forma a caracterizar de forma abrangente regiões sujeitas a impactos resultantes de derramamentos de óleo.

VI.5. Referências

- Chauhan, Sippy K.; Saini, Neha; Yadav, Vijay Bahadur. Recent trends of volatile organic compounds in ambient air and its health impacts: A review. **International Journal Technology Research Engineering**, v. 1, n. 8, p. 667, 2014.
- Favard, A.; Aguir, K.; Contaret, T.; Dumas, A.; Bendahan, M. Detecção e medição de traços de BTEX no nível ppb usando sensor de gás de óxido de metal. **Materials Today: Proceedings**, v. 6, p. 323-327, 2019.
- Garg, A.; Gupta, N. C. A comprehensive study on spatio-temporal distribution, health risk assessment and ozone formation potential of BTEX emissions in ambient air of Delhi, India. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 1090-1099, 2019.
- Ghaffari, H. R.; Kamari, Z.; Hassanvand, M. S.; Fazlzadeh, M.; Heidari, M. Level of air BTEX in urban, rural and industrial regions of Bandar Abbas, Iran; indoor-outdoor relationships and probabilistic health risk assessment. **Environmental Research**, v. 200, p. 111745, 2021.
- Görgényi, M.; Dewulf, J.; Van Langenhove, H.; Héberger, K. Aqueous salting-out effect of inorganic cations and anions on non-electrolytes. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 802-810, 2006.
- Hylton, K.; Mitra, S. Automated, on-line membrane extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 199-214, 2007.
- Kim, H.; Kim, S.; Lee, S. Use of flat-sheet membrane extraction with a sorbent interface for solvent-free determination of BTEX in water. **Talanta**, v. 97, p. 432-437, 2012.
- Kuranchie, F. A.; Angnunavuri, P. N.; Attiogbe, F.; Nerquaye-Tetteh, E. N. Occupational exposure of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) to pump attendants in Ghana: Implications for policy guidance. **Cogent Environmental Science**, v. 5, n. 1, p. 1603418, 2019.
- Lima, K. M. G.; Junior, I. M. R.; Pimentel, M. F. Simultaneous determination of BTX and total hydrocarbons in water employing near infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 160, n. 1, p. 691-697, 2011.
- Moreau, J.; Rinnert, E. Fast identification and quantification of BTEX coupling by Raman spectrometry and chemometrics. **Analyst**, v. 140, n. 10, p. 3535-3542, 2015.
- Nwaneshiudu, I. C.; Yu, Q.; Schwartz, D. T. Quantitative Solid-Phase Microextraction (SPME)-Raman spectroscopy for the detection of trace organics in water. **Applied spectroscopy**, v. 66, n. 12, p. 1487-1491, 2012.
- Rafiee, A.; Delgado-Saborit, J. M.; Gordi, E.; Quémerais, B.; Moghadam, V. K.; Lu, W.; Hoseini, M. Use of urinary biomarkers to characterize occupational exposure to BTEX in healthcare waste autoclave operators. **Science of the Total Environment**, v. 631, p. 857-865, 2018.
- Rafiee, A.; Delgado-Saborit, J. M.; Sly, P. D.; AmirI, H.; Hoseini, M. Exploring urinary biomarkers to assess oxidative DNA damage resulting from BTEX exposure in street children. **Environmental Research**, v. 203, p. 111725, 2022.
- Silva, M. L.; Castro, R. O.; Sales, A. S.; Araújo, F. V. Marine debris on beaches of Arraial do Cabo, RJ, Brazil: An important coastal tourist destination. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p. 153-158, 2018.
- Song, H. N.; Kim, C. H.; Lee, W. Y.; Cho, S. H. Simultaneous determination of volatile organic compounds with a wide range of polarities in urine by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 31, n. 7, p. 613-622, 2017.
- Taneepanichsku, N.; Loonsamrong, W.; Tungaringkarn, T.; Gelaye, B.; Williams, M. A. Occupational exposure to BTEX compounds among enclosed multi-storey car park workers in central Bangkok area. **Indoor and Built Environment**, v. 27, n. 5, p. 622-629, 2018.
- ThangamanI, J. G.; Pasha, S. K. K. Hydrothermal synthesis of copper (II) oxide-nanoparticles with highly enhanced BTEX gas sensing performance using chemiresistive sensor. **Chemosphere**, v. 277, p. 130237, 2021.

Valderrama, L.; Merib, J.; Marco, P. H.; Valderrama, P.; Carasek, E. Emerging micropollutants determination by NIR spectroscopy using pseudo-univariate calibration and TF-SPME coupled with 96-well plate system. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104789, 2020.

Zhang, F.; Wang, X.; Dong, J.; Qin, N.; Xu, J. Selective BTEX sensor based on a SnO₂/V₂O₅ composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 186, p. 126-131, 2013.

Zhou, J.; You, Y.; Bai, Z.; Hu, Y.; Zhang, J.; Zhang, N. Health risk assessment of personal inhalation exposure to volatile organic compounds in Tianjin, China. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 3, p. 452-459, 2011.

VII. Controle e remediação: Desenvolvimento de método analítico baseado em imagens hiperespectrais no infravermelho próximo (HSI-NIR) para detectar contaminações de óleo em areia de praia

VII.1. Introdução

A detecção da presença de óleo em praias atingidas por episódios de derramamento é realizada facilmente durante a contaminação aguda que ocorre logo após o acidente. Nesta ocasião óleo que atinge as praias é encontrado em grandes placas ou impregna a areia de forma perceptível a olho nu. Porém, após a realização de operações de limpeza ou da sua dispersão pela ação das marés ou mesmo pelo vento que movimentam a areia a identificação de resíduos remanescentes não pode ser mais feita a olho nu. No entanto, estas partículas de óleo ou grãos de areia impregnados por óleo apresentam alta superfície de contato que pode facilitar a transferência e dispersão de espécies orgânicas para o ambiente.

Técnicas de extração e determinação da presença de hidrocarbonetos em areia são trabalhosas e exigem o uso de solventes orgânicos que caracterizam métodos analíticos não-limpos. Os pesquisadores do INCTAA são pioneiros no Brasil no desenvolvimento de métodos analíticos baseados em imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo (HSI-NIR) tendo desenvolvido métodos eficientes para detecção de microplásticos em areias de praia. Desta forma, este conhecimento foi empregado no desenvolvimento de método baseado em HSI-NIR para a detecção de contaminação de petróleo em areia de praia em situações nas quais a inspeção a olho nu não consegue ser bem-sucedida.

VII.2. Parte experimental

VII.2.1. Experimentos preliminares

Os experimentos iniciais foram realizados com uma amostra de petróleo de alto API (baixa densidade) visando verificar o potencial da HSI-NIR na identificação do óleo em areia. Preparou-se uma mistura de areia saturada em petróleo que foi sequencialmente diluída com a mesma areia livre de petróleo. A amostra saturada diluída e algumas amostras contendo menos de 10% de petróleo podem ser observadas na **Figura VII.1**.

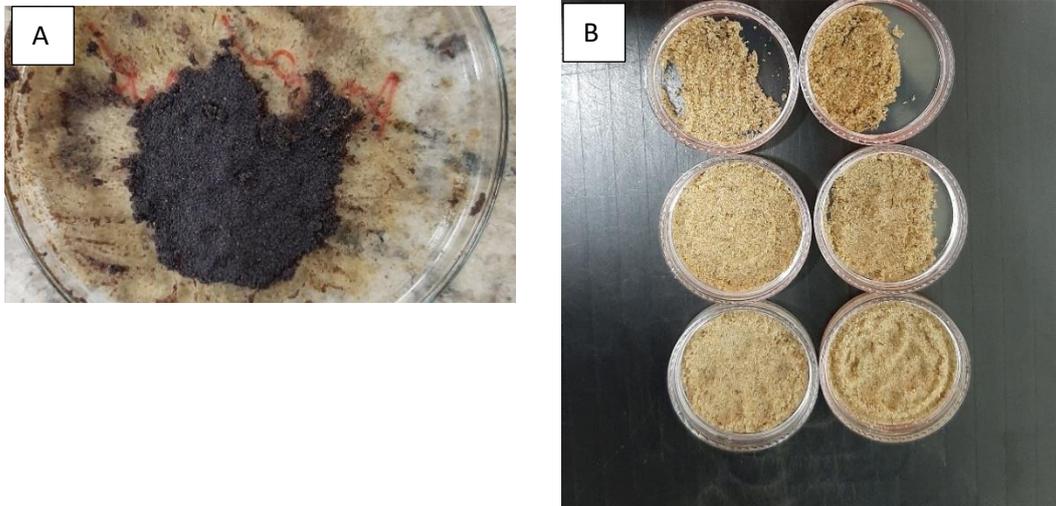


Figura VII.1. A, mistura saturada de areia com petróleo de baixa densidade; B, amostras de areia preparadas por diluição (m/m) contendo cerca de 10% (m/m) de petróleo.

Misturas contendo diferentes proporções areia/petróleo foram dispostas em camadas horizontais em uma placa de teflon e a sua imagem foi obtida empregando as condições abaixo:

Velocidade de varredura

100 linhas de imagem hiperespectral/s (max), correspondente a:

30 mm/s para pixel de 300 x 300 μm - 60 mm/s para pixel de 600 x 600 μm

Velocidade de varredura

7 s para capturar uma imagem com 320x320 pixels em 256 bandas espectrais

Faixa espectral (NIR)

1000 - 2500 nm

A **Figura VII.2** mostra a câmera hiperespectral (Specim – Finlândia) empregada neste estudo e a **Figura VII.3** mostra o procedimento de obtenção da imagem hiperespectral NIR da placa de teflon contendo as misturas areia-petróleo.



Figura VII.2. Câmera hiperspectral empregada neste estudo.

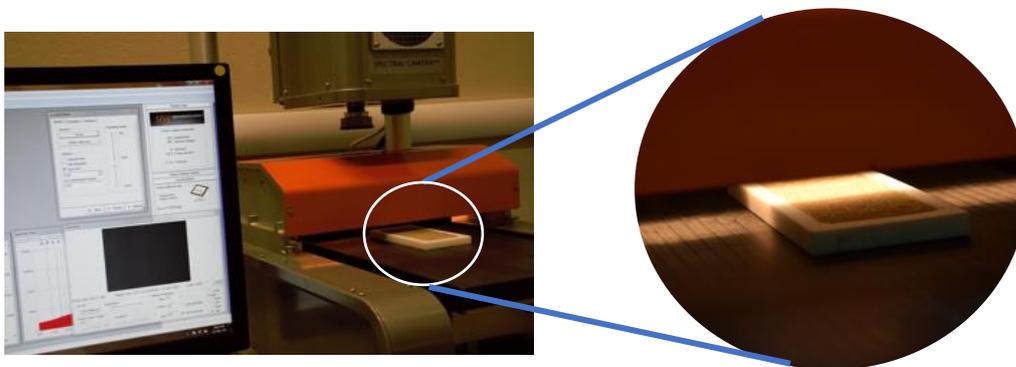


Figura VII.3. Processo de obtenção da imagem da areia contaminada em diferentes proporções com petróleo empregando a câmera hiperspectral NIR.

VII.2.2. Experimentos com amostras reais do derramamento de 2019

Duas amostras de óleo provenientes do derramamento de 2019 foram coletadas no ano de 2021 em aterros próximos ao mar contendo o material recolhido das praias do Paiva e do Xeréu situadas em Pernambuco e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Jandyson Machado Santos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A localização exata do local da coleta é $8^{\circ}17'53.5''S$ $34^{\circ}57'10.6''W$.

Procedeu-se a diluição das amostras de derramamento de forma a preparar a placa de teflon com faixas contendo teores diferentes de petróleo em areia como mostrado na **Figura VII.4**.

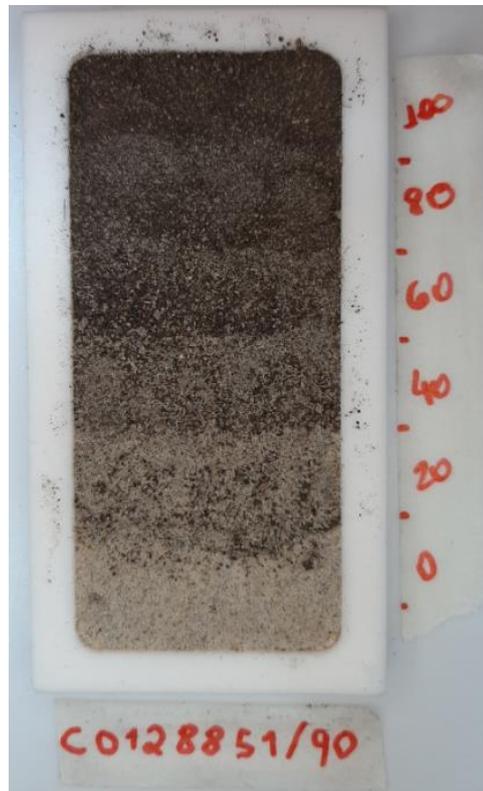


Figura VII.4. Placa de teflon contendo faixas com diferentes proporções de petróleo de derramamento em areia empregada para obtenção de imagens hiperespectrais.

VII.2.3. Tratamento das imagens

As imagens obtidas foram tratadas empregando-se o programa Evince fornecido pelo fabricante da câmera e Matlab 12.0. Os espectros foram transformados pela 1ª. Derivada (2ª. Ordem, janela de 5 pontos) empregando-se o algoritmo de Savitz-Golay. Em seguida os dados foram centrados na média. Procedeu-se a uma análise exploratória por meio de Componentes Principais (PCA) para se observar o comportamento dos pixels da imagem. Em seguida produziu-se imagens em cores falsas dos pixels proporcionais aos valores de scores da primeira componente principal extraída dos dados da imagem hiperespectral.

VII.3. Resultados e discussão

VI.3.1. Resultados para imagens de areia contaminada com petróleo de baixa densidade

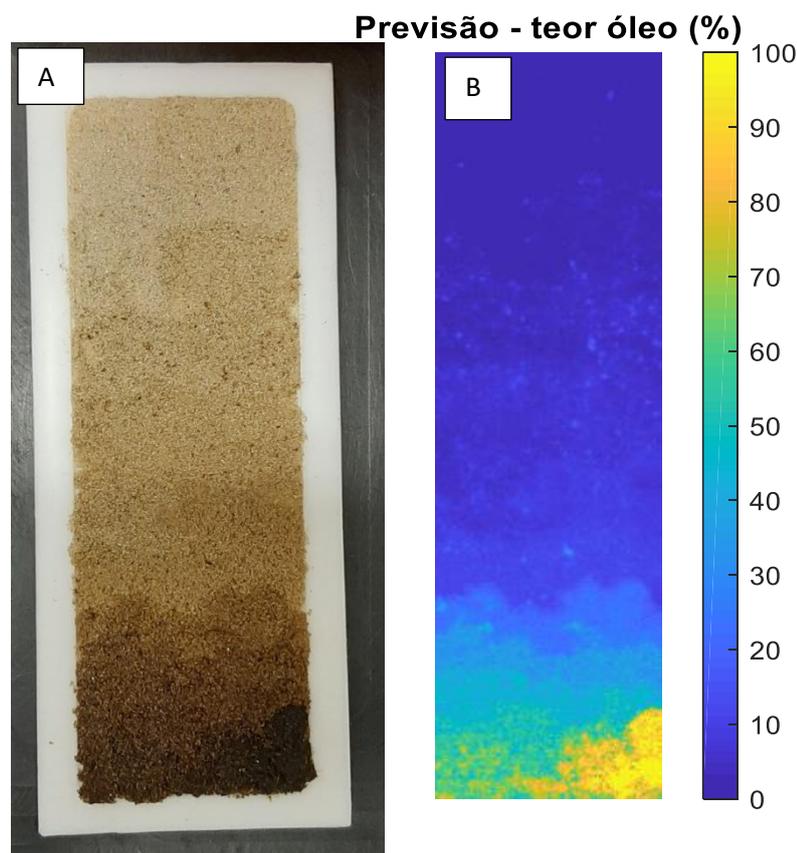


Figura VII.5. Imagens RGB (A) e em cores falsas (B) representando o teor de petróleo de baixa densidade presente na areia.

A **Figura VII.5** mostra o resultado da análise de componentes principais aplicada a placa contendo areia contaminada com petróleo de baixa densidade. Os espectros obtidos de pixels selecionados em cada região da placa contendo a areia contaminada em diferentes teores mostram a contribuição da presença do óleo conforme pode ser observado na **Figura VII.6**. Os espectros de absorção mostram contribuições significativas da presença do óleo nas regiões de 1600 e acima de 2200 nm.

Estes resultados preliminares permitiram verificar que as imagens hiperespectrais podem contribuir para a identificação de contaminação de óleo em areia de praia.

VII.3.2. Resultados para imagens de areia contaminada com amostras provenientes do derramamento de 2019

Procedeu-se, a seguir, a análise das imagens de areia contaminada com amostras reais provenientes do derramamento de 2019. A **Figura VII.7** mostra que resultados semelhantes aos obtidos para a

contaminação com petróleo leve foram obtidos. Os loadings da 1ª. PC reforçam as conclusões anteriores a respeito das regiões espectrais que mais são influenciadas pela presença do óleo.

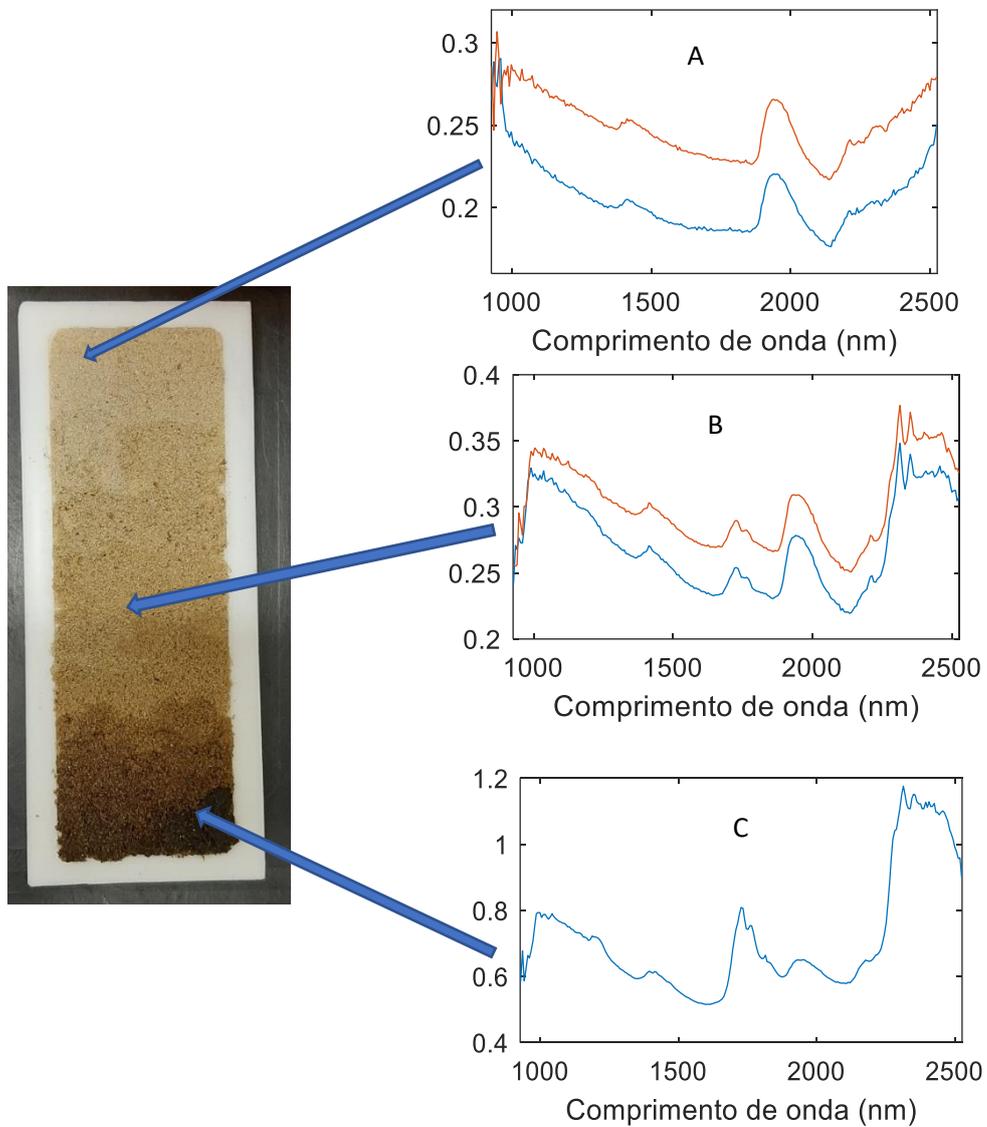


Figura VII.6. Espectros de pixels selecionados da imagem obtida para a placa contendo areia contaminada por petróleo de baixa densidade. (A), areia não contaminada; (B), areia com contaminação média; (C), areia muito contaminada.

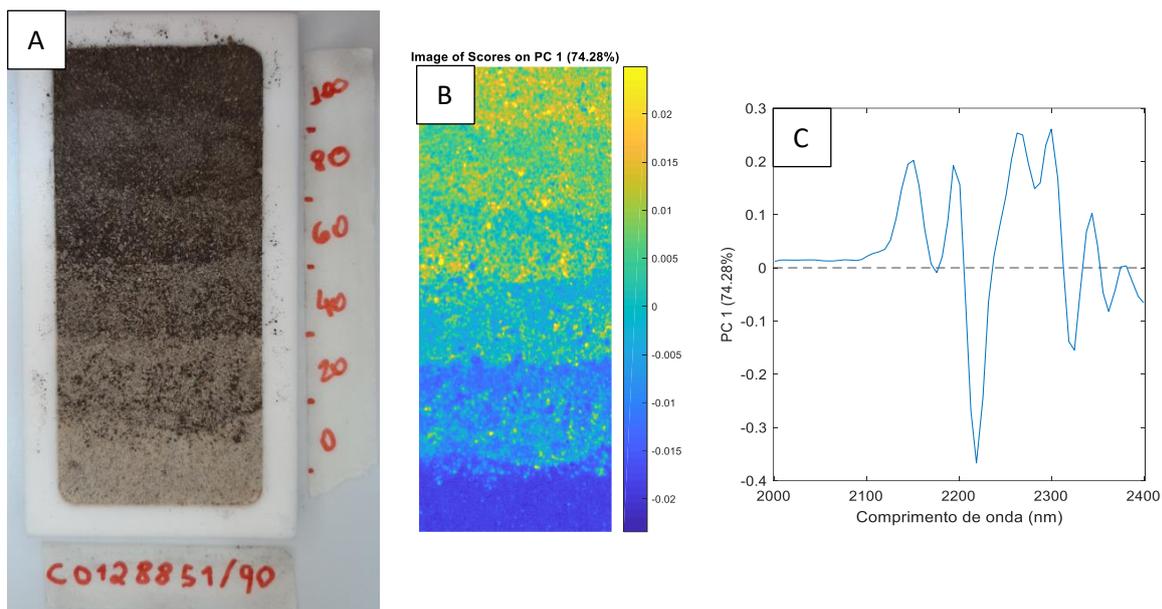


Figura VII.7. Resultados de PCA da imagem da placa de teflon contendo areia contaminada com óleo proveniente do derramamento de 2019. A, imagem RGB da placa contendo areia com diferentes níveis de contaminação; B, imagem em cores falsas baseadas nos valores de scores da 1ª. PC mostrando a correlação dos valores de scores com o nível de contaminação por óleo; C, Loadings das variáveis espectrais relativos a 1ª. PC mostrando as regiões espectrais que mais são influenciadas pela presença do óleo.

VII.3.3. Avaliação da sensibilidade para detecção de óleo em areia

Uma amostra de areia de praia contendo partículas escuras foi contaminada de forma cuidadosa com pequenas partículas (do tamanho médio dos grãos de areia e das partículas escuras, ~ 1 mm) coletadas de uma das amostras do derramamento de 2019. A **Figura VII.8** mostra a fotografia da placa contendo somente a areia da praia e após contaminação com as partículas de óleo. Observa-se que as partículas de óleo são facilmente confundidas com as partículas escuras originalmente presentes na areia.

A análise de componentes principais da região mostrada na **Figura VII. 9**, mostra que os valores de scores da 1ª. PC são capazes de distinguir a partícula escura presente originalmente na areia daquela contendo óleo adicionada. Visualmente, ambas seriam confundidas. Este resultado, apesar de ser preliminar, demonstra o potencial da técnica de imagem hiperespectral na região do infravermelho próximo na detecção de contaminações sutis e persistentes após procedimentos de limpeza ou dispersão do óleo causado por intempéries.

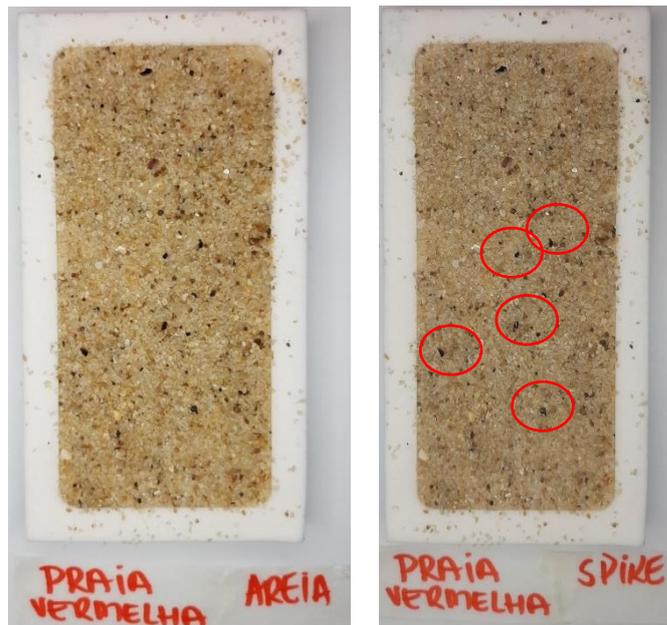


Figura VII.8. Fotografias da placa de teflon mostrando, à esquerda, a areia contendo partículas escuras antes da contaminação por partículas de óleo de derramamento e, à direita, após a contaminação. As partículas de óleo foram propositalmente acrescentadas próximas às partículas escuras originalmente presentes na areia. Os círculos vermelhos marcam as posições das partículas adicionadas.

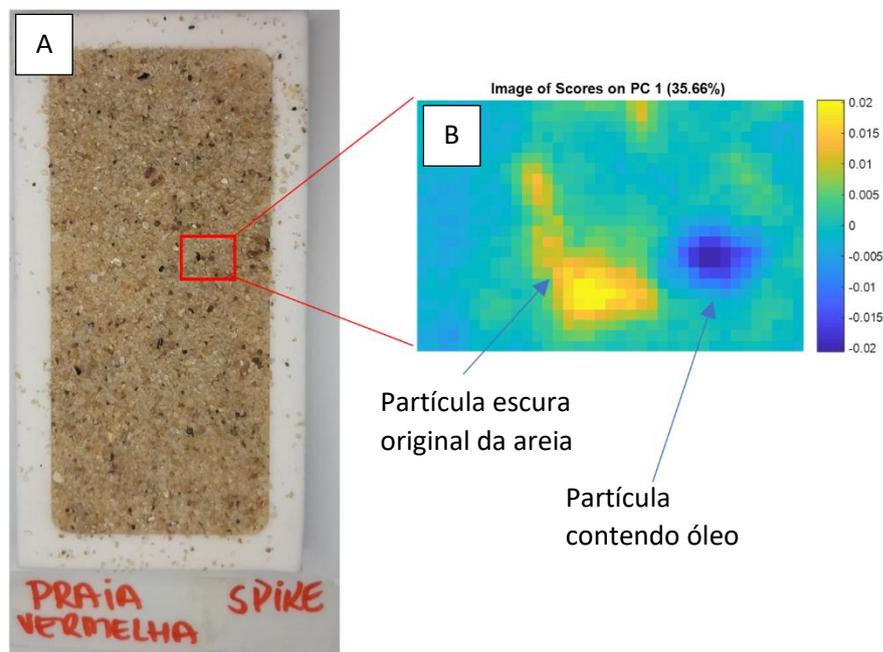


Figura VII.9. Resultado da avaliação da sensibilidade da imagem hiperespectral NIR para a determinação de partículas de óleo em areia. A, fotografia da placa de teflon contendo areia propositalmente contaminada com partículas de óleo de derramamento; B, Imagem ampliada em cores falsas mostrando a diferenciação com base nos valores de scores da 1ª. PC da partícula contendo óleo daquela originalmente presente na areia.

VII. 4. Conclusão parcial

De acordo com os resultados obtidos até o momento, a técnica de imageamento hiperespectral na região do infravermelho próximo (HSI_NIR) em conjunto com a análise quimiométrica apresenta grande potencial para estender o monitoramento de contaminações de petróleo em areia de praia. A sensibilidade da técnica permite a detecção de partículas contendo óleo de tamanho diminuto, dificilmente reconhecíveis a olho nu em ambiente contendo outras partículas de aparência semelhante.

Os estudos estão tendo prosseguimento com a extensão dos experimentos para outras amostras de óleo e de areia de diversas localidades visando verificar a robustez do método baseado em HSI-NIR.

VIII. Conclusão geral

O envolvimento do INCTAA no atendimento à chamada emergencial referente ao derramamento de óleo nas praias brasileiras que ocorreu no ano de 2019 representou uma oportunidade de dirigir o conhecimento multi e interdisciplinar dos seus pesquisadores e sua capacidade de atuação em rede para produzir os resultados relevantes para enfrentamento deste tipo de episódio mostrados neste relatório.

Os laboratórios das diversas instituições de pesquisa associadas ao INCTAA foram capacitados para a realização de análises químicas de alta complexidade e sensibilidade necessárias ao tratamento dos problemas advindos de derramamento de óleo. Procedimentos operacionais padrão, como os que podem ser encontrados no **Apêndice I** deste relatório, foram gerados para uniformizar as operações de coleta e tratamento das amostras de interesse ao tema do derramamento de óleo. Assim, pudemos obter resultados analíticos mais robustos, confiáveis e, portanto, significativos.

Não analisamos o número de amostras que gostaríamos de ter analisado. As restrições impostas pela pandemia da Covid-19 afetaram muito o desenvolvimento das ações do INCTAA neste aspecto. Porém, temos certeza de ter produzido resultados de qualidade, confiáveis e representativos que poderão auxiliar em ações futuras envolvendo o confronto com resultados obtidos pelos demais grupos de pesquisa que atenderam a demanda.

A proposta de construção da biblioteca multiespectral de petróleos e seu uso junto a ferramentas de Inteligência Artificial para permitir ações rápidas de identificação de origem de derramamentos não pode ser executada devido a não se ter conseguido acesso as amostras detidas pela ANP e Petrobras. No entanto, acreditamos que esta ação poderia e deveria ainda ser desenvolvida, pois ela é imprescindível nos momentos agudos de episódios de derramamento para atribuição de responsabilidades.

Por outro lado, os pesquisadores do INCTAA desenvolveram novos métodos analíticos motivados pelo seu envolvimento no tema de derramamento de óleo. Estes desenvolvimentos abrangem o uso de técnicas espectroscópicas sofisticadas aliadas a procedimentos simples de amostragem para permitir a

detecção de contaminação aguda por hidrocarbonetos em água do mar. O procedimento de amostragem proposto neste âmbito apresenta potencial para empreender ações em Ciência Cidadã permitindo a participação de comunidades que residem próximas aos locais afetados por derramamento.

O uso de imagens hiperespectrais para detectar contaminações diminutas de óleo em areia de praia constitui em método inédito de monitoramento das consequências de episódios de derramamento estendendo a capacidade de estudá-las além do momento agudo próximo a ocorrência do derramamento.

Além disso, em consequência do envolvimento do INCTAA, diversos alunos de pós-graduação orientados pelos pesquisadores do instituto foram diretamente expostos a este tipo de problema e capacitados para sua solução o que representa uma contribuição inestimável em termos de formação de pessoal dotado do *know-how* analítico necessário à abordagem do tema.

Os pesquisadores do INCTAA procuraram divulgar os resultados aferidos da execução desta proposta. Um exemplo é o vídeo de divulgação: **CHAVES, J. N.**; CARDOSO, S. L.; CANELA, M. C. Investigação de contaminação da água e de sedimentos do mar por compostos de petróleo. 2020. Vídeo. <https://youtu.be/wB2LfGfnNrk>, disponível no canal do Youtube do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais.

Finalmente, gostaria em nome dos pesquisadores do INCTAA que se envolveram no atendimento desta demanda de agradecer ao MCTI, ao Programa de Ciência no Mar e ao CNPq pela oportunidade de contribuir com este tema relevante para nossa sociedade em geral.

Campinas, 28 de maio de 2023



Prof. Celio Pasquini

Coordenador do INCTAA

APÊNDICE I

AMOSTRAGEM, PREPARO E DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM MATRIZES AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS



**Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias
Analíticas Avançadas – INCTAA**

Grupo de Química Ambiental – UFPR



AMOSTRAGEM, PREPARO E DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM MATRIZES AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

Procedimentos Operacionais Padrão

Coordenador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

Endereço: Centro Politécnico/UFPR

Caixa Postal 19061

CEP 81531-980, Curitiba – Paraná

E-mail: mtgrassi@ufpr.com

Fone: (41) 3361-3176 ou (41) 3361-3186

Março, 2020

Sumário

1. DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAIS DE LABORATÓRIO	4
1.1. OBJETIVO.....	4
1.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	4
1.3. CUIDADOS A SEREM ADOTADOS.....	4
1.4. TÉCNICAS LIMPAS	4
1.4.1. Frascos para coleta	4
1.4.2. Vidrarias volumétricas	5
1.4.3. Vidrarias não volumétricas.....	5
1.4.4. Outros materiais.....	5
2. COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS AQUOSAS E SEDIMENTOS	7
2.1. OBJETIVO.....	7
2.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	7
2.3. AMOSTRAGEM DE ÁGUA	8
2.4. BRANCOS DE LABORATÓRIO, VIAGEM E CAMPO.....	8
2.5. AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO	8
2.6. MODELO DE FICHA DE COLETA (CARTA DE CUSTÓDIA)	10
3. PREPARO DE CURVAS ANALÍTICAS	11
3.1. OBJETIVO.....	11
3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	11
3.3. PREPARO DE PADRÕES E SOLUÇÕES: BTEX	11
3.3.1. Preparo das curvas analíticas para determinação de BTEX.....	12
3.4. PREPARO DE PADRÕES E SOLUÇÕES: HPA.....	13
3.4.1. Solução-padrão de HPA 2000 mg L ⁻¹ (16 compostos), ampola de 1 mL.....	13
3.4.2. Solução de Padrão Interno de HPA 4000 mg L ⁻¹ (6 compostos), ampola de 1 mL.....	13
3.4.3. Surrogate (p-tercfeñil-D ₁₄), 2000 mg L ⁻¹ , ampola de 1 mL.....	13
3.4.4. Preparo da curva analítica para determinação de HPA.....	14
4. DETERMINAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	16
4.1. OBJETIVO.....	16
4.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	16
4.3. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS BTEX	16
4.4. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS HPA	17
5. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS MONO AROMÁTICOS, BTEX EM ÁGUA	18
5.1. OBJETIVO.....	18
5.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	18
5.3. EXTRAÇÃO DE BTEX DE AMOSTRA AQUOSA	18
6. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, HPA EM ÁGUA	19
6.1. OBJETIVO.....	19
6.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	19
6.3. EXTRAÇÃO PARA HPA EM ÁGUAS.....	19
6.4. PREPARO DE CURVAS ANALÍTICAS VIA VA-DLLME	20

6.5.	CONTROLE E GARANTIA DE QUALIDADE DO PROCEDIMENTO.....	21
7.	PREPARO DE AMOSTRA PARA SEDIMENTOS.....	22
7.1.	OBJETIVO.....	22
7.2.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	22
7.3.	PREPARO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE BTEX	22
7.4.	PREPARO DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE HPA	22
7.4.1.	<i>Liofilização</i>	22
7.4.2.	<i>Extração</i>	23
7.4.3.	<i>Controle de qualidade</i>	23
8.	PREPARO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	24
8.1.	OBJETIVO.....	24
8.2.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	24
8.3.	DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA.....	24
8.3.1.	<i>Liofilização</i>	24
8.3.2.	<i>Extração</i>	25
8.3.3.	<i>Clean-up</i>	25
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAIS DE LABORATÓRIO

1.1. Objetivo

Esse protocolo descreve os procedimentos de descontaminação de materiais a serem utilizados na coleta de amostras aquosas, sedimentos e tecidos biológicos visando a determinação de hidrocarbonetos mono aromáticos, BTEX e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA.

1.2. Materiais e equipamentos

- Sistema para purificação de água;
- Sistema para obtenção de água ultrapura (tipo 1) – resistividade superior a 18 mΩ cm⁻¹;
- Solvente orgânico de elevada pureza ou grau cromatográfico: acetona;
- Detergente para laboratório (pH neutro);
- Papel alumínio descontaminado;
- Lavadora ultrassônica tipo banho;
- Estufa para secagem de materiais;
- Caixa plástica (item 2.2), forrada com papel alumínio e com tampa para armazenamento de material descontaminado.

1.3. Cuidados a serem adotados

- Utilizar luvas nitrílicas ou de látex (sem talco) durante todo procedimento de limpeza;
- Não permitir o contato de vidrarias limpas com superfícies sujas. Usar bandejas limpas ou forradas com papel absorvente e/ou alumínio;
- O papel alumínio usado em todos os ensaios deverá ser descontaminado com algodão limpo e embebido em acetona HPLC.

1.4. Técnicas limpas

1.4.1. Frascos para coleta

Os frascos de coleta (item 2.2) devem ser descontaminados com escova e detergente para laboratório, em concentração de 1,5 % v/v (pH neutro). Enxaguar a exaustão com água corrente e depois com água ultrapura, pelo menos 5 x, secar em estufa e rinsar com alíquotas acetona grau HPLC (3 x). As tampas devem ser limpas com o mesmo procedimento, no entanto, devem ser secas em capela em temperatura ambiente e em local protegido de poeira. Após todos frascos estarem secos, guardá-los em recipiente protegido de poeira e umidade. Realizar o branco do lote da frascaria para atestar a eficácia da limpeza.

NOTA: Para eliminar resíduos orgânicos, recomenda-se a calcinação de vidrarias e outros materiais não volumétricos em forno mufla a 400 °C durante 4 h, se disponível.

1.4.2. Vidrarias volumétricas

- Utilizar lavadora/banho ultrassônico para limpeza de todos os materiais a serem utilizados nos experimentos;
- Lavar com água corrente e enxaguar bem (5 X). Colocar o material em um béquer grande, adicionando água até o recobrimento dos itens. Na sequência sonicar por 10 min;
- Em seguida, enxaguar com água destilada (3 X) e repetir o procedimento anterior (enxague e sonicação), substituindo a água de torneira por água destilada e por água deionizada (ultrapura);
- Deixar secar em capela de fluxo unidirecional (laminar) e depois de seco enxaguar com pequenas alíquotas de acetona grau HPLC.

NOTA: Realizar esse último procedimento em uma capela e descartar o resíduo de acetona em local apropriado.

- Após enxaguar com acetona, deixar as vidrarias na capela até total evaporação do solvente;
- Guardar as vidrarias.

NOTA: Vidrarias que não tem tampa podem ser protegidas com papel alumínio.

1.4.3. Vidrarias não volumétricas

- Enxaguar bem com água corrente (5 X). Colocar os vials/inserts em um béquer limpo, cobrir com água de torneira e sonicar por 10 min. Após isso, enxaguar com água destilada e efetuar o mesmo procedimento anterior (enxague e sonicação) utilizando água destilada e água ultrapura;
- Descartar a água (se for necessário pode repetir o enxague com água deionizada);
- Espalhar os vials/inserts em uma bandeja limpa ou forrada com papel absorvente e deixar em capela até total evaporação;
- Após secar, rinsar com acetona alíquotas de acetona HPLC, aguardar a evaporação completa e guardar em local protegido de poeira e umidade.

1.4.4. Outros materiais

- Lavar com água corrente e enxaguar bem (5 X). Em seguida colocar a vidraria em um béquer grande, cobrir com água de torneira e realizar a sonicação por 10 min;
- Em seguida, enxaguar com água destilada (3 X) e repetir o procedimento anterior (enxague e sonicação) empregando água destilada e água ultrapura;
- Deixar secar em estufa;
- Depois de seco enxaguar com alíquotas de acetona (HPLC)
- Após enxaguar com acetona, deixar as vidrarias na capela até total evaporação do solvente;

- Guardar os materiais.

2. COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS AQUOSAS E SEDIMENTOS

2.1. Objetivo

Esse protocolo descreve os materiais e procedimentos para coleta, transporte e preservação de amostras de água e sedimentos para determinação hidrocarbonetos mono aromáticos: benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos, BTEX e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA.

2.2. Materiais e equipamentos

- Sistema para purificação de água;
- Sistema para obtenção de água ultrapura (tipo 1) – resistividade superior a $18 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$;
- Equipamento de proteção individual para coleta em campo: luvas nitrílicas sem talco, máscaras com filtros, óculos de proteção, avental ou jaleco com manga longa, chapéu, botas e protetor solar;
- Fichas de controle/carta de custódia (modelo item 2.6) de amostras e canetas para anotação;
- Balde em aço inox polido descontaminado e com corda;
- Papel alumínio descontaminado;
- Barcas (marmitas) de alumínio com tampas de papelão revestido com alumínio;
- Frascos âmbar em vidro com capacidade de 250 mL com tampas em polietileno forradas com papel alumínio descontaminado;
- Pissetes com acetona grau HPLC;
- Pissetes com água ultrapura;
- Sacos plásticos tipo *Zip lock*;
- Etiquetas e fita adesiva transparente;
- Caixas térmicas com gelo seco;
- Papel toalha e algodão.;
- Álcool em gel para higiene pessoal;
- Estilete;
- Caixa plástica para transporte de materiais;
- Máquina fotográfica (ou celular) e sistema para obtenção de coordenadas de posicionamento global (GPS);
- Sonda multiparâmetro (caso haja) para aferição de parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, condutividade elétrica, salinidade, turbidez, profundidade etc.);
- Garrafa van Dorn de fluxo vertical em aço inox (coleta superficial e em profundidade na coluna d'água);
- Draga em aço inox para coleta de sedimentos.

2.3. Amostragem de água

Importante:

- A coleta de água deve ocorrer antes dos sedimentos;
- A água superficial corresponde a camada abaixo de 30 cm da lâmina d'água, enquanto amostras de fundo compreendem profundidades abaixo de 30 cm e a 1 m do fundo para evitar suspensão de partículas do fundo.
- Evitar coleta acidental de fragmentos maiores como material em suspensão, algas, folhas, gravetos etc.

Realizar a coleta das amostras de água superficial com balde. Para água de fundo utilizar garrafa de von Dorn, transferir a amostra para o frasco de coleta previamente rotulado, preenchendo completamente o volume, sem deixar qualquer volume morto ou *headspace*. Fechar rapidamente as garrafas para evitar a oxidação dos contaminantes.

Após cada etapa realizar a limpeza de baldes e outros com água ultrapura e efetuar a ambientação dos materiais e frascos com água do próprio ponto amostral. Após recolher a amostra, fechar os frascos e acondicionar em caixa térmica com gelo seco. Anotar, rigorosamente, todas as informações da coleta e amostra.

Análises físico-químicas de campo (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, turbidez etc.) devem ser realizadas em alíquotas distintas das das amostras visando evitar contaminação cruzada.

Ao chegar em laboratório os frascos deverão ser mantidos refrigerados (4 °C) por no máximo 14 dias, antes da realização das análises.

2.4. Controles (brancos) de laboratório, viagem e campo

Os brancos de laboratório, viagem e campo devem ser realizados empregando frascos pertencentes ao mesmo lote de descontaminação. Para o branco de laboratório é utilizado um frasco denominado "A" contendo água ultrapura, que é encaminhado para análise junto com as amostras. O branco de viagem e campo será feito em um frasco denominado "B" contendo água ultrapura e esse deve ser levado a campo, retirado da caixa térmica e deve ser aberto desde o início até o término do protocolo de coleta para ser submetido às condições ambientais.

2.5. Amostragem de Sedimento

Vários equipamentos podem ser utilizados para amostragem de sedimentos. De modo geral, para sedimentos aquáticos de fundo utiliza-se draga em aço inox polido. O equipamento precisa ser manuseado de modo a não provocar ondas de impacto na água, o que pode ocasionar perturbação nas camadas superficiais de material depositado no fundo do corpo aquático. Deve-se evitar resistência ou penetração

no material de maneira rápida. Após a cavidade do equipamento ser totalmente preenchida e ser trazida a superfície, é necessário escoar ou sifonar a água superficial eventualmente retida no material. Como o material foi removido de ambiente anóxico, quando em contato com ar existe a tendência de oxidação dos contaminantes, então é necessário efetuar o acondicionamento rápido nos recipientes e em caixa térmica. Os sedimentos serão acondicionados em barcas em papel alumínio. As embalagens de alumínio contendo sedimentos serão fechadas com tampas, colocadas em sacos plásticos *zip lock* rotulados e inseridas em caixa térmica com gelo seco para transporte até o laboratório, onde serão mantidas em freezer (-27 °C), até o momento da abertura das embalagens.

NOTA: As barcas de alumínio ou marmitas de alumínio com tampa, geralmente, são utilizadas para acondicionamento de alimentos e podem ser adquiridas em fornecedores locais. Realizar a descontaminação em laboratório ou em campo com algodão embebido em acetona grau HPLC.

2.6. Modelo de ficha de coleta (carta de custódia)

 <p>INCTAA Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas</p>	<p>FICHA DE COLETA (CARTA DE CUSTÓDIA)</p>	 <p>GQA – UFPR</p>
<p>Nome do programa de amostragem e do coordenador, com telefone para contato:</p>		
<p>Nome dos técnicos responsáveis pela coleta:</p>		
<p>Número de identificação da amostra:</p>		
<p>Identificação do ponto de amostragem: código do ponto, endereço, georreferenciamento etc.:</p>		
<p>Data e hora da coleta:</p>		
<p>Natureza da amostra (água tratada, nascente, poço freático, poço profundo, represa, rio, lago, efluente industrial, água salobra, água salina etc.):</p>		
<p>Medidas de campo (temperatura do ar e da água, pH, condutividade, oxigênio dissolvido, transparência, coloração visual, vazão, profundidade etc.):</p>		
<p>Eventuais observações de campo:</p>		
<p>Condições meteorológicas nas últimas 24 horas que possam interferir com a qualidade da água (chuvas):</p>		
<p>Indicação dos parâmetros a serem analisados nos laboratórios envolvidos:</p>		
<p>Equipamento utilizado (nome, tamanho, malha, capacidade, volume filtrado, e outras informações relevantes):</p>		

3. PREPARO DE CURVAS ANALÍTICAS

3.1. Objetivo

Descreve os materiais e procedimento para o preparo de curvas analíticas para determinação de hidrocarbonetos mono aromáticos, BTEX e policíclicos aromáticos, HPA por cromatografia em fase gasosa acoplada e espectrometria de massas, GC-MS.

3.2. Materiais e equipamentos

- Sistema para purificação de água;
- Sistema para obtenção de água ultrapura (tipo 1) – resistividade superior a 18 mΩ cm⁻¹;
- Padrão analítico de alta pureza contendo a mistura de hidrocarbonetos mono aromáticos BTEX;
- Padrão analítico de alta pureza contendo a mistura de 16 HPA prioritários;
- Padrão analítico de alta pureza subrogado: *p*-terfenil-D₁₄;
- Padrão analítico de alta pureza de HPA deuterados: solução mistura com 6 compostos;
- Frascos em vidro âmbar para armazenar padrões analíticos com tampa contendo septo de borracha/PTFE ou tampa forrada com papel alumínio descontaminado;
- Solventes orgânicos de elevada pureza ou grau cromatográfico: acetona, diclorometano, hexano, tetracloreto de carbono e metanol;
- Unidades filtrantes descartáveis em PTFE com porosidade de 0,45 µm, diâmetro de 27 mm para seringas hipodérmicas com encaixe roscável;
- Seringas hipodérmicas com ponta para agulha roscável e com capacidade mínima de 10 mL;
- Tubos para centrífuga com fundo cônico em borossilicato de capacidade mínima de 15 mL;
- Vórtex para agitação de tubos de ensaios;
- Centrífuga de laboratório compatível com tubos cônicos de 15 mL;
- Micropipetas com volumes variáveis 10-100 µL; 100-1000 µL e 1,00-10,00 mL;
- Ponteiros para micropipetas novas ou descontaminadas;
- *Vials* em vidro com capacidades de 2 e 22 mL para cromatografia com tampas e septos em borracha/PTFE;
- *Inserts* em vidro com capacidade de 250 µL e com mola helicoidal em polipropileno;
- Vidrarias convencionais descontaminadas para laboratório;
- Rack/estante para tubos de ensaio.

3.3. Preparo de padrões e soluções: BTEX

a) **Solução estoque:** Diluir 1,00 mL da solução-padrão de BTEX 2000 mg L⁻¹ (padrão comercial de alta pureza) com metanol HPLC em balão volumétrico de 10,00 mL:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$2000 \text{ mg L}^{-1} \times 1,00 \text{ mL} = C_f \times 10,00 \text{ mL}$$

$$C_f = 200 \text{ mg L}^{-1}$$

b) Preparo de solução aquosa-padrão de BTEX 50 mg L⁻¹ em balão de 10,00 mL a partir de solução-padrão de 200 mg L⁻¹:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$200 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 50 \text{ mg L}^{-1} \times 10,00 \text{ mL}$$

$$V_i = 2,50 \text{ mL}$$

c) Preparo de solução aquosa-padrão de BTEX 5 mg L⁻¹ em balão de 10,00 mL a partir de solução-padrão de 50 mg L⁻¹:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$50 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 5 \text{ mg L}^{-1} \times 10,00 \text{ mL}$$

$$V_i = 1,00 \text{ mL}$$

3.3.1. Preparo das curvas analíticas para determinação de BTEX

Para amostra líquidas, com 7 níveis: 1; 5; 20; 50; 100; 250 e 500 µg L⁻¹;

Para amostras sólidas, com 6 níveis: 5; 20; 50; 100; 250 e 500 µg L⁻¹.

Tabela 1. Níveis para o preparo das curvas analíticas para amostras líquidas (a partir de 1 µg L⁻¹) e sólidas (a partir de 5 µg L⁻¹).

Nível	Volume de padrão adicionado (µL)	Concentração do padrão adicionado (mg L ⁻¹)	Concentração final (µg L ⁻¹)
1	10	1	1
2	50	1	5
3	200	1	20
4	10	50	50
5	20	50	100
6	50	50	250
7	100	50	500

Importante:

- As soluções da curva de calibração são preparadas diretamente em vials de 22 mL. Transfere-se 10 mL de água ultrapura com o auxílio de um micropipetador, em seguida, adiciona-se o volume de padrão. Finalmente, o vial é lacrado.

- Para as curvas analíticas para amostras sólidas, adiciona-se 1,0 g de NaCl, seguido da água ultrapura e do padrão de BTEX.
- São feitas três réplicas de cada nível para fazer uma média dos valores de área e elaborar a curva de calibração.
- A solução-padrão estoque deve ser mantida em congelador sem headspace e devidamente lacrada e datada.
- As demais soluções devem ser mantidas em refrigerador até o necessário.

3.4. Preparo de padrões e soluções: HPA

Todas as soluções devem ser preparadas em diclorometano.

3.4.1. Solução-padrão de HPA 2000 mg L⁻¹ (16 compostos), ampola de 1 mL.

a) Preparo de solução estoque de padrão HPA em balão volumétrico de 25,00 mL a partir da solução de 2000 mg L⁻¹:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$2000 \text{ mg L}^{-1} \times 1,00 \text{ mL} = C_f \times 25,00 \text{ mL}$$

$$C_f = 80 \text{ mg L}^{-1} *$$

*Transferir a solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

3.4.2. Solução de Padrão Interno de HPA 4000 mg L⁻¹ (6 compostos), ampola de 1 mL.

2a) Preparo de solução estoque de Padrão Interno de HPA em balão volumétrico de 25,00 mL a partir da solução de 4000 mg L⁻¹:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$4000 \text{ mg L}^{-1} \times 1,00 \text{ mL} = C_f \times 25,00 \text{ mL}$$

$$C_f = 160 \text{ mg L}^{-1} *$$

*Transferir solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

3.4.3. Surrogate (p-tercfeñil-D₁₄), 2000 mg L⁻¹, ampola de 1 mL.

c) Preparo da solução estoque de p-tercfeñil-D₁₄ em balão volumétrico de 25,00 mL a partir da solução de 2000 mg L⁻¹.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$2000 \text{ mg L}^{-1} \times 1,00 \text{ mL} = C_f \times 25,00 \text{ mL}$$

$$C_f = 80 \text{ mg L}^{-1} *$$

*Transferir solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

3.4.4. Preparo da curva analítica para determinação de HPA

Curva analítica instrumental com 8 níveis: 0,96; 3,84; 9,60; 23,04; 48,0; 96,0; 240 e 480 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Preparo das soluções intermediárias: Cada nível será injetado em triplicata.

d) Solução padrão de HPA de 960 $\mu\text{g L}^{-1}$, partindo da solução estoque de 80 mg L^{-1} , num balão volumétrico de 10,00 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$960 \mu\text{g L}^{-1} \times 10,00 \text{ mL} = 80000 \mu\text{g L}^{-1} \times V_f$$

$$V_f = 120 \mu\text{L}$$

e) Solução padrão de HPA de 192 $\mu\text{g L}^{-1}$, partindo da solução estoque de 80 mg L^{-1} , num balão volumétrico de 10,00 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$192 \mu\text{g L}^{-1} \times 10,00 \text{ mL} = 80000 \mu\text{g L}^{-1} \times V_f$$

$$V_f = 24 \mu\text{L}$$

f) Solução padrão de HPA de 3,84 $\mu\text{g L}^{-1}$, partindo da solução de 192 $\mu\text{g L}^{-1}$, num balão volumétrico de 1,00 mL (esta solução será utilizada no preparo da solução de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$3,84 \mu\text{g L}^{-1} \times 1,00 \text{ mL} = 192 \mu\text{g L}^{-1} \times V_f$$

$$V_f = 20 \mu\text{L}$$

g) Solução de p-tercfeuil-D₁₄, de 5,12 mg L^{-1} , partindo da solução estoque de 80 mg L^{-1} , num balão volumétrico de 10,00 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$5,12 \text{ mg L}^{-1} \times 10,00 \text{ mL} = 80 \text{ mg L}^{-1} \times V_f$$

$$V_f = 640 \mu\text{L}$$

h) Solução de p-tercfeuil-D₁₄, de 256 $\mu\text{g L}^{-1}$, partindo da solução estoque de 5,12 mg L^{-1} , num balão volumétrico de 5,00 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$256 \mu\text{g L}^{-1} \times 5 \text{ mL} = 5,12 \text{ mg L}^{-1} \times V_f$$

$$V_f = 250 \mu\text{L}$$

Tabela 1 - Detalhamento da curva analítica

Nível	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	V. ¹ Padrão ($9,6 \mu\text{g L}^{-1}$)	V. ¹ Padrão ($960 \mu\text{g L}^{-1}$)	V. ¹ Surrogate ($256 \mu\text{g L}^{-1}$)	V. ¹ Surrogate ($5,12 \text{ mg L}^{-1}$)	V. ¹ PI ² ($5,12 \text{ mg L}^{-1}$)	V. ¹ DCM (μL)
1	4,99	520 μL	X	15 μL	X	20 μL	445 μL
2	9,60	X	10 μL	38 μL	X	20 μL	932 μL
3	19,20	X	20 μL	75 μL	X	20 μL	885 μL
4	48,00	X	50 μL	188 μL	X	20 μL	742 μL
5	96,00	X	100 μL	X	19 μL	20 μL	860 μL
6	201,60	X	210 μL	X	40 μL	20 μL	730 μL
7	345,60	X	360 μL	X	X	20 μL	620 μL
8	499,20	X	520 μL	X	X	20 μL	460 μL
7	940,80	X	980 μL	X	X	20 μL	X

¹ V. = volume; ² PI= Padrão Interno, DCM = diclorometano

Importante:

- Preparar a solução de cada nível 20 minutos antes da injeção para evitar perdas por volatilização.
- Concentração final de Padrão Interno e do *p*-tercfeñil- D_{14} no vial será de $102,4 \mu\text{g L}^{-1}$.
- São feitas três réplicas de cada nível para fazer uma média dos valores de área e elaborar a curva de calibração.
- A solução-padrão estoque deve ser mantida em congelador sem headspace e devidamente lacrada e datada.
- As demais soluções devem ser mantidas em refrigerador até o necessário.

4. DETERMINAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

4.1. Objetivo

Descreve os equipamentos e procedimentos para determinação de hidrocarbonetos mono aromáticos, BTEX e policíclicos aromáticos, HPA pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS

4.2. Materiais e equipamentos

- Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas e sistema de autoamostrador para líquido e análises por *headspace*;
- Coluna analítica capilar para sistema GC-MS em sílica fundida com dimensões de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm: Fase estacionária de baixa sangria 95 % polidimetisiloxano e 5 % polisililarileno;
- *Vials* em vidro 2 mL com tampas e septos borracha/PTFE;
- *Vials* em vidro 22 mL para *headspace* com tampa metálica roscável com septos silicone/PTFE.

4.3. Parâmetros instrumentais BTEX

Autosampler headspace: Programar o autosampler para aquecer o *vial* contendo 10,00 mL de amostra aquosa a 60 °C com agitação orbital (150 rpm) durante 10 min. Posteriormente, uma seringa cromatográfica aquecida (60 °C), perfura o septo para amostrar 500 µL da fase de vapor para injeção no GC-MS para quantificação.

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas: Utilizar gás Hélio (99,999 %) como gás de arraste em vazão constante de 1,00 mL min⁻¹. A injeção da amostra ocorre em modo *splitless*, com injetor a 180 °C, sem pulso de pressão e tempo de amostragem de 5 minutos. A coluna é mantida a 35 °C por 5 min, seguida de aquecimento a 10 °C min⁻¹ e por sua vez, um gradiente de 30 °C min⁻¹ a 200 °C, sendo mantida por 2 min. A linha de transferência e a fonte de íons 250 °C.

O monitoramento dos compostos pode ser realizado em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), conforme os parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos, abreviações, tempos de retenção e m/z para os íons monitorados

Composto	Abreviação	Tempo de retenção (min)	Íon monitorado ^a <i>m/z</i>
Benzeno	Ben	3,03	78, 51
Tolueno	Tol	5,59	91, 65
Etil-benzeno	Etb	7,96	91, 106
o-Xileno	o-Xil	8,14	91, 106
m-Xileno+p-Xileno	m+p-Xil	8,66	91, 106

^a: m/z do íon monitorado em itálico.

4.4. Parâmetros instrumentais HPA

Para a separação, identificação e quantificação dos HPA, em todas as matrizes ambientais e biológicas utiliza-se a técnica de GC-MS. O cromatógrafo é operado com Hélio de alta pureza (99,999 %) como gás de arraste, em vazão constante de 1,20 mL min⁻¹. Padrões analíticos e amostras serão injetados em volume de 1 µL, em modo *splitless*, com o injetor em 270 °C, sem pulso de pressão e tempo de amostragem de 4 min. A coluna cromatográfica, inicialmente, é mantida em 50 °C por 5 min, seguida por aquecimento a 5 °C min⁻¹ até 230 °C, gradiente 2 °C min⁻¹ até 250 °C e finalmente rampa a 5 °C min⁻¹ até 300 °C, mantida por 8 min. A linha de transferência e fonte de íons operados a 280 e 230 °C, respectivamente. Visando maior seletividade e detectabilidade os analitos utiliza-se quantificação por monitoramento seletivo de íons (SIM), conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Compostos, abreviações, tempos de retenção e m/z para os íons monitorados

Composto	Abreviação	Tempo de retenção (min)	Íon monitorado ^a <i>m/z</i>
Naftaleno[² H ₈]	Nap[² H ₈]	7,87	136, 137, 108
Naftaleno	Nap	7,91	128, 127, 129
Acenaftileno	Acy	11,30	152, 151, 150
Acenaftileno[² H ₁₀]	Ace[² H ₁₀]	11,64	162, 164, 160
Acenafteno	Ace	11,71	153, 154, 152
Fluoreno	Flu	12,92	166, 165, 164
Fenantreno[² H ₁₀]	Phe[² H ₁₀]	15,11	188, 187, 184
Fenantreno	Phe	15,16	178, 176, 152
Antraceno	Ant	15,29	178, 176, 179
Fluoranteno	Fla	17,99	202, 200, 203
Pirene	Pyr	18,51	202, 200, 201
<i>p</i> -Tercfenil[² H ₁₄]	<i>p</i> -Ter[² H ₁₄]	19,05	244, 243, 245
Benz[<i>a</i>]antaceno	BaA	22,29	228, 226, 229
Criseno[² H ₁₂]	Chr[² H ₁₂]	22,35	240, 236, 241
Criseno	Chr	22,43	228, 226, 229
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	BbF	26,78	252, 250, 253
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	BkF	26,92	252, 250, 253
Benzo[<i>a</i>]pirene	BaP	28,35	252, 250, 253
Perileno[² H ₁₂]	Per[² H ₁₂]	28,68	264, 260, 265
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	Ind	33,39	276, 277, 274
Dibenz[<i>a,h</i>]antraceno	DahA	33,56	278, 279, 276
Benzo[<i>ghi</i>]perileno	BghiP	34,13	276, 277, 274

^a: m/z do íon monitorado em itálico.

5. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS MONO AROMÁTICOS, BTEX EM ÁGUA

5.1. Objetivo

Descreve o procedimento para preparo de amostra para extração hidrocarbonetos mono aromáticos, BTEX em amostras aquosas visando determinação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS.

5.2. Materiais e equipamentos

- Micropipeta com volume variável 1,00-10,00 mL;
- Ponteiros para micropipeta;
- *Vials* em vidro com rosca, capacidade de 22 mL com tampa e septos em borracha/PTFE. Adequados para *autosampler headspace*.

5.3. Extração de BTEX de amostra aquosa

Remover da refrigeração os frascos contendo as amostras aquosas. Para análise transferir 10 mL da amostra para um *vial*, lacrar e colocar no auto-amostrador *headspace* acoplado ao GC-MS, utilizando-se de parâmetros cromatográficos previamente otimizados. Injetar metanol entre cada amostra.

6. EXTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, HPA EM ÁGUA

6.1. Objetivo

Estabelece os materiais e o procedimento para extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em amostras aquosas visando a determinação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

6.2. Materiais e equipamentos

- Sistema para purificação de água;
- Sistema para obtenção de água ultrapura (tipo 1) – resistividade superior a 18 mΩ cm⁻¹;
- Padrão analítico de alta pureza contendo a mistura de 16 HPA prioritários;
- Padrão analítico de alta pureza subrogado: *p*-terfenil-D₁₄;
- Padrão analítico de alta pureza de HPA deuterados: solução mistura com 6 compostos;
- Solventes orgânicos de elevada pureza ou grau cromatográfico: acetona, diclorometano, hexano, tetracloreto de carbono e metanol;
- Tubos para centrifuga com fundo cônico em borossilicato de capacidade mínima de 15 mL;
- Vórtex para agitação de tubos de ensaios;
- Centrífuga de laboratório compatível com tubos cônicos de 15 mL;
- Micropipetas com volumes variáveis 10-100 µL; 100-1000 µL e 1,00-10,00 mL;
- Ponteiras para micropipetas com forma longa, novas ou descontaminadas;
- *Vials* em vidro com capacidade de 2 mL para cromatografia com tampa em polipropileno e septo borracha/PTFE;
- *Inserts* em vidro com capacidade de 250 µL e com mola helicoidal em polipropileno;
- Vidrarias convencionais descontaminadas para laboratório;
- Rack/estante para tubos de ensaio;
- Estufa para secagem de materiais.

6.3. Extração para HPA em águas

Para extração de HPA de amostras aquosas será utilizado a microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex (VA-DLLME), conforme esquema apresentado na Figura 1.

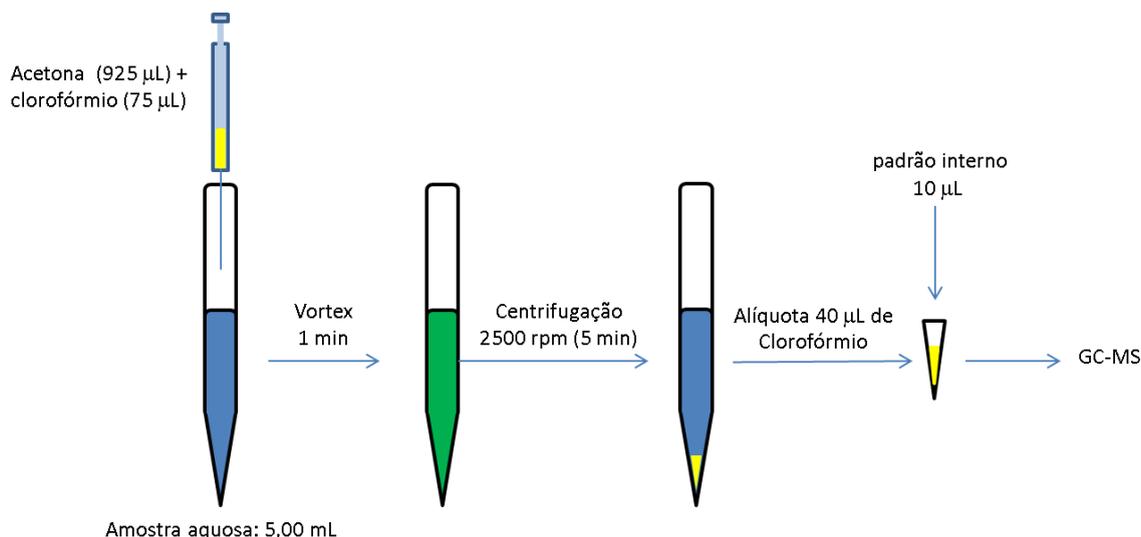


Fig. 1 - Diagrama esquemático do método de microextração líquido-líquido dispersa assistida por vórtex (VA-DLLME).

O protocolo é executado em tubos de vidro de fundo cônico (15 mL), nos quais é transferida uma alíquota de 5,00 mL de amostra aquosa. No mesmo tubo, 1,00 mL de solução de 75 µL clorofórmio (extrator) solubilizado em 925 µL acetona (dispersante) é rapidamente injetado com micropipeta. A injeção rápida facilita a formação de gotículas de clorofórmio no meio, imiscíveis com a fase aquosa. Para aumentar a eficiência da extração é empregada agitação por vórtex durante 1,00 min e na sequência, para separação de fase é aplicada centrifugação por 5 min (2500 rpm), favorecendo a formação de uma fase sedimentada (gota). Posteriormente a gota é removida quantitativamente (40 µL) e transferida para um *insert* cromatográfico contendo 10 µL de solução de mistura dos padrões internos deuterados de HPA em meio de HCCl_3 , fornecendo concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, essas soluções serão injetadas no GC-MS para obter os sinais analíticos e quantificação utilizando as curvas analíticas.

6.4. Preparo de curvas analíticas via VA-DLLME

A obtenção das curvas analíticas será realizada em triplicata via VA-DLLME. Para isso, amostras de água do mar sintética serão fortificadas com os HPA de interesse submetidas ao processo de extração por VA-DLLME. Serão utilizados os 16 HPA prioritários e 1 padrão sub-rogado em 5 níveis de concentração: 0,10; 0,30; 0,60; 1,20 e $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$, contendo os 5 padrões internos em concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. As curvas serão monitoradas de acordo com alguns parâmetros de desempenho como faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), estimativas de desvio padrão de inclinação e intercepto e limites de detecção e quantificação.

6.5. Controle e garantia de qualidade do procedimento

O controle e garantia de qualidade do protocolo pode ser monitorado via ensaios de recuperação analítica para avaliar a precisão e exatidão do método VA-DLLME, em três níveis de concentração ($n = 3$), 0,25; 0,50 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ensaios em branco são conduzidos para avaliar a descontaminação de frascos de amostragem, para monitorar o desempenho do protocolo e instrumentos.

7. PREPARO DE AMOSTRA PARA SEDIMENTOS

7.1. Objetivo

Estabelece o procedimento de preparo de amostras de sedimentos aquáticos para determinação de hidrocarbonetos mono aromáticos (BTEX) e policíclicos aromáticos (HPA) por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

7.2. Materiais e equipamentos

- Almofariz e pistilo, ambos em cerâmica;
- Tubos para centrifuga em vidro cônico (15 mL) com tampa roscável;
- Rack/estante para tubos de ensaio de 15 mL;
- Frascos em vidro âmbar (50 mL) com boca larga e tampa para armazenar sedimentos após liofilização e maceração;
- Solventes com grau HPLC: acetonitrila (ACN) e diclorometano (DCM);
- Micropipetas com volume ajustável;
- *Vials* em vidro de 2 e 22 mL com tampas e septos em borracha/PTFE.
- Centrífuga para tubos de ensaio com capacidade de 15 mL;
- Liofilizador de bancada;
- Balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g;
- Banho ultrassônico;
- Sistema para evaporação de solvente;
- Material certificado de referência: NIST 1941b - "*Organics in marine sediment*".

7.3. Preparo das amostras de sedimento para determinação de BTEX

Adicionar 1,0 g de NaCl e 2,0 g de sedimento em um vial e depois adicionar 10 mL de água ultrapura. O vial (22 mL) deve então ser colocado a extração por *headspace* no auto-amostrador acoplado ao GC-MS, utilizando-se de parâmetros cromatográficos previamente otimizados. Injetar metanol entre cada amostra.

7.4. Preparo das amostras de sedimento para determinação de HPA

7.4.1. Liofilização

A liofilização tem como objetivo eliminar a água remanescente das amostras sem perdas significativas dos analitos. Primeiramente, espalhar cerca de 50 g das amostras em placas de Petri para aumentar a área superficial dos materiais, cobrir com papel alumínio perfurado e colocar em freezer (-27

°C), por no mínimo 24 h. No dia da liofilização, antes da retirada do freezer, inicializar o equipamento para minimizar o tempo que as amostras irão permanecer em temperatura ambiente. Retirar o papel alumínio e colocar no equipamento, caso seja observada água em estado líquido, repetir o congelamento ou utilizar N₂ líquido para um melhor resultado. Após iniciada a liofilização observar a coloração inicial dos sedimentos e anotar. Como o processo é empírico, a finalização acontecerá quando o material apresentar coloração uniforme e opaca, tipicamente entre 24 a 72 h. Após o término, triturar os sedimentos com almofariz e pistilo, guardar em vidro âmbar, tampado e manter em freezer.

7.4.2. Extração

Pesar aproximadamente 0,5 g de sedimento e transferir para um tubo de vidro cônico com tampa, juntamente com alíquota de padrão subrogado p-tercfeñil-D₁₄ em meio de DCM, para proporcionar 50 ng g⁻¹. Deixar em capela de exaustão por 30 min para evaporação completa do solvente, adicionar 5,00 mL de ACN:DCM (1:5, v/v) e tampar os tubos com papel alumínio descontaminado ou tampa. Sonicar os tubos por 30 min, centrifugar por 10 min (2500 rpm) e verter o sobrenadante para outro tubo. Repetir o procedimento por mais 2 vezes, combinar os extratos e secar em fluxo gentil de N₂. Ressuspender em 250 µL de solução de DCM contendo os padrões internos deuterados em concentração de 100 µg L⁻¹. Transferir para *inserts* em vidro e *vial* e proceder as determinações cromatográficas.

7.4.3. Controle de qualidade

Periodicamente a garantia de qualidade do procedimento será avaliada mediante a ensaios em branco, mediante fortificação ou empregando material de referência certificado (NIST 1941b).

8. PREPARO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

8.1. Objetivo

Descreve o protocolo para preparação de tecidos musculares de peixe e camarão visando determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS.

8.2. Materiais e equipamentos

- Balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g;
- Freezer para congelamento de amostras ou N₂ líquido;
- Almofariz e pistilo em ágata (capacidade de 100 mL);
- Lã de vidro descontaminada com acetona HPLC;
- Papel alumínio calcinado ou descontaminado com acetona HPLC;
- Coluna em vidro para cromatografia com dimensões de 340 x 10 mm;
- Sílica cromatográfica 230-400 mesh;
- Alumina: Al₂O₃;
- Silicato sintético de magnésio: Florisil® tamanho de partícula <200 mesh;
- Agente secante: sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄);
- Tubos em vidro borossilicato cônico para centrífuga;
- Solventes orgânicos grau cromatográfico (HPLC): acetona, acetonitrila, diclorometano e hexano.
- Banho ultrassônico;
- Centrífuga para tubos de 15 mL;
- *Inserts* em vidro (250 µL) com mola em polipropileno ou equivalente;
- *Vials* em vidro (2 mL) com tampa e septo em silicone/PTFE;
- Liofilizador de bancada;
- Estufa para secagem de vidrarias.

8.3. Dispersão de matriz em fase sólida

O método de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é aplicado para a extração de HPA de amostras biológicas: tecidos musculares de peixes e camarão. O protocolo compreende três etapas principais que são liofilização, extração e clean-up.

8.3.1. Liofilização

A liofilização tem como objetivo eliminar a água remanescente das amostras sem perdas significativas dos analitos. Primeiramente, espalhar cerca de 5 g das amostras em placas de Petri para

umentar a área superficial dos materiais, cobrir com papel alumínio perfurado e colocar em freezer (-27 °C), por no mínimo 24 h. No dia da liofilização, antes da retirada do freezer, inicializar o equipamento para minimizar o tempo que as amostras irão permanecer em temperatura ambiente. Retirar o papel alumínio e colocar no equipamento, caso seja observada água em estado líquido, repetir o congelamento ou utilizar N₂ líquido para um melhor resultado. Após iniciada a liofilização observar a coloração inicial dos tecidos e anotar. Como o processo é empírico, a finalização acontecerá quando o material apresentar coloração uniforme e opaca, tipicamente entre 24 a 72 h. Após o término, triturar os materiais com almofariz e pistilo, guardar em vidro âmbar, tampado e manter em freezer até o momento da extração dos HPA.

8.3.2. Extração

O protocolo de extração consiste na maceração de 0,3 g de amostra com 0,3 g do sorvente Florisil e 0,5 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) como agente secante em almofariz e pistilo por três minutos. O sólido obtido na etapa anterior é submetido ao processo de extração e *clean-up* empregando coluna cromatográfica.

8.3.3. Clean-up

Em uma coluna de vidro, com dimensões de 30 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,8 cm, é colocado um chumaço de lã de vidro descontaminada ou calcinada até o fundo para reter a fase sólida. Em seguida, são adicionados 2 g de sílica, 1 g de alumina e 0,5 g de agente secante, Na₂SO₄. O empacotamento da coluna é feito com eluição de 10 mL hexano (grau HPLC) sob pressão de N₂. Na sequência realizar o condicionamento com 10 mL de acetonitrila com N₂. Após a coluna ser condicionada o sólido proveniente do processo de extração é inserido no topo da coluna e 10 mL de acetonitrila serão utilizados na etapa de eluição dos compostos. O extrato é recolhido em tubo de ensaio e posteriormente seco em fluxo gentil de N₂, ressolubilizado em 250 µL de diclorometano e transferido para um *insert* cromatográfico para quantificação por GC-MS.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Guia Nacional de coleta e preservação e amostras: Água, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidos (Disponível em <https://www.ana.gov.br/acesso-a-informacao/institucional/publicacoes#destaques> acesso em 12/02/2020).

Procedimento de preparo de amostras aquosas:

Extração de compostos orgânicos semivoláteis

1. Objetivo

Descreve os materiais e procedimento para extração e determinação e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em amostras aquosas.

2. Materiais e equipamentos

- Padrão analítico de alta pureza contendo a mistura de 16 HPA prioritários;
- Padrão analítico de alta pureza subrogado: *p*-terfenil-D14;
- Padrão analítico de alta pureza de HPA deuterados: solução mistura com 6 compostos;
- Frascos em vidro âmbar tipo *vial* de 20 mL para armazenar padrões analíticos com tampa contendo septo de borracha/PTFE;
- Sistema para purificação e água por destilação ou via osmose reversa;
- Purificador para obtenção de água ultrapura (tipo 1), dotado de lâmpada UV e filtro com porosidade de 0,05 µm;
- Solventes orgânicos de elevada pureza ou grau cromatográfico: acetona, diclorometano, hexano, tetracloreto de carbono e metanol;
- Unidades filtrantes descartáveis em PTFE com porosidade de 0,45 µm, diâmetro de 27 mm para seringas hipodérmicas com encaixe roscável;
- Seringas hipodérmicas com ponta para agulha roscável e com capacidade mínima de 10 mL;
- Tubos para centrífuga com fundo cônico em borossilicato (Duran, Pyrex ou equivalente) de capacidade mínima de 15 mL e com tampa roscável;
- Vórtex para agitação de tubos de ensaios;
- Centrífuga de laboratório compatível com tubos cônicos de 15 mL;
- Micropipetas com volumes variáveis 10-100 µL; 100-1000 µL e 1,00-5,00 mL;
- Ponteiras para micropipetas com forma longa, novas ou descontaminadas;
- *Vials* em vidro com capacidade de 2,0 mL para cromatografia com tampa em polipropileno e septo borracha/PTFE;
- *Inserts* em vidro com capacidade de 250 µL e com mola helicoidal em polipropileno;
- Vidrarias convencionais descontaminadas para laboratório;
- Rack/estante para tubos de ensaio;

- Lavadora ultrassônica tipo banho;
- Capela de fluxo laminar;
- Estufa para secagem de materiais;
- Forno mufla para calcinação de vidrarias e materiais.

3. Preparo de padrões e soluções

Todas as soluções devem ser preparadas em diclorometano.

Solução-padrão de HPA 2000 mg/L (16 compostos)', ampola de 1 mL.

a) Preparo de solução estoque de padrão HPA em balão volumétrico de 25 mL a partir da solução de 2000 mg/L:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$2000 \text{ mg/L} \times 1 \text{ mL} = C_f \times 25 \text{ mL}$$

$$C_f = 80 \text{ mg/L} *$$

*Transferir a solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

Solução de Padrão Interno de HPA 4000 mg/L (6 compostos), ampola de 1 mL.

2a) Preparo de solução estoque de Padrão Interno de HPA em balão de 25 mL a partir da solução de 4000 mg/L:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$4000 \text{ mg/L} \times 1 \text{ mL} = C_f \times 25 \text{ mL}$$

$$C_f = 160 \text{ mg/L} *$$

*Transferir solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

Surrogate (p-tercfenil-D14), 2000 mg/L, ampola de 1 mL.

c) Preparo da solução estoque de p-tercfenild14 em balão volumétrico de 25 mL a partir da solução de 2000 mg/L.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$2000 \text{ mg/L} \times 1 \text{ mL} = C_f \times 25 \text{ mL}$$

$$C_f = 80 \text{ mg/L} *$$

*Transferir solução para um frasco âmbar de 25 mL e armazenar no congelador.

Curva analítica instrumental com 8 níveis: 0,96; 3,84; 9,60; 23,04; 48,0; 96,0; 240 e 480 ug/L.

Preparo das soluções intermediárias:

d) Solução padrão de HPA de 960 ug/L, partindo da solução estoque de 80 mg/L, num balão de 10 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$960 \text{ ug/L} \times 10 \text{ mL} = 80000 \text{ ug/L} \times V_f$$

$$V_f = 120 \text{ }\mu\text{L}$$

e) Solução padrão de HPA de 192 ug/L, partindo da solução estoque de 80 mg/L, num balão de 10 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$192 \text{ ug/L} \times 10 \text{ mL} = 80000 \text{ ug/L} \times V_f$$

$$V_f = 24 \text{ }\mu\text{L}$$

f) Solução padrão de HPA de 3,84 ug/L, partindo da solução de 192 ug/L, num balão de 1 mL (esta solução será utilizada no preparo da solução de 0,5 ug/L).

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$3,84 \text{ ug/L} \times 1 \text{ mL} = 192 \text{ ug/L} \times V_f$$

$$V_f = 20 \text{ }\mu\text{L}$$

g) Solução de ptercfeñil-d14, de 5,12 mg/L, partindo da solução estoque de 80 mg/L, num balão de 10 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$5,12 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL} = 80 \text{ mg/L} \times V_f$$

$$V_f = 640 \text{ }\mu\text{L}$$

h) Solução de ptercfeñil-d14, de 256 ug/L, partindo da solução estoque de 5,12 mg/L, num balão de 5 mL.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$256 \text{ ug/L} \times 5 \text{ mL} = 5,12 \text{ mg/L} \times V_f$$

$$V_f = 250 \text{ }\mu\text{L}$$

Tabela 1 - Detalhamento da curva analítica

Nível	Conc. (ug/L)	V. ¹ padrão (9,6 ug/L)	V. ¹ padrão (960 ug/L)	V. ¹ Surrogate (256 ug/L)	V. ¹ Surrogate (5,12 mg/L)	V. ¹ PI ² (5,12 mg/L)	V. ¹ DCM
1	4,99	520 µL	X	15,0 µL	X	20 µL	445 µL
2	9,60	X	10 µL	38,0 µL	X	20 µL	932 µL
3	19,20	X	20 µL	75,0 µL	X	20 µL	885 µL
4	48,00	X	50 µL	188,0 µL	X	20 µL	742 µL
5	96,00	X	100 µL	X	19 µL	20 µL	860 µL
6	201,60	X	210 µL	X	40 µL	20 µL	730 µL
7	345,60	X	360 µL	X	X	20 µL	620 µL
8	499,20	X	520 µL	X	X	20 µL	460 µL
7	940,80	X	980 µL	X	X	20 µL	X

¹ V. = volume; ² PI= Padrão Interno

Importante:

- Preparar a solução de cada nível 20 minutos antes da injeção para evitar perdas por volatilização.
- Concentração final de Padrão Interno e do ptercfeild14 no vial será de 102,4 ug/L.
- São feitas três réplicas de cada nível para fazer uma média dos valores de área e elaborar a curva de calibração.
- A solução-padrão estoque deve ser mantida em congelador sem headspace e devidamente lacrada e datada.
- As demais soluções devem ser mantidas em refrigerador até o necessário.

4. Protocolo de extração

Para extração de HPA de amostras aquosas será utilizado a microextração líquido-líquido dispersa assistida por vórtex (VA-DLLME), conforme esquema apresentado na Figura 1.

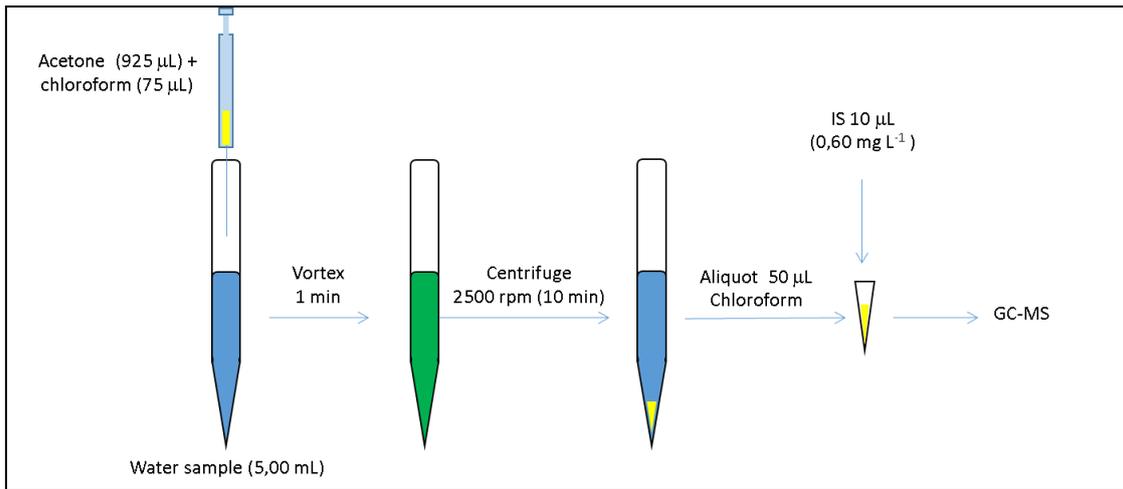


Fig. 1 - Diagrama esquemático do método de microextração líquido-líquido dispersa assistida por vórtex (VA-DLLME).

O protocolo é executado em tubos de vidro de fundo cônico (15 mL), nos quais é transferida uma alíquota de 5,00 mL de amostra contendo o HPA. No mesmo tubo, 1,00 mL de solução de 75 µL clorofórmio (extrator) solubilizado em 925 µL acetona (dispersante) é rapidamente injetado com micropipeta. A injeção rápida facilita a formação de gotículas de clorofórmio no meio, imiscíveis com a fase aquosa. Para aumentar a eficiência da extração é empregada agitação por vórtex durante 1,00 min e na sequência, para separação de fase é aplicada centrifugação por 5 min (2500 rpm), favorecendo a formação de uma fase sedimentada (gota). Posteriormente a gota é removida quantitativamente (50 µL) e transferida para um *insert* cromatográfico contendo 10 µL de solução de mistura dos padrões internos deuterados de HPA, fornecendo concentração de 100 µg L⁻¹. Finalmente, essas soluções serão injetadas no GC-MS para obter os sinais analíticos e quantificação utilizando curvas analíticas.

5. Preparo das curvas analíticas

A obtenção das curvas analíticas será realizada em triplicata via VA-DLLME. Para isso, amostras de água do mar sintética serão fortificadas com os HPA de interesse submetidas ao processo de extração por VA-DLLME. Serão utilizados os 16 HPA prioritários e 1 padrão sub-rogado em 6 níveis de concentração: 0,10; 0,30; 0,60; 1,20; 2,50 e 4,00 µg L⁻¹, contendo os 5 padrões internos em concentração de 100 µg L⁻¹. As curvas serão monitoradas de acordo com alguns parâmetros de desempenho como faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), estimativas de desvio padrão de inclinação e intercepto e limites detecção e quantificação.

6. Controle e garantia de qualidade do procedimento

O controle e garantia de qualidade do protocolo será constantemente monitorado via ensaios de recuperação analítica para avaliar a precisão e exatidão do método VA-DLLME, em três níveis de concentração ($n = 3$), 0,15; 0,50 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ensaios em branco serão conduzidos para avaliar a descontaminação de frascos de amostragem, para monitorar o desempenho do protocolo e instrumentos.

Procedimento para preparo de amostras biológicas

Compostos orgânicos semivoláteis em tecidos musculares de peixe e camarão

1. Objetivo

Descreve o protocolo para preparação de tecidos musculares de peixe e camarão visando determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

2. Materiais necessários

- Freezer para congelamento de amostras ou N₂ líquido;
- Liofilizador de bancada;
- Forno mufla para calcinação de vidrarias e materiais;
- Estufa para secagem de vidrarias;
- Capela de fluxo laminar unidirecional para secagem de materiais volumétricos;
- Balança analítica digital microprocessada com precisão de $\pm 0,1$ mg;
- Almofariz e pistilo em ágata (capacidade de 100 mL);
- Lá de vidro calcinada;
- Papel alumínio calcinado;
- Coluna em vidro para cromatografia com dimensões de 340 x 10 mm;
- Sílica cromatográfica 230-400 mesh;
- Alumina: Al₂O₃;
- Silicato sintético de magnésio: Florisil® tamanho de partícula <200 mesh;
- Agente secante: sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄);
- Tubos em vidro cônico para centrífuga com tampa;
- Solventes orgânicos grau cromatográfico (HPLC): acetona, acetonitrila, diclorometano e hexano.
- Banho ultrassônico;
- Centrífuga para tubos de 15 mL;
- *Inserts* em vidro (250 μ L) com mola em PP.
- *Vials* em vidro âmbar (2 mL) com tampa e septo em silicone/PTFE.

3. Dispersão de matriz em fase sólida

O método de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) é aplicado para a

extração de HPA de amostras biológicas: tecidos musculares de peixes e camarão. O protocolo compreende três etapas principais que são liofilização, extração e clean-up.

Liofilização

A liofilização tem como objetivo eliminar a água remanescente das amostras sem perdas significativas dos analitos. Primeiramente, espalhar cerca de 5 g das amostras em placas de Petri para aumentar a área superficial dos materiais, cobrir com papel alumínio perfurado e colocar em freezer (-27 °C), por no mínimo 24 h. No dia da liofilização, antes da retirada do freezer, inicializar o equipamento para minimizar o tempo que as amostras irão permanecer em temperatura ambiente. Retirar o papel alumínio e colocar no equipamento, caso seja observada água em estado líquido, repetir o congelamento ou utilizar N₂ líquido para um melhor resultado. Após iniciada a liofilização observar a coloração inicial dos tecidos e anotar. Como o processo é empírico, a finalização acontecerá quando o material apresentar coloração uniforme e opaca, tipicamente entre 24 a 72 h. Após o término, triturar os materiais com almofariz e pistilo, guardar em vidro âmbar, tampado e manter em freezer até o momento da extração dos HPA.

Extração

O protocolo de extração consiste na maceração de 0,3 g de amostra com 0,3 g do sorvente Florisil e 0,5 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) como agente secante em almofariz e pistilo por três minutos. O sólido obtido na etapa anterior é submetido ao processo de extração e *clean-up* empregando coluna cromatográfica.

Clean-up

Em uma coluna de vidro, com dimensões de 30 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,8 cm, é colocado um chumaço de lã de vidro calcinado até o fundo para reter a fase sólida. Em seguida, são adicionados 2 g de sílica, 1 g de alumina e 0,5 g de agente secante, Na₂SO₄. O empacotamento da coluna é feito com eluição de 10 mL hexano (grau HPLC) sob pressão de N₂. Na sequência realizar o condicionamento com 10 mL de acetonitrila com N₂. Após a coluna ser condicionada o sólido proveniente da etapa anterior é inserido no topo da coluna e 10 mL de hexano serão utilizados na etapa de eluição dos compostos. O extrato é recolhido em tubo de ensaio e posteriormente seco em evaporador rotativo à vácuo, ressolubilizado em 250 µL de diclorometano e transferido para um *insert* cromatográfico para quantificação por GC-MS.

Procedimento de preparo de amostra de sedimentos

Extração de HPA em sedimentos aquáticos de fundo

1. Objetivo

Estabelece o procedimento de preparo de amostras de sedimentos aquáticos para determinação de HPA por cromatografia em fase gasosa.

2. Equipamentos, materiais e reagentes

- Liofilizador de bancada;
- Balança analítica digital com precisão de $\pm 0,1$ mg;
- Banho ultrassônico;
- Centrífuga para tubos de ensaio com capacidade de 15 mL;
- Evaporador rotativo a vácuo ou N_2 (4.6) para evaporação de solvente;
- Almofariz e pistilo, ambos em cerâmica;
- Tubos para centrifuga em vidro cônico (15 mL) com tampa roscável;
- Rack/estante para tubos de ensaio de 15 mL;
- Frascos em vidro âmbar (50 mL) com tampa para armazenar sedimentos após liofilização e maceração;
- Solventes com grau HPLC: acetonitrila (ACN) e diclorometano (DCM);
- Material certificado de referência: NIST 1941b - "*Organics in marine sediment*";
- Micropipetas com volume ajustável;
- *Vials* em vidro âmbar (2 mL) com tampas e septos em silicone/PTFE.

3. Preparo das amostras

Liofilização

A liofilização tem como objetivo eliminar a água remanescente das amostras sem perdas significativas dos analitos. Primeiramente, espalhar cerca de 50 g das amostras em placas de Petri para aumentar a área superficial dos materiais, cobrir com papel alumínio perfurado e colocar em freezer (-27 °C), por no mínimo 24 h. No dia da liofilização, antes da retirada do freezer, inicializar o equipamento para minimizar o tempo que as amostras irão permanecer em temperatura ambiente. Retirar o papel alumínio e colocar no equipamento, caso seja observada água em estado líquido, repetir o congelamento ou utilizar N_2 líquido para um melhor resultado. Após iniciada a liofilização observar a coloração inicial dos sedimentos e anotar. Como o processo é

empírico, a finalização acontecerá quando o material apresentar coloração uniforme e opaca, tipicamente entre 24 a 72 h. Após o término, triturar os sedimentos com almofariz e pistilo, guardar em vidro âmbar, tampado e manter em freezer.

Extração

Pesar aproximadamente 0,5 g de sedimento é transferir para um tubo de vidro cônico com tampa, juntamente com alíquota de padrão subrogado p-terfenil-D14 em meio de DCM, para proporcionar 50 ng g⁻¹. Deixar em capela de exaustão por 30 min para evaporação completa do solvente e adicionar 5,00 mL de ACN:DCM (1:5, v/v). Sonicar os tubos por 30 min, centrifugar por 10 min (2500 rpm) e verter o sobrenadante para outro tubo. Repetir por mais 2 vezes, combinar os extratos e secar em evaporador rotativo ou fluxo gentil de N₂. Ressuspender em 250 µL de solução de DCM contendo os padrões internos deuterados em concentração de 100 µg L⁻¹. Transferir para *inserts* em vidro e *vial* e proceder as determinações cromatográficas.

Controle de qualidade:

Periodicamente a garantia de qualidade do procedimento será avaliada mediante a ensaios em branco, mediante fortificação e empregando material de referência certificado (NIST 1941b).