



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Moacir Guimarães de Melo

**DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS EM SEDIMENTOS DE IGARAPÉS DE MANAUS
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA
DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Manaus/AM
2018

Moacir Guimarães de Melo

**DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS EM SEDIMENTOS DE IGARAPÉS DE MANAUS
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA
DE MASSAS SEQUENCIAL (LC-MS/MS)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Métodos Analíticos e Estudos Ambientais.

Orientadora: Professora Doutora
Giovana Anceski Bataglion.

Co-orientador: Professor Doutor Afonso
Duarte Leão de Souza.

Manaus/AM
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M528d Melo, Moacir Guimarães de
Determinação de esteróis em sedimentos de igarapés de Manaus utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) / Moacir Guimarães de Melo. 2018 64 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Giovana Anceski Bataglioni
Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Esteróis. 2. Sedimentos. 3. Igarapés de Manaus. 4. Esgoto doméstico. 5. lc-ms/ms. I. Bataglioni, Giovana Anceski II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

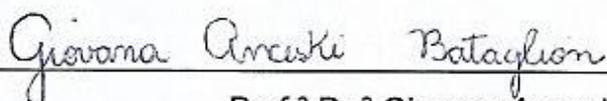
**“DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS EM
SEDIMENTOS DE IGARAPÉS DE MANAUS
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS
SEQUENCIAL (LC-MS/MS)”**

Moacir Guimarães de Melo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 15 de março de 2018.

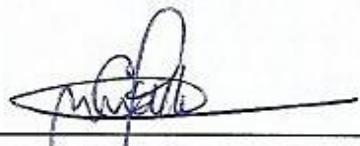
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Giovana Anceski Bataglion
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Souza de Oliveira
Membro UFAM



Prof.^a Dr.^a Claudia Magalhães do Valle
Membro Externo/IFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 15 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dra. Giovana Anceski Bataglioni, pelos ensinamentos transmitidos durante todo o curso de mestrado. Agradeço imensamente pela orientação, compreensão e paciência;

Ao prof. Dr. Hector Koolen pelo apoio principalmente durante as coletas de amostras de sedimentos;

Ao prof. Dr. Afonso Duarte pela co-orientação;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em química da Universidade Federal do Amazonas, pela contribuição para minha formação acadêmica;

À minha família e em especial à minha mãe Edleuza Guimarães, meu maior exemplo de perseverança de vida;

Agradeço a minha companheira de toda vida Martta Suely, que mesmo distante, mostrou que quando o sentimento é verdadeiro o amor não diminui;

Aos colegas de curso, Thiago, Henrique, Paulo, Rafael e Adonilson, agradeço pela amizade e companheirismo;

Agradeço ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM-INPA), pela disponibilidade de uso do LC-MS/MS para a análise das amostras de sedimento;

Ao Laboratório de Pesquisa e ensaios de Combustíveis (LAPEC), pela disponibilidade de laboratórios que auxiliaram no preparo das amostras;

Aos amigos e colegas do LAPEC e ICs da prof^a. Dr^a. Giovana que me ajudaram direta e indiretamente no desenvolvimento do projeto;

As Professoras Dr^{as} Tereza Cristina e Claudia Valle, membros da banca examinadora de defesa, pelo aceite do convite de participação desta dissertação;

À CAPES pela bolsa de estudo.

RESUMO

Com a implantação da Zona Franca de Manaus (AM), a cidade passou por um grande crescimento populacional que não foi acompanhado de investimentos em infraestrutura e controle sobre o uso e ocupação dos solos. Problemas como falta de saneamento, urbanização e habitação cresceram ao longo dos anos, influenciando o meio ambiente. A contaminação de corpos aquáticos pode ser avaliada a partir da matéria orgânica (MO) sedimentar que acumula compostos hidrofóbicos. Neste sentido, os esteróis são bastante úteis como biomarcadores geoquímicos na avaliação das fontes de MO biogênica (terrestre e aquática) e antropogênica (esgoto doméstico). Este trabalho determinou quantitativamente uma série de esteróis em sedimentos de três igarapés de Manaus (Mindu, Quarenta e Tarumã-Açu) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. Os esteróis colesterol, epicoprostanol, coprostanol, colestanol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, brassicasterol, ergosterol e estigmastanol foram selecionados a fim de avaliar as diversas fontes de MO nos igarapés de estudo. A grande maioria das amostras dos igarapés completamente inseridos na área urbana, Mindu e Quarenta, apresentaram coprostanol (esterol fecal) como o esteroide mais abundante com concentrações variando de 523 a 6113 ng.g⁻¹ e de 509 a 12 830 ng.g⁻¹, respectivamente. As concentrações de coprostanol nas amostras do igarapé Tarumã-Açu foram muito menores, variando de < LQ a 142 ng.g⁻¹. Similarmente, as porcentagens de coprostanol variaram de 0 a 7 % (m/m) para as amostras do igarapé Tarumã-Açu, de 21 a 54 % (m/m) para o igarapé do Mindu e de 31 a 50 % (m/m) para o igarapé do Quarenta. Ainda, índices diagnósticos foram calculados a fim de obter uma avaliação mais robusta dos níveis de contaminação nos igarapés de estudo. As razões coprostanol/(coprostanol + colestanol), coprostanol/colesterol e coprostanol/epicoprostanol corroboram os resultados relatados acima e indicam uma intensa entrada de esgoto doméstico não tratado nos igarapés Mindu e Quarenta. Os índices diagnósticos associados às concentrações indicam que o igarapé Tarumã-Açu é muito menos submetido ao aporte de esgoto doméstico, mas já mostra sinais de contaminação moderada em alguns pontos. Os resultados obtidos neste estudo podem ser utilizados como valores base para a tomada de decisões acerca de políticas públicas de saneamento básico e para o monitoramento da qualidade de sedimentos dos corpos aquáticos de Manaus.

ABSTRACT

With the implementation of the Zona Franca de Manaus (AM), the city underwent a great population growth that was not accompanied by investments in infrastructure and control over land use and occupation. Problems such as lack of sanitation, urbanization and housing have grown over the years, influencing the environment. Contamination of aquatic environments can be evaluated from the sedimentary organic matter (OM) that accumulates hydrophobic compounds. In this sense, the sterols are very useful as geochemical biomarkers in the evaluation of the sources of biogenic OM (terrestrial and aquatic) and anthropogenic (domestic sewage). This work quantitatively determined a series of sterols in sediments from three streams of Manaus (Mindu, Quarenta and Tarumã-Açu) by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry. Cholesterol, epicoprostanol, coprostanol, cholestanol, campesterol, β -sitosterol, stigmasterol, brassicasterol, ergosterol and stigmastanol were selected in order to evaluate the various sources of OM in the streams. Most samples from urban streams, Mindu and Quarenta, presented coprostanol (fecal sterol) as the most abundant sterol with concentrations ranging from 523 to 6113 ng.g^{-1} and from 509 to 12 830 ng.g^{-1} , respectively. Coprostanol concentrations in the Tarumã-Açu streams samples were much lower, ranging from <LQ to 142 ng.g^{-1} . Similarly, the percentages of coprostanol ranged from 0 to 7% (m / m) for the Tarumã-Açu stream samples, from 21 to 54% (m / m) for the Mindu streams and from 31 to 50% m) for the Quarenta stream. Furthermore, diagnostic indices were calculated in order to obtain a more robust evaluation of the levels of contamination in the study streams. Coprostanol / (coprostanol + cholestanol), coprostanol / cholesterol and coprostanol / epicoprostanol ratios corroborates the results reported above and indicate an intense inflow of untreated domestic sewage in the Mindu and Quarenta streams.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: O Igarapé do Quarenta possui muitas moradias precárias ao longo de sua extensão, onde o esgoto doméstico é diretamente despejado sem tratamento..... 3
- FIGURA 2: O esquema mostra a entrada de compostos em sedimentos produzidos por organismos terrestres circundantes (ex: plantas) e por organismos aquáticos (ex: algas)..... 5
- FIGURA 3: Rotas de degradação do colesterol..... 8
- FIGURA 4: Comparação das concentrações de coprostanol em fezes de diferentes animais. Adaptado de LEEMING et al., (1996)..... 9
- FIGURA 5: Reação de derivatização do colesterol através da substituição do hidrogênio da hidroxila (-OH) pelo grupo trimetil-silícico (-Si(CH₃)₃) do reagentes N,O-bis(trimetil-silil-trifluor-acetamida)/trimetil-cloro-silano (9:1) (BSTFA/TCMS)..... 11
- FIGURA 6: Esquema básico de um equipamento de LC-MS/MS que consiste em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*)..... 13
- FIGURA 7: Esquema básico de uma fonte de APCI e as espécies envolvidas no processo de ionização, considerando N₂ como gás nebulizador e água como solvente constituinte da fase móvel..... 14
- FIGURA 8: Esquema básico de um analisador do tipo quadrupolo..... 15
- FIGURA 9: Delimitação das bacias hidrográficas na cidade de Manaus. Outras pequenas bacias configuram-se como rias fluviais com regime de cheias e vazantes condicionado pelo Rio Negro, rio que banha a cidade. Adaptado de ALBUQUERQUE, 2012..... 17
- FIGURA 10: Área de estudo e pontos de amostragem nos igarapés do Quarenta (Q), Mindu (M) e Tarumã-Açu..... 18
- FIGURA 11: Coleta, armazenamento em freezer, liofilização e maceração das amostras de sedimentos..... 20
- FIGURA 12: Representação do processo de extração de compostos orgânicos das amostras de sedimento..... 21
- FIGURA 13: Proporção relativa de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé do Mindu..... 28

FIGURA 14: Proporção relativa de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé do Quarenta.....	32
FIGURA 15: Proporções relativas de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé Tarumã-Açu.....	36
FIGURA 16: Gráfico de dispersão tridimensional construído com base nos índices coprostanol / (coprostanol + colestanol), coprostanol/colesterol e epicoprostanol/coprostanol.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em geoquímica orgânica.....	6
TABELA 2: Vantagens e desvantagens das técnicas LC–MS/MS, GC–MS e GC–FID, comumente utilizadas para a determinação de esteróis.....	12
TABELA 3: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta dos igarapés do Quarenta, Mindu e Tarumã-Açu.....	18
TABELA 4: Transições SRM de cada analito e parâmetros do espectrômetro de massas.....	23
TABELA 5: Parâmetros das curvas de calibração obtidos para todos os analitos....	24
TABELA 6: Parâmetros analíticos do método (linearidade, LD e LQ).....	27
TABELA 7: Concentrações (ng g^{-1}) de esteróis em amostras de sedimentos do Igarapé do Mindu.....	24
TABELA 8: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé do Mindu.....	29
TABELA 9: Concentrações (ng g^{-1}) de esteróis em amostras de sedimentos do Igarapé do Quarenta.....	31
TABELA 10: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé do Quarenta.....	33
TABELA 11: Concentrações (ng g^{-1}) de esteróis em amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu.....	35
TABELA 12: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu.....	37
TABELA 13: Comparação dos níveis de coprostanol em amostras de sedimentos de diversos ambientes.....	40

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

- APCI- Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*);
- BSTFA/TCMS- N,O-bis(trimetil-silil-trifluor-acetamida) / trimetil-cloro silano;
- Cop- Coprostanol;
- E- cop- Epicoprostanol;
- GC- FID- Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (do inglês *gas chromatography – flame ionization detector*).
- GC-MS- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês *gas chromatography - mass spectrometry*)
- LC-MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês *liquid chromatography - mass spectrometry*)
- LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*);
- LD- Limite de detecção;
- LQ- Limite de quantificação;
- m/z - Razão massa-carga;
- MO- Matéria orgânica;
- MS- Espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*);
- PI- Padrão interno;
- Q- Quadrupolo;
- s- Desvio padrão da equação da reta de regressão linear;
- S- Coeficiente angular da curva de calibração;
- SEMSA- Secretaria Municipal de Saúde;

- SIM- Sistema de Informação sobre Mortalidade;
- SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação;
- SRM- Monitoramento de reação selecionada (do inglês *selected reaction monitoring*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Recursos hídricos amazônicos	2
1.1.1 Contaminação dos igarapés de Manaus	2
1.2 Matéria Orgânica Sedimentar	4
1.3 Biomarcadores geoquímicos	4
1.3.1 Esteróis como biomarcadores geoquímicos	6
1.4 Técnicas analíticas para a determinação de esteróis	10
1.4.1 Fundamentos da técnica de LC–MS/MS	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Área de estudo e amostragem	17
3.2 Coleta das amostras de sedimento	19
3.3 Preparo das amostras de sedimento	20
3.3.1 Ativação do cobre.....	20
3.3.2 Extração de esteróis dos sedimentos	21
3.3.3 Fracionamento do extrato	22
3.4 Determinação de esteróis por LC–MS/MS.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Parâmetros analíticos.....	24
4.2 Igarapé do Mindu	25
4.3 Igarapé do Quarenta	29
4.4 Igarapé Tarumã-Açu	33
4.5 Comparação entre os igarapés de estudo e com outros ambientes	38
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de recursos hídricos por compostos orgânicos e metais tem crescido a cada ano em todo o mundo devido ao aumento da industrialização, crescimento populacional e da constante exploração dos recursos naturais (PINTO et al. 2009). Na Amazônia, a contaminação dos recursos hídricos é particularmente importante e preocupante tendo em vista que possui a maior bacia hidrográfica e um quinto da água doce do mundo (HANSEN et al., 2013).

A capital do estado do Amazonas, Manaus, está localizada no coração da floresta amazônica e representa um risco para os recursos hídricos amazônicos. Manaus passou por um grande crescimento populacional devido à implantação do modelo de industrialização da Zona Franca na década de sessenta. Com isso, problemas relacionados à urbanização, habitação e, conseqüentemente, saneamento básico, foram crescendo ao longo dos anos. Um exemplo bem notável dessa problemática é o elevado número de pessoas instaladas nas margens dos igarapés da cidade, os quais se tornaram contaminados em grande parte devido ao descarte de esgoto doméstico (NOGUEIRA, 2007). Embora a contaminação dos igarapés seja localmente reconhecida, existe um número muito limitado de trabalhos científicos que revelem quais são os contaminantes e os respectivos níveis em águas e sedimentos destes corpos aquáticos.

A contaminação dos igarapés pode ser avaliada a partir da matéria orgânica (MO) sedimentar, uma vez que compostos hidrofóbicos adsorvem em partículas de argilossilicatos e, então, sedimentam no ambiente aquático (WISNIESKI et al, 2016). Tais contaminantes são resistentes às alterações químicas e biológicas e comumente denominados marcadores antropogênicos (TOLOSA et al, 2014; VOLKMAN, 2003). Os esteróis representam uma classe de compostos hidrofóbicos de ampla distribuição, sendo bastante utilizados como biomarcadores geoquímicos na avaliação das fontes de MO, incluindo aquelas biogênicas (aquáticas e terrestres) e antropogênicas (esgoto doméstico). A fim de obter uma caracterização ampla da MO e a contribuição relativa de fontes biogênicas e antropogênicas, uma série de esteróis tem sido determinada por técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida e gasosa, acopladas a espectrometria de massas (ENGEL & MACKO, 2013).

1.1 Recursos hídricos amazônicos

A primeira percepção que se tem de ecossistemas aquáticos da Amazônia é a de preservação devido à extensa área verde do território amazônico que predomina sobre a área urbana. No entanto, a ocupação urbana de forma irregular ao longo das bacias hidrográficas e a deficiência de saneamento básico, principalmente nas grandes cidades, contribuem para a contaminação dos recursos hídricos da região amazônica (GOMES, 2015).

A bacia amazônica compreende a maior floresta tropical do mundo, apresentando 40 % das florestas, 40 % de todas as espécies existentes e 15-20 % da água doce do mundo (HANSEN et al., 2013). Os recursos hídricos da Amazônia são importantes, pois afetam todos os ecossistemas e qualquer alteração hidrológica nessa região ocasionará potenciais impactos sociais e ambientais (VAL et al., 2017).

Os corpos aquáticos, os recursos naturais e as comunidades ribeirinhas da Amazônia estão cada vez mais em risco devido às alterações hidrológicas, as quais podem ser ocasionadas por vários fatores, como a expansão da agricultura, construções de represas, desmatamento, exploração de minerais e ocupação urbana sem planejamento (HANSEN et al., 2013; ALHO, 2015).

Os efeitos de tais alterações puderam ser observados ao longo dos últimos anos durante a estação chuvosa, onde muitas cidades sofreram com fortes inundações. Em 2012, por exemplo, o Rio Negro atingiu seu nível mais alto em 110 anos, submergindo em áreas residenciais e comerciais de Manaus. Nesse mesmo período, Manaus registrou uma elevação dos casos de gastroenterite devido ao contato das pessoas com a água contaminada das inundações próximas aos igarapés (VIEIRA, 2016; VIEIRA, 2017).

1.1.1 Contaminação dos igarapés de Manaus

Manaus está localizada dentro da grande bacia hidrográfica da Amazônia, onde se encontram centenas de pequenos cursos d'água denominados igarapés. Os igarapés que cortam a área urbana de Manaus estão visivelmente poluídos, apresentando grande quantidade de lixo e mau cheiro. Muitas pessoas residem às margens destes igarapés, estando expostas aos riscos à saúde e vulneráveis a

constantes alagamentos e inundações. A Figura 1 mostra o Igarapé do Quarenta recebendo esgoto doméstico de moradias precárias ao longo de sua margem.



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 1: O Igarapé do Quarenta possui muitas moradias precárias ao longo de sua extensão, onde o esgoto doméstico é diretamente despejado sem tratamento.

Para Teixeira e Guilhermino (2006), casos de mortalidade infantil, diarreia aguda e doenças infecciosas e parasitárias poderiam ser reduzidos por meio da ampliação das redes de abastecimento de água tratada e implantação de sistemas de coleta e tratamento de esgoto sanitário para toda a população, inclusive àquelas que vivem as margens de igarapés.

Estudos descritivos levantados por Jesus et al. (2012) com base na análise de dados da Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA), do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) revelaram que entre 2000 e 2010 foram notificados em Manaus 665 casos de leptospirose, dos quais 339 foram confirmados e 35 evoluíram para óbito. O maior número de casos ocorreu entre os meses de maio e abril, período de intensas chuvas e aumento do nível dos rios e igarapés. Observou-se, ainda, que a maior ocorrência da doença foi em áreas de maior precariedade socioambiental, onde habitam pessoas com baixa escolaridade e renda em moradias precárias sem saneamento básico.

A contaminação dos igarapés pode ser avaliada em estudos geoquímicos, os quais revelam a composição química da MO e, então, permitem avaliar os níveis compostos contaminantes e os riscos ao ambiente e aos seres vivos (GUEDES, 2012). A exposição de agentes contaminantes ocasionado pelo despejo de esgoto doméstico não tratado nos igarapés de Manaus pode levar a propagação de

doenças que afetam principalmente a população de baixa renda que residem em áreas altamente poluídas.

1.2 Matéria Orgânica Sedimentar

A composição mineralógica, química e biológica das camadas de sedimentos permite o estudo da evolução histórica dos ecossistemas aquáticos e dos ecossistemas terrestres adjacentes, assim como o tipo e a intensidade dos impactos sofridos no passado e/ou no presente (GUEDES, 2012).

A determinação de contaminantes químicos em ambientes aquáticos se dá em amostras de água ou sedimentos. Compostos orgânicos hidrofóbicos tendem a adsorver em partículas de argila e outros minerais que com o tempo sedimentam, resultando na MO sedimentar (KILLOPS & KILLOPS, 2005). Assim, quando se trata de compostos orgânicos hidrofóbicos, a análise de sedimentos é preferível à água (CAMILLERI & VULLIET, 2015).

O intemperismo é uma das grandes dificuldades na avaliação ambiental através de compostos orgânicos, no entanto, algumas classes de compostos são mais resistentes ao intemperismo e, portanto, são consideradas mais confiáveis como indicadores das fontes de MO (LU & MEYERS, 2009). Os compostos dissolvidos na coluna d'água ou nos estágios iniciais de sedimentação sob condições de temperatura e pressão relativamente baixas podem sofrer processos que alteram a estrutura química, etapa denominada diagênese (KILLOPS & KILLOPS, 2005). Alguns compostos permanecem preservados durante a diagênese e por apresentarem estrutura química ligada intrinsecamente a um precursor biológico são úteis como biomarcadores geoquímicos. Outros termos como fósseis químicos, marcadores moleculares ou indicadores orgânicos são utilizados no mesmo sentido (SIMONEIT, 2004).

1.3 Biomarcadores geoquímicos

Por meio de biomarcadores geoquímicos, é possível obter importantes informações a respeito do ambiente, dos organismos, do tempo de deposição e da degradação da MO, assim como as alterações ambientais ocorridas no passado

(RAU et al., 2013). Nos sedimentos é possível encontrar compostos que são sintetizados por organismos aquáticos (MO autóctone) e compostos que são introduzidos através da entrada terrestre (MO alóctone) do ambiente circundante (CARREIRA et al., 2011). A Figura 2 ilustra as possíveis fontes de MO em um ambiente aquático.

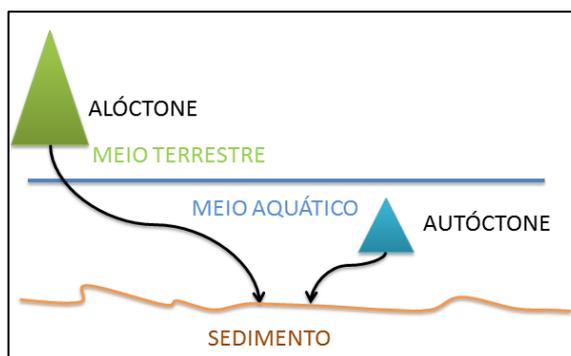


Figura 2: O esquema mostra a entrada de compostos em sedimentos produzidos por organismos terrestres circundantes (ex: plantas) e por organismos aquáticos (ex: algas).

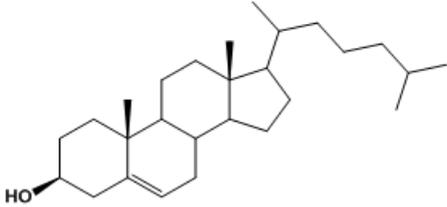
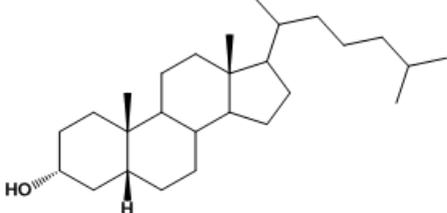
A MO sedimentar de origem autóctone (fitoplâncton, zooplâncton, bactérias, fungos e plantas aquáticas) e alóctone (plantas superiores) é classificada como biogênica (KILLOPS & KILLOPS, 2005). Além destas fontes, a MO alóctone também pode ter origem antropogênica, como atividades industriais, queimadas, emissões de veículos, derramamento de petróleo e derivados e esgoto doméstico (FRENA, 2016). Compostos provenientes de tais fontes são comumente denominados marcadores antropogênicos (HARWOOD, 2014). A partir da caracterização da MO sedimentar é possível avaliar as contribuições relativas das fontes autóctones e alóctones (CARREIRA et al., 2011).

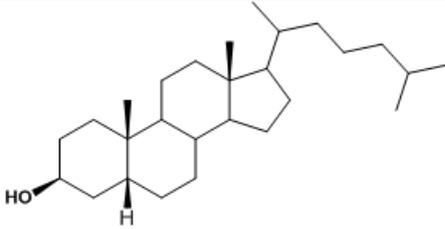
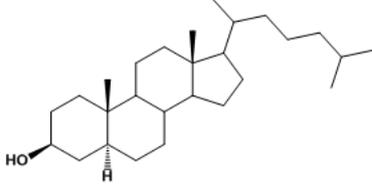
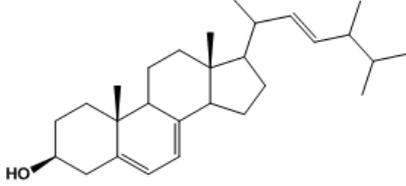
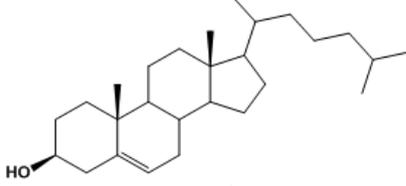
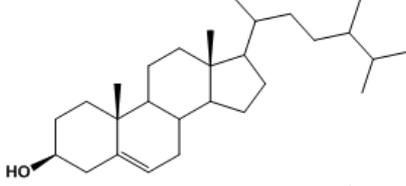
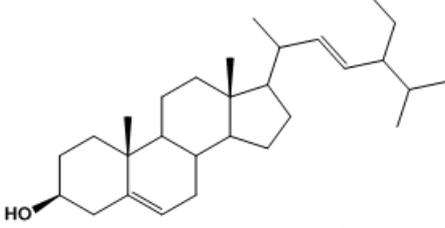
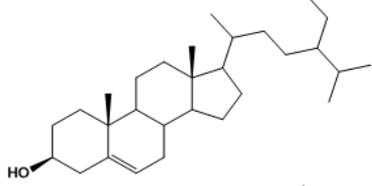
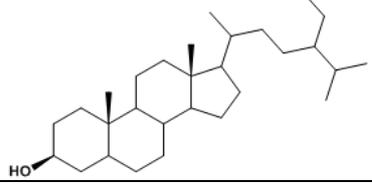
Vários estudos aplicam abordagens baseadas em biomarcadores geoquímicos a fim de avaliar os níveis de contaminação de rios, estuários, oceanos e outros corpos aquáticos (CARREIRA et al., 2011; SOJINU et al., 2012; MARTIN et al., 2012). A caracterização de biomarcadores geoquímicos em sedimentos pode auxiliar na implementação de ações que visem prevenir, ou mesmo eliminar, a liberação de compostos prejudiciais aos seres humanos e à biota local, minimizando o impacto ambiental.

1.3.1 Esteróis como biomarcadores geoquímicos

Os esteróis são compostos presentes em todos os organismos com células eucarióticas (VOLKMAN, 2003). Os esteróis representam uma classe de compostos hidrofóbicos (lipídicos) que podem ser incorporados em sedimentos aquáticos (LEEMING et al., 1996). Devido à especificidade e resistência a diagênese, os esteróis são bastante úteis como biomarcadores geoquímicos (LEEMING et al., 1996; VOLKMAN, 2003; MARTINS et al., 2012; ABREU-MOTA et al., 2013). Os principais esteróis encontrados em plantas são campesterol, β -sitosterol e estigmasterol, enquanto colesterol e brassicasterol são os principais esteróis indicativos de fontes aquáticas (ABREU-MOTA et al., 2014). As distribuições de esteróis em microalgas variam de acordo com a espécie, no entanto, frequentemente o colesterol é o esteroide predominante. Similarmente, diatomáceas apresentam o brassicasterol como um dos principais esteróis (VOLKMAN, 2003). Coprostanol (cop) e epicoprostanol (e-cop) são esteróis fecais muito utilizados como marcadores antropogênicos de esgoto doméstico (MARTINS et al., 2012; BUJAGIC et al 2016). A Tabela 1 apresenta a fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em geoquímica orgânica.

Tabela 1: Fórmula molecular, massa molecular, principais fontes e estrutura química dos esteróis mais comumente utilizados em geoquímica orgânica.

composto	fórmula molecular	massa molecular	principais fontes	Estrutura Química
colesterol	$C_{27}H_{46}O$	386	zooplâncton/ fitoplâncton	
epicoprostanol	$C_{27}H_{48}O$	388	esgoto tratado	

coprostanol	$C_{27}H_{48}O$	388	esgoto sem tratamento	
colestanol	$C_{27}H_{48}O$	388	zooplâncton/ fitoplâncton/ degradação	
ergosterol	$C_{28}H_{44}O$	396	Fungos	
brassicasterol	$C_{28}H_{46}O$	398	zooplâncton/ fitoplâncton/	
campesterol	$C_{28}H_{48}O$	400	plantas superiores	
stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	412	plantas superiores	
β -sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	414	plantas superiores	
estigmastanol	$C_{29}H_{52}O$	416	plantas superiores/ degradação	

O coprostanol é o principal esteroide fecal humano e representa entre 40 e 60% dos esteróis totais encontrados nas fezes humanas (LEEMING et al., 1996). Este esteroide é formado a partir da redução microbiana de colesterol no intestino de

mamíferos e, então, eliminado pelas fezes (GRIMALT et al., 1990). Epicoprostanol é um isômero do coprostanol utilizado como um indicador do grau de tratamento de esgoto, uma vez que ele é formado durante a etapa de digestão anaeróbica (MARTINS et al., 2012; TOLOSA et al., 2014). Outra fonte minoritária de coprostanol é a produção in situ devido à degradação diagenética em sedimentos anóxicos (TOLOSA et al., 2014). A Figura 3 ilustra as possíveis rotas de degradação do colesterol.

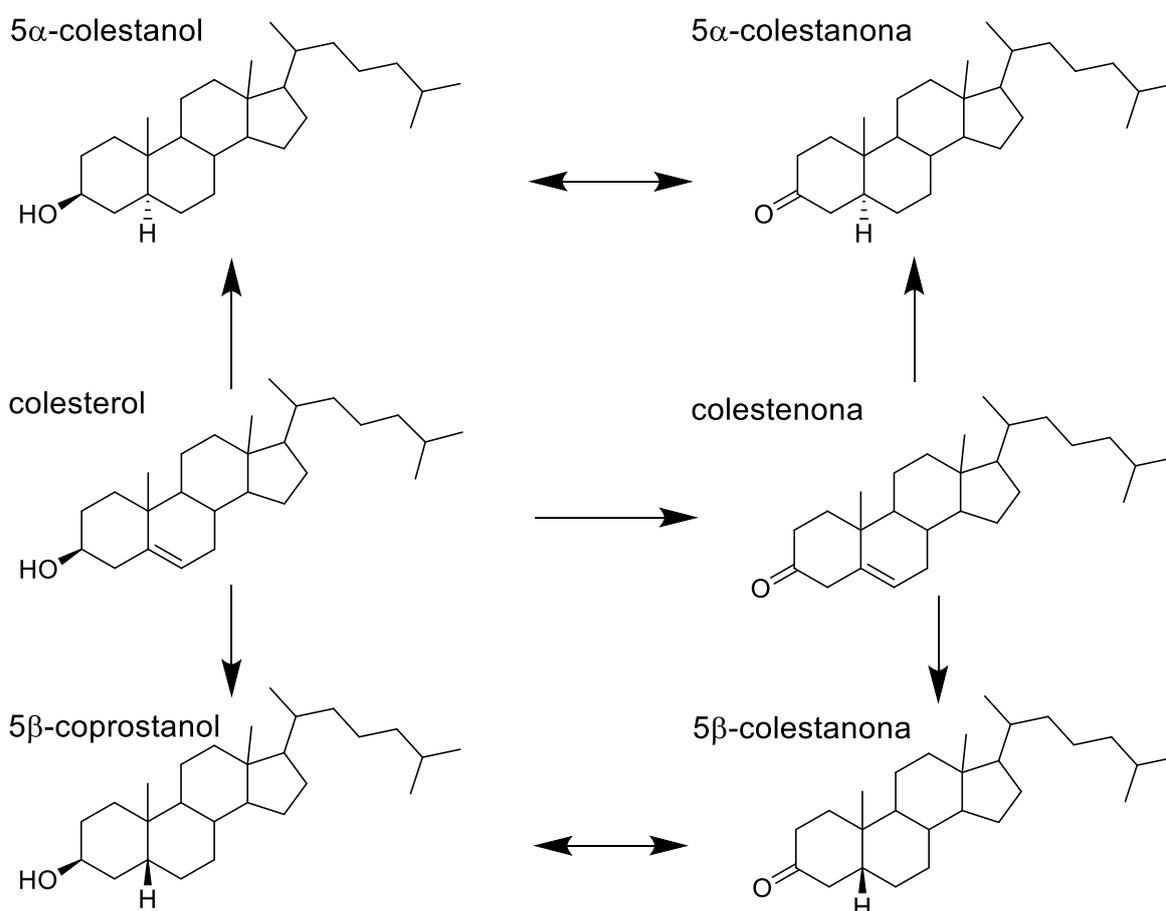


Figura 3: Rotas de degradação do colesterol. Adaptado de GRIMALT (1990)

Considerando que a maior fonte de coprostanol no ambiente é decorrente da presença de fezes e que todos os mamíferos podem contribuir para a sua concentração, alguns estudos têm se focado em revelar a composição de esteróis em diferentes animais (LEEMING et al., 1996; ZOCATELLI et al., 2017). Gatos e porcos, por exemplo, possuem perfis de esteróis fecais semelhantes ao do homem,

porém a concentração de coprostanol nas fezes de seres humanos é cerca de 10 vezes maior (LEEMING et al., 1996). A Figura 4 compara as concentrações de coprostanol presente nas fezes de diferentes animais.

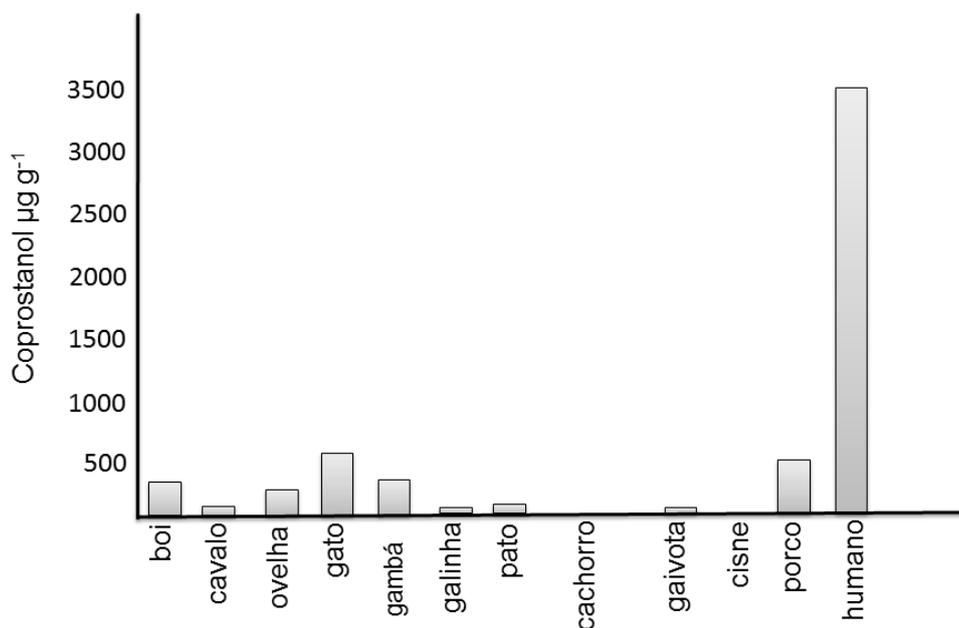


Figura 4: Comparação das concentrações de coprostanol em fezes de diferentes animais. Adaptado de LEEMING et al., (1996).

A Figura 4 revela que a concentração de coprostanol é muito maior nas fezes de seres humanos que em outros animais (LEEMING et al., 1996). Desta forma, na ausência de fontes potenciais de coprostanol a partir de fezes de animais, como pecuária e suinocultura, a sua presença em corpos aquáticos pode ser confiavelmente atribuída a fezes humanas. Os perfis de esteróis das fezes de seres humanos e de outros animais são suficientemente distintos para diagnosticar a origem da contaminação fecal de corpos aquáticos (LEEMING et al., 1996; ZOCATELLI et. al., 2017). Nesse sentido, a determinação de uma série de esteróis proporciona informações mais consistentes e reveladoras sobre as fontes de MO de um ambiente (BIRK et al., 2012).

Embora não exista um consenso em relação à concentração de coprostanol em sedimentos que indique com certeza contaminação por esgoto doméstico, o valor de 10 ng g⁻¹ tem sido utilizado como um valor base para ambientes preservados. Vários estudos têm considerado a concentração de coprostanol acima de 100 ng g⁻¹ como

indicativo de contaminação por esgoto. Ainda, valores acima de 500 ng g⁻¹ têm sido relacionados a um acentuado aporte de esgoto doméstico.

A fim de realizar uma avaliação com maior confiabilidade e minimizar a ambiguidade de fontes, diversos índices diagnósticos têm sido utilizados para corroborar as concentrações absolutas de coprostanol (MARTINS et al., 2014). A percentagem de coprostanol em relação ao somatório de esteróis indica a contribuição relativa de esgoto doméstico diante de fontes biogênicas, como plantas terrestres e organismos aquáticos para a MO sedimentar. Venkatesan e Santiago (1989) propuseram o índice e-cop/cop para avaliar o grau de tratamento do esgoto despejado nos corpos aquáticos. A relação entre os isômeros fecal e natural, cop/(cop + colestanol), também é muito utilizada, onde valores > 0,7 são indicativos de contaminação e valores < 0,3 são indicativos de ambientes preservados (RESENDE et al., 2014; TOLOSA, et al., 2014; GRIMALT et al., 1990). Valores intermediários são algumas vezes considerados duvidosos, embora alguns autores considerem o intervalo 0,3 – 0,7 como indicativo de contaminação moderada. O índice cop/colestanol também pode ser utilizado no mesmo sentido, sendo os valores > 0,2 indicativos de contaminação por esgoto doméstico (BATAGLION et al., 2016; RESENDE et al., 2014). Outro índice frequentemente utilizado é cop/colesterol, o qual revela a relação entre o coprostanol e seu precursor colesterol. Valores maiores que 0,2 são indicativos de MO de origem antropogênica (BUJAGIC et al 2016).

1.4 Técnicas analíticas para a determinação de esteróis

A composição da MO sedimentar é complexa (BATAGLION, 2015) e sua caracterização pode abranger uma variedade de técnicas, dependendo dos compostos de interesse (KAWAKAMI & MONTONE, 2002). A metodologia clássica empregada em geoquímica orgânica é baseada em uma primeira etapa de extração lipídica que fornece uma série de compostos orgânicos, como: alcanos (lineares, ramificados e cíclicos), alcenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, terpenos, hopanos, esteranos, compostos orgânicos sulfurados, álcoois graxos, ácidos graxos saturados e insaturados, alquenonas e esteróis (ENGEL & MACKO, 2013; AMANN et al., 2014; WISNIESKI et al., 2016). Após a obtenção de um extrato orgânico bruto,

uma etapa de fracionamento em coluna utilizando sílica como fase estacionária é bastante comum nos trabalhos de geoquímica orgânica a fim de obter frações de menor complexidade química contendo classes específicas de compostos. Por fim, as frações contendo certas classes de compostos podem ser prontamente analisadas por cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), enquanto que aquelas contendo classes de compostos mais polares, como esteróis, são previamente submetidas a uma etapa de derivatização.

A técnica de GC empregando a detecção por ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*) ou acoplada à espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tem sido utilizada na caracterização de biomarcadores geoquímicos desde 1960 (SIMONEIT, 2005; COOCKS et al., 2015). Embora a determinação direta de esteróis seja dificultada devido à baixa volatilidade, GC-MS ainda é a técnica mais utilizada na determinação e quantificação destes compostos. Um recurso muito utilizado para aumentar a volatilidade dos esteróis é a derivatização que os converte a ésteres trimetil-silícicos, conforme ilustrado na Figura 5 (SIMONEIT, 2005).

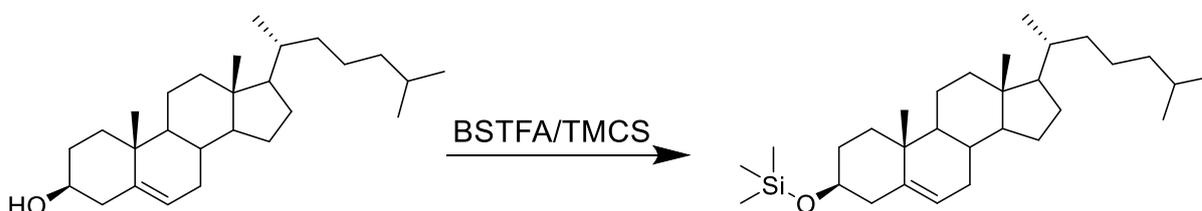


Figura 5: Reação de derivatização do colesterol através da substituição do hidrogênio da hidroxila (-OH) pelo grupo trimetil-silícico (-Si(CH₃)₃) do reagentes N,O-bis(trimetil-silil-trifluor-acetamida)/trimetil-cloro-silano (9:1) (BSTFA/TCMS).

Com o surgimento do acoplamento da técnica de cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) com MS, uma nova possibilidade de determinação de esteróis com várias vantagens em relação às técnicas de GC-FID e GC-MS ganhou atenção na área de geoquímica orgânica (BATAGLION et al., 2015). A Tabela 2 resume as vantagens e desvantagens das técnicas normalmente aplicadas para a determinação de esteróis em amostras ambientais (BATAGLION et al., 2015; BATAGLION et al., 2016).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens das técnicas LC–MS/MS, GC–MS e GC–FID, comumente utilizadas para a determinação de esteróis.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Não requer fracionamento do extrato bruto • Alta sensibilidade • Alta seletividade • Análises relativamente mais rápidas • Menores limites de detecção e quantificação • Não necessita de derivatização 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior custo • Fragmentação limitada
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Alto poder de resolução • Alta sensibilidade, mas geralmente menor que em LC–MS/MS • Alta seletividade, mas menor que em LC–MS/MS 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitada a compostos voláteis (ou semivoláteis) e termicamente estáveis • Análises relativamente demoradas • Necessita de derivatização para certos compostos, como esteróis
GC-FID	<ul style="list-style-type: none"> • Ampla faixa linear de resposta 	<ul style="list-style-type: none"> • Atribuição baseia-se apenas nos tempos de retenção • Baixa seletividade • Limitada a compostos voláteis (ou semivoláteis) e termicamente estáveis • Análises relativamente demoradas • Necessita de derivatização para certos compostos, como esteróis • Baixa resolução para amostras complexas

Tabela elaborada pelo autor com base em SIMONEIT, 2005; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; BATAGLION, et al., 2015.

A técnica de LC–MS/MS tem sido bastante empregada na determinação de esteróis em diferentes matrizes, como óleos comestíveis e plasma (LEMBCKE et al 2005; MO et al., 2013). Entretanto, seu emprego na determinação de esteróis em matrizes ambientais, como água e sedimento é mais recente e relatado em poucos estudos (BATAGLION et al., 2015; BATAGLION, et al., 2016; FRENA et al., 2016). Um método desenvolvido recentemente é capaz de determinar dez esteróis de interesse na área de geoquímica orgânica em dez minutos, sem necessidade de derivatização, oferecendo recuperação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) satisfatórios (BATAGLION et al., 2015).

1.4.1 Fundamentos da técnica de LC–MS/MS

A técnica de LC–MS/MS mais utilizada em estudos quantitativos consiste no acoplamento da cromatografia líquida com um espectrômetro do tipo triplo

quadropolo (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Um esquema ilustrando um equipamento típico de LC-MS/MS é apresentado na Figura 6.

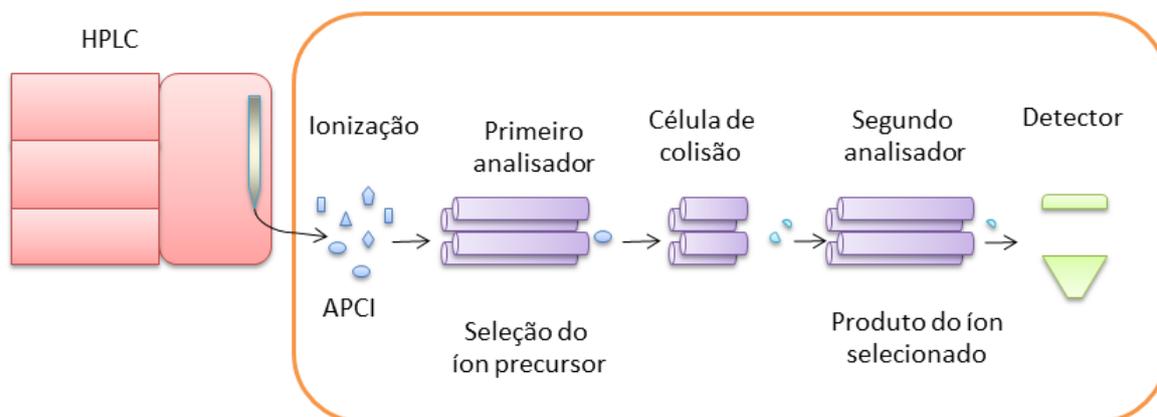


Figura 6: Esquema básico de um equipamento de LC-MS/MS que consiste em um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*).

Durante uma análise por LC-MS/MS, primeiramente ocorre a separação cromatográfica, onde os compostos são separados de acordo com o grau de interação entre a fase móvel e a fase estacionária. Após a separação cromatográfica, os compostos são ionizados em modo positivo ou negativo de ionização em uma fonte de ionização adequada. Na sequência, os íons formados são levados ao primeiro analisador de massas que selecionará apenas o íon precursor do analito de interesse de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). O íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo sofre colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente N_2) em uma célula de colisão e, então, adquire parte desta energia e fragmenta-se aos íons produtos. Estes íons produtos são, então, direcionados ao segundo analisador de massas, onde apenas os íons de interesse serão selecionados de acordo com as suas m/z . Esta forma de análise em espectrometria de massas, onde monitora-se a fragmentação de um íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo ao seu correspondente íon produto selecionado no terceiro quadrupolo, é denominada monitoramento de reação selecionada (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). A determinação de um número maior de compostos pode ser realizada monitorando a fragmentação de vários íons precursores aos seus respectivos íons produtos (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Na técnica de APCI, a ionização se dá por reações íon-molécula em fase gasosa sob pressão atmosférica. A descarga corona produz N_2^+ a partir do gás de nebulização, normalmente nitrogênio. Esses íons primários colidem com moléculas do solvente vaporizadas para formar íons secundários reativos em fase gasosa, os quais por sua vez irão reagir com as moléculas do analito (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). A Figura 7 mostra um esquema de uma fonte de APCI e as espécies envolvidas no processo de ionização.

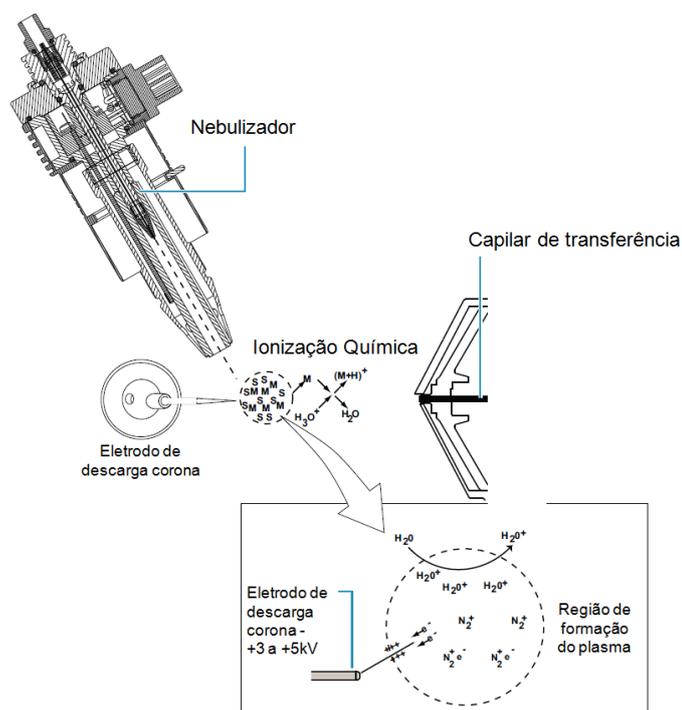


Figura 7: Esquema básico de uma fonte de APCI e as espécies envolvidas no processo de ionização, considerando N_2 como gás nebulizador e água como solvente constituinte da fase móvel. Extraído de <<http://www.iq.unesp.br>>. Acessado em 15 de janeiro de 2018.

A técnica de APCI é adequada tanto para compostos polares como para compostos de baixa polaridade com massa molecular de até 1500 Da (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Como os esteróis são compostos hidrofóbicos pouco polares e de baixa massa molecular, a técnica de APCI tem apresentado bons resultados em estudos de diversas áreas (LEMBCKE et al 2005).

O analisador do tipo quadrupolo consiste basicamente em quatro barras paralelas que permitem apenas a passagem uma determinada m/z que tenha uma trajetória estável para um determinado conjunto de parâmetros. A Figura 8 mostra um esquema de um analisador quadrupolo.

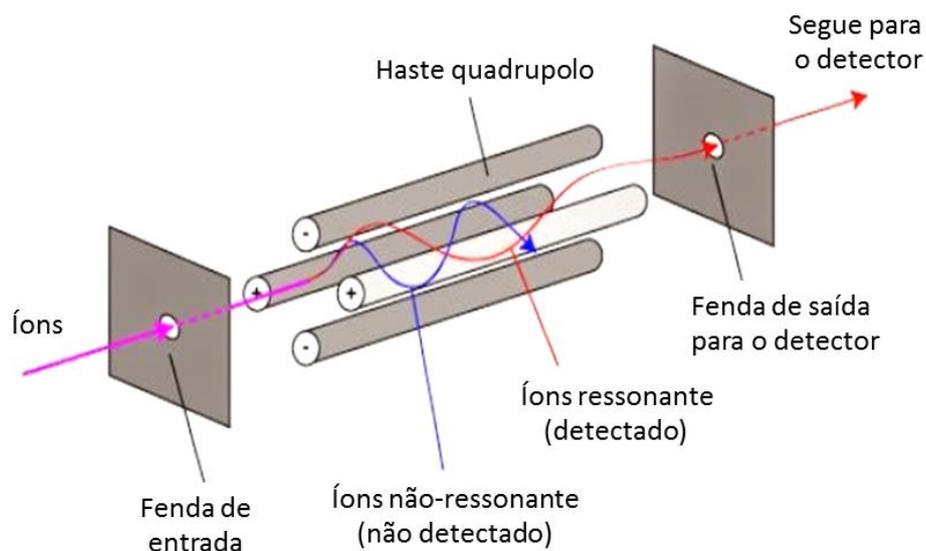


Figura 8: Esquema básico de um analisador do tipo quadrupolo. Extraído e adaptado de BUSTILLOS et al 2003.

O analisador consiste em quatro hastes metálicas paralelas, nos quais se aplicam uma voltagem alternada e uma voltagem contínua. A voltagem contínua oscila alternadamente para cada par de hastes, ou seja, enquanto um par oscila em polaridade negativa, o outro par oscila com polaridade positiva (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Observe na Figura 8 que apenas um íon (cor vermelha) apresenta trajetória estável para alcançar a fenda de saída e seguir para o detector. O outro íon (cor azul) não apresenta trajetória estável para este conjunto de voltagens e bate na haste metálica, não sendo assim detectado. O analisador quadruplo é submetido a variações sequenciais dos potenciais de forma a detectar todos os íons de interesse. O quadrupolo pode ser operado no modo de varredura, no qual os íons de uma determinada faixa de m/z são sequencialmente selecionados, ou no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *selected ion monitoring*), no qual apenas m/z pré-estabelecidas são monitoradas. O analisador quadrupolo é muito utilizado no modo SIM em estudos quantitativos, pois a sua eficiência aumenta e menores LD e LQ são alcançados. Na prática, em modo SRM, o primeiro e o segundo analisador de massas do triplo quadrupolo operam em modo SIM (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de contaminação dos igarapés de Manaus por meio de esteróis biomarcadores.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações dos esteróis colesterol, epicoprostanol, coprostanol, colestanol, brassicasterol, ergosterol, campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e estigmastanol em amostras de sedimentos dos igarapés do Mindu, Quarenta e Tarumã-Açu;
- Avaliar a distribuição dos esteróis e inferir as fontes contribuintes para a MO sedimentar em cada um dos igarapés de estudo;
- Calcular razões diagnósticas para auxiliar na avaliação da contaminação dos igarapés por esgoto doméstico;
- Comparar os possíveis níveis de contaminação por esgoto doméstico entre os igarapés;
- Comparar os resultados obtidos com aqueles observados em outros ambientes contaminados e preservados ao redor do mundo e caracterizar os igarapés da cidade em relação ao grau de contaminação por esgoto doméstico;
- Aumentar o conhecimento em relação aos igarapés de Manaus e ajudar em pesquisas futuras relacionadas à políticas ambientais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e amostragem

O município de Manaus (AM), localizado na Amazônia Central, ocupa uma área de 11.458,5 km², da qual apenas 3,9% é urbana (MARQUES & PINHEIRO, 2011). Manaus é cercada por uma densa rede hidrográfica (Figura 9) composta por nove bacias na qual se destacam cinco: Puraquequara que está inteiramente inserida na área de floresta, Tarumã que está parcialmente inserida na área urbana e as bacias do Educandos, Mindu e Colônia Antônio Aleixo, as quais estão inseridas totalmente na área urbana (LA ROVERE, 2002; ALBUQUERQUE, 2012).

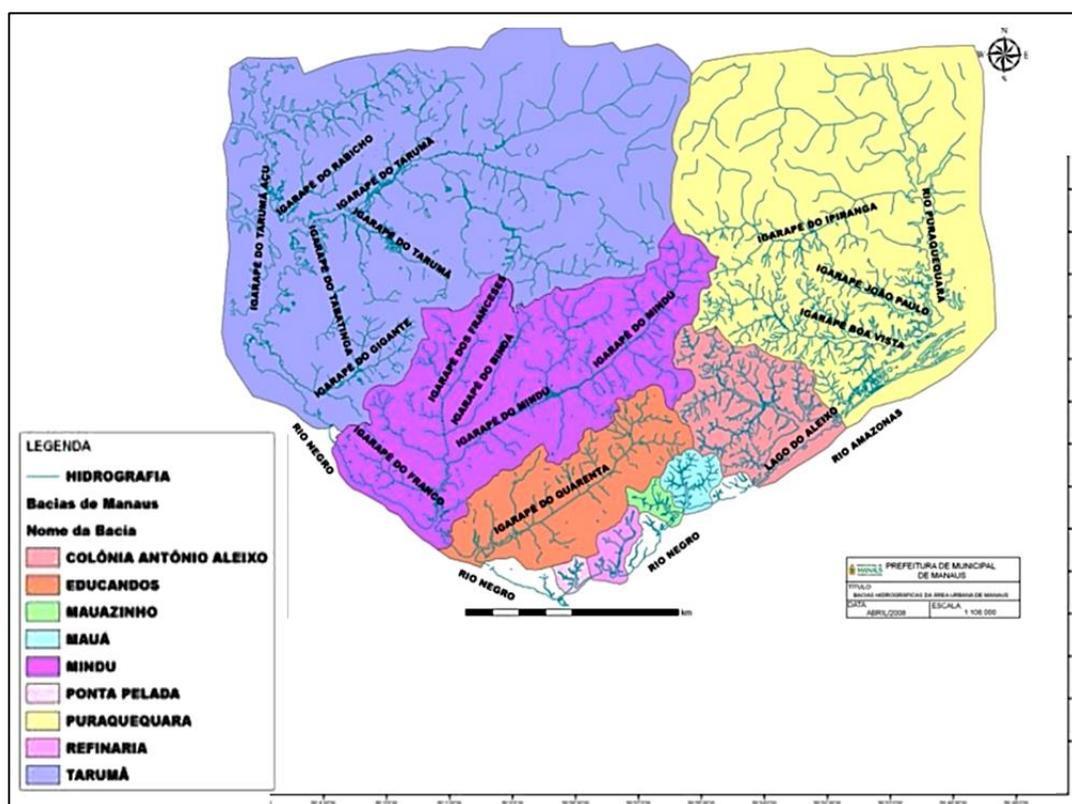


Figura 9: Delimitação das bacias hidrográficas na cidade de Manaus. Outras pequenas bacias configuram-se como rias fluviais com regime de cheias e vazantes condicionado pelo Rio Negro, rio que banha a cidade. Adaptado de ALBUQUERQUE, 2012.

Um total de vinte e seis amostras de sedimentos superficiais foram coletadas nos igarapés do Quarenta (bacia do Educandos) (n=6), Mindu (bacia do Mindu) (n=9) e Tarumã-Açu (bacia do Tarumã) (n=11). A área de estudo e os pontos de

amostragem nos igarapés do Quarenta (Q), Mindu (M) e Tarumã-Açu são apresentados na Figura 10. A Tabela 3 apresenta as coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

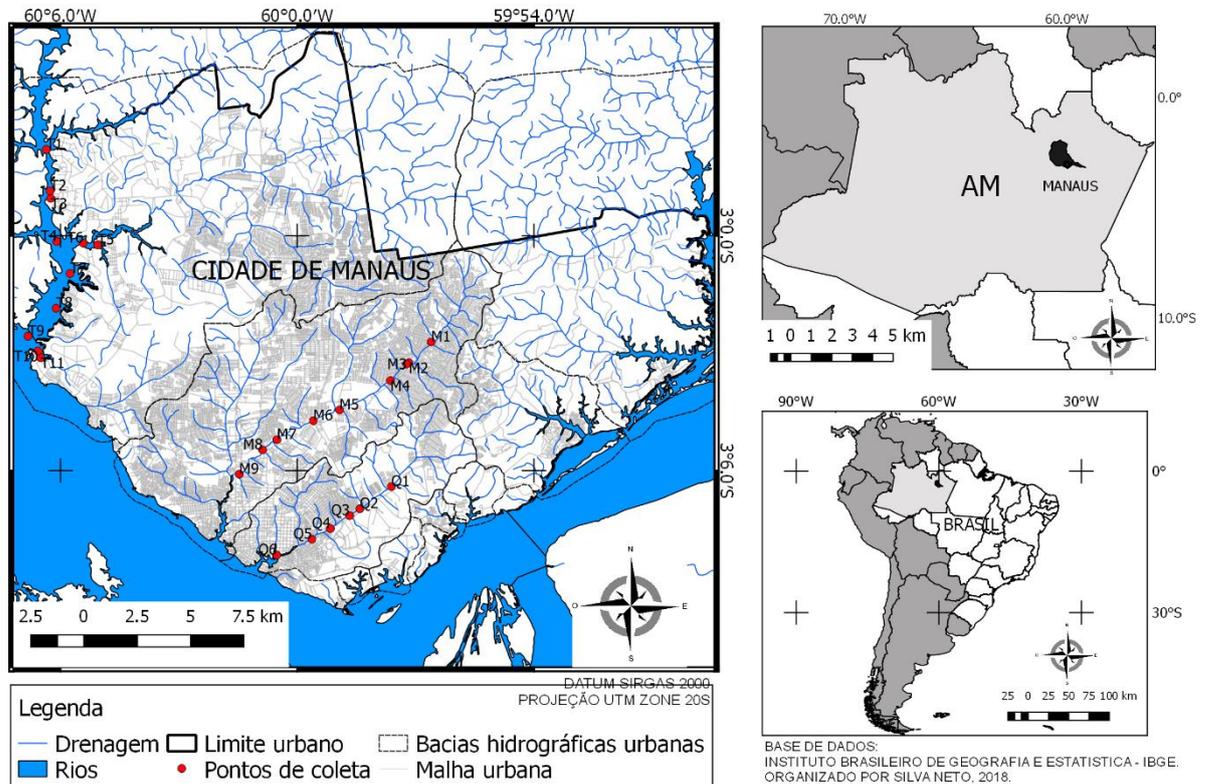


Figura 10: Área de estudo e pontos de amostragem nos igarapés do Quarenta (Q), Mindu (M) e Tarumã-Açu.

Tabela 3: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta dos igarapés do Quarenta, Mindu e Tarumã-Açu.

Amostras	Latitude (S)	Longitude (W)
<u>IGARAPÉ DO QUARENTA</u>		
Q1	3°06'25.72"	59°57'38.84"
Q2	3°06'59.59"	59°58'26.65"
Q3	3°7'10.15"	59°58'42.35"
Q4	3°07'30.01"	59°59'11.55"
Q5	3°07'46.21"	59°59'39.78"
Q6	3°08'10.50"	60°0'33.18"
<u>IGARAPÉ DO MINDU</u>		
M1	3°2'43.97"	59°56'38.26"
M2	3°3'16.08"	59°57'12.19"
M3	3°3'17.77"	59°57'15.50"

M4	3°3'43.18"	59°57'40.18"
M5	3°4'28.21"	59°58'57.70"
M6	3°4'44.78"	59°59'37.42"
M7	3°5'13.76"	60°0'32.79"
M8	3°5'29.41"	60°0'54.63"
M9	3°6'6.61"	60°1'29.99"
<u>IGARAPÉ DO TARUMÃ</u>		
T1	3°3'8.16"	60°6'32.23"
T2	3°2'57.77"	60°6'36.15"
T3	3°2'35.20"	60°6'51.30"
T4	3°1'52.34"	60°6'8.51"
T5	3°0'59.14"	60°5'47.29"
T6	3°0'12.59"	60°5'27.20"
T7	3°0'15.35"	60°5'5.38"
T8	3°0'9.93"	60°6'7.38"
T9	2°59'4.03"	60°6'16.63"
T10	2°58'52.75"	60°6'17.70"
T11	2°57'49.01"	60°6'23.42"

3.2 Coleta das amostras de sedimento

Segundo Albuquerque (2012), cidade de Manaus encontra-se na faixa de domínio tropical, característico de grande parte do Brasil, sendo marcada por duas estações que podem ser diferenciadas quanto ao nível de precipitação: inverno amazônico (sempre úmido com variáveis temperaturas e precipitações) e verão amazônico (quente e úmido, o qual se caracteriza por apresentar uma estação seca de curta duração).

As amostras foram coletadas no período de estação das chuvas (inverno amazônico) ao longo do mês de março de 2017. Os sedimentos superficiais (0–10 cm) foram coletados utilizando uma draga do tipo Van veen e armazenadas em formas de alumínio pré-calcinadas sob 4°C durante o transporte até o laboratório. Imediatamente após a coleta, as amostras de sedimento foram congeladas em freezer e, posteriormente, liofilizadas para que os compostos orgânicos permanecessem estáveis nas amostras de sedimento. Após a liofilização, as amostras foram maceradas em grau e pistilo de porcelana, peneiradas em malha de 250 µm e armazenadas sob temperatura ambiente em formas de alumínio previamente calcinadas (Figura 11).

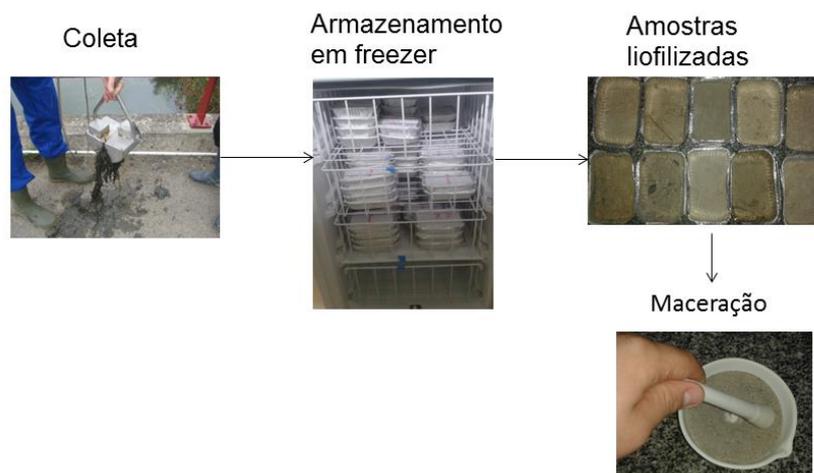


Figura 11: Coleta, armazenamento em freezer, liofilização e maceração das amostras de sedimentos.

3.3 Preparo das amostras de sedimento

Com a finalidade de remover resíduos orgânicos, as vidrarias utilizadas durante este trabalho foram lavadas com detergente e enxaguadas com água corrente e, em seguida, mergulhadas em uma solução de Extran 5% (v/v) por 24 horas, sendo novamente enxaguadas em água corrente e, por último, com água destilada. Em seguida, as vidrarias (exceto as volumétricas) foram calcinadas em mufla sob 400 °C durante 4 horas e, então, acondicionadas em local apropriado.

A extração dos compostos foi realizada com base no método EPA 3540C com algumas pequenas alterações. Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau HPLC (do inglês *high performance liquid chromatography*) adquiridos da Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). As etapas da metodologia de preparo das amostras de sedimentos serão descritas abaixo.

3.3.1 Ativação do cobre

Primeiramente, preparou-se o cobre ativado para ser adicionado à amostra de sedimento previamente à extração dos compostos orgânicos visando a remoção de possível enxofre molecular. Pesou-se aproximadamente 1 g de cobre e transferiu-se para um frasco de 30 mL. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl)

concentrado ao tubo contendo cobre e levou-se ao ultrassom por 15 min sob temperatura ambiente. Após este tempo, foi realizada a retirada do sobrenadante e o cobre passou por um processo de lavagem para a retirada dos resquícios de ácido. Para isso, adicionou-se 2,5 mL de metanol (MeOH) e levou-se novamente ao ultrassom sob temperatura ambiente por 15 min (1ª lavagem). Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 2,5 mL de uma mistura de diclorometano (DCM) e MeOH (1:1, v/v) e repetiu-se o processo (2ª lavagem). Por fim, o cobre foi lavado com 2,5 mL de DCM e repetiu-se o processo.

3.3.2 Extração de esteróis dos sedimentos

Foram pesados 5 g de cada amostra de sedimento nos frascos de vidro contendo cobre ativado. Aos tubos, adicionou-se 15 mL de DCM e MeOH (2:1, v/v), agitou-se e levou-se ao ultrassom por 30 min (Figura 12). O sobrenadante foi retirado com uma pipeta Pasteur e transferido para um balão e o processo de extração repetido mais duas vezes. Na sequência, o extrato orgânico combinado foi concentrado por rotaevaporação e, então, armazenado em frasco de vidro na geladeira até a etapa de fracionamento.

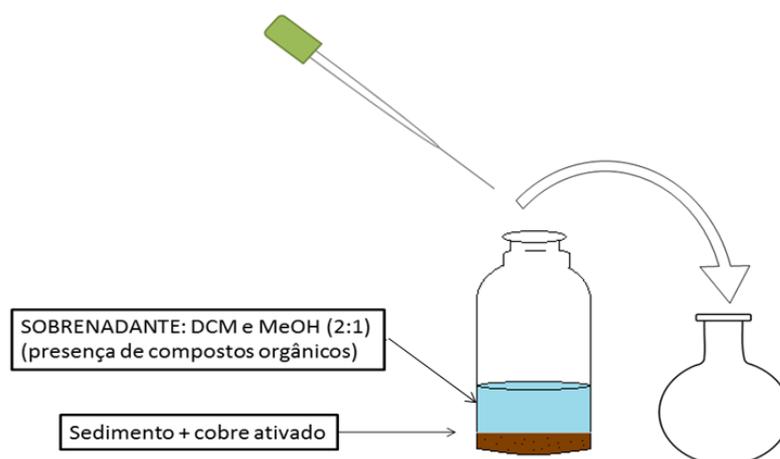


Figura 12: Representação do processo de extração de compostos orgânicos das amostras de sedimento. O processo de extração deve ser tratado com precaução, pois pode ocorrer facilmente a contaminação por artigos de laboratório feitos de borracha natural, tais como enchimentos de pipeta e luvas de látex ou por organismos contaminantes (VOLKMAN, 2003).

3.3.3 Fracionamento do extrato

O método de fracionamento do extrato orgânico bruto empregado neste estudo é uma adaptação do método EPA 3540C muito utilizado em geoquímica orgânica de sedimentos recentes. Os extratos orgânicos brutos foram fracionados por cromatografia de coluna aberta. Uma coluna de vidro com capacidade de 50 mL foi preenchida com 5 g de sílica gel, 1 g de alumina (ambas foram ativadas sob 200°C por 4 horas e desativadas com 5% (m/v) de água destilada) e 1 g de cobre ativado. O fracionamento dos extratos resultou em quatro frações: I) eluída com 30 mL de hexano, II) eluída com 30 mL de uma mistura hexano:DCM (1:1, v/v), III) eluída com 30 mL de uma mistura de acetato de etila e metanol (3:1, v/v) e IV) 30 mL de metanol com 2% (v/v) de ácido acético. Em seguida, as frações III foram concentradas por rotaevaporação e, então, levadas à secura e redissolvidas em 1 mL de diclorometano, sendo armazenadas em freezer até o momento da análise cromatográfica. As demais frações foram concentradas por rotaevaporação e armazenadas em freezer para posteriores análises.

3.4 Determinação de esteróis por LC-MS/MS

A determinação de esteróis nas amostras de sedimentos dos igarapés de Manaus foi realizada de acordo com um método previamente desenvolvido e validado (BATAGLION, et al., 2015). As análises foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM-INPA). As frações contendo os esteróis foram analisadas em um equipamento de LC Modelo *1200 series* da Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos da América) acoplado ao espectrômetro modelo API 4000 da Applied Biosystems (Darmstadt, Alemanha) utilizando uma fonte APCI em modo positivo de ionização.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Shim-pack XR-ODS III de 150 mm x 2,0 mm de diâmetro interno x 2,2 µm de tamanho de partícula, utilizando o seguinte gradiente de eluição: 0-2 min. (90% B), 2-8 min. (100% B) e 8-10 min. (90% B) na temperatura de 30 °C e vazão de 0,6 mL min⁻¹. Água e metanol

correspondem aos solventes A e B, respectivamente. A temperatura do amostrador automático foi mantida em 10 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

Os parâmetros da fonte de APCI foram os seguintes: corrente da agulha corona, 4,0 µA, temperatura de dessolvatação, 450 °C. As transições SRM utilizadas para cada analito e os parâmetros do espectrômetro de massas estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Transições SRM de cada analito e parâmetros do espectrômetro de massas.

Composto	transições	Q1 (V)	Q3(V)	EC (V)
Colesterol	369>95*	-17	-19	-32
	369>135	-25	-28	-22
colestanol/epicoprostanol/coprostanol	371>81	-13	-17	-36
	371>95*	-17	-19	-29
Ergosterol	379>69*	-30	-29	-26
	379>83	-30	-17	-24
Brassicasterol	381>69*	-13	-28	-29
	381>135	-25	-28	-24
Campesterol	383>81	-25	-16	-40
	383>161*	-25	-18	-21
Estigmasterol	395>81*	-18	-16	-41
	395>107	-18	-22	-35
β-sitosterol	397>81	-14	-16	-41
	397>95*	-14	-19	-34
Estigmastanol	399>95*	-14	-19	-33
	399>149	-14	-29	-22

* transição de quantificação

Os padrões de esteróis (3β)-Coolest-5-en-3-ol (colesterol, ≥99% pureza), colesterol-*d*₆ (padrão interno (PI)), (3β,5α)-Coleston-3-ol (colestanol, >95% pureza), (3β,5β)-Coleston-3-ol (coprostanol, >95% pureza), (3α,5β)-Coleston-3-ol (epicoprostanol, >95% pureza), (3β,22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (ergosterol, >95% pureza), (3β,22E)-Ergosta-5,22-dien-3-ol (brassicasterol, >95% pureza), (3β,24R)-Ergost-5-en-3-ol (campesterol, >65% pureza), (3β)-Estigmast-5-en-3-ol (β-sitosterol, >98% pureza), (3β,22E)-Estigmasta-5,22-dien-3-ol (estigmasterol, >95% pureza), (3β,5α)-Estigmastan-3-ol (estigmastanol, >95% pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos da América). Soluções estoque para os compostos individuais foram preparadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em DCM. Uma solução de trabalho contendo todos os analitos foi preparada na concentração de 2,0 µg mL⁻¹ em MeOH, sendo utilizada para o preparo das soluções de construção das curvas de calibração. Soluções nas concentrações de 10, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, e 1000 ng mL⁻¹ em MeOH foram utilizadas para a

construção das curvas de calibração. O método de calibração interna foi empregado, sendo a concentração do padrão interno de 500 ng mL⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros analíticos

A validação do método seguido neste estudo foi realizada pela obtenção dos principais parâmetros analíticos. Detalhes sobre os parâmetros de validação podem ser encontrados no trabalho previamente publicado por Bataglion e colaboradores (2015).

Foram analisados um total de dez esteróis. A tabela 5 mostra os parâmetros da curva de calibração dos esteróis determinados por LC-MS/MS. Podemos observar que os valores de r^2 para a curva de calibração de todos os esteróis foram acima de 0,99.

Tabela 5: Parâmetros das curvas de calibração obtidos para todos os analitos

Composto	r^2	Coefficiente linear	Coefficiente angular
Ergosterol	0,999	5599,7	350,68
Epicoprostanol	0,996	5599,7	350,68
Coprostanol	0,998	2743,2	391,45
Colestanol	0,999	1879,9	309,41
Colesterol	0,996	3674,1	386,96
Campesterol	0,999	1878,2	305,88
Estigmasterol	0,996	436,62	165,38
β -sitosterol	0,997	2130,8	418,67
Estigmastanol	0,995	995,27	173,08
Brassicasterol	0,998	2679,5	418,74

Para a quantificação dos esteróis nas amostras, foi calculada a razão da área do pico de cada analito sobre a área do pico do PI, logo, as concentrações foram obtidas usando a equação da curva de calibração. No apêndice I encontram-se os cromatogramas obtidos, neles é possível observar as transições SRM para cada analito.

A Tabela 6 mostra os tempos de retenção, LD, e LQ dos esteróis possivelmente presentes em amostras de sedimentos. Os LD foram estimados como 3s/S, enquanto os LQ foram estimados como 10s/S, onde s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva de calibração.

Tabela 6: Parâmetros analíticos do método (linearidade, LD e LQ).

Composto	Tempo de retenção (min.)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
Ergosterol	5,51	2,68	6,78
Epicoprostanol	5,78	1,35	4,10
Coprostanol	6,55	1,32	4,01
Colestanol	6,98	1,69	5,13
Colesterol	6,41	2,24	6,78
Campesterol	6,97	1,34	4,07
Estigmasterol	6,82	2,95	8,95
β -sitosterol	7,51	1,19	3,63
Estigmastanol	8,21	2,01	6,11
Brassicasterol	6,10	1,59	4,81

4.2 Igarapé do Mindu

As amostras de sedimentos coletadas no igarapé do Mindu apresentaram concentrações totais de esteróis entre 2 529 e 12 429 ng g⁻¹ (Tabela 7). Além da grande variação das concentrações totais de esteróis entre os pontos de coleta, as concentrações de esteróis individuais também variaram amplamente: colesterol 283–1 863 ng g⁻¹, epicoprostanol 65–422 ng g⁻¹, coprostanol 523–6 113 ng g⁻¹, colestanol 95–672 ng g⁻¹, campesterol 62–281 ng g⁻¹, β -sitosterol 118–440 ng g⁻¹, estigmasterol 423–1 449 ng g⁻¹ e estigmastanol 268–1 200 ng g⁻¹.

As amostras M1 e M2 apresentaram as menores concentrações totais de esteróis, enquanto a amostra M4 apresentou a maior concentração de esteróis totais e as maiores concentrações de praticamente todos os esteróis. Seguindo esta mesma tendência, as amostras dos primeiros pontos de coleta, M1 e M2, apresentaram as menores concentrações de coprostanol. Estes pontos de coleta localizam-se relativamente próximos a regiões de preservação, embora já seja uma

área muito urbanizada. A amostra M4 apresentou a maior concentração de coprostanol, possivelmente devido à grande contribuição de efluentes do populoso bairro Cidade Nova. As demais amostras apresentaram concentrações similares de coprostanol e intermediárias entre os primeiros pontos de coleta e o ponto próximo ao bairro Cidade Nova. Apesar das diferenças em relação às concentrações de coprostanol, todas as amostras de sedimentos coletadas no igarapé do Mindu são classificadas como acentuadamente contaminadas por esgoto doméstico.

Além do aporte de MO antropogênica, os resultados revelam também o igarapé do Mindu está submetido ao aporte de MO biogênica de origem terrestre devido a presença dos esteróis campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e estigmastanol, os quais são biomarcadores geoquímicos de plantas superiores. Apesar destes esteróis estarem presentes nas amostras de sedimento do igarapé do Mindu, as suas concentrações foram sempre menores que àquelas de coprostanol. Este resultado não seria esperado para uma região com acentuada vegetação, como a maior parte do igarapé do Mindu.

Tabela 7. Concentrações ($ng\ g^{-1}$) de esteróis em amostras de sedimentos do Igarapé do Mindu.

Amostra	colesterol	epicoprostanol	coprostanol	colestanol	campesterol	β-sitosterol	estigmasterol	estigmastanol	Σesteróis
M1	283 \pm 29	155 \pm 23	1 223 \pm 122	282 \pm 49	62 \pm 8	174 \pm 8	616 \pm 70	492 \pm 60	3 288 \pm 370
M2	359 \pm 37	65 \pm 10	523 \pm 52	95 \pm 17	121 \pm 16	297 \pm 14	802 \pm 91	268 \pm 33	2 529 \pm 269
M3	1 243 \pm 129	215 \pm 32	2 754 \pm 275	552 \pm 97	162 \pm 22	303 \pm 14	964 \pm 109	585 \pm 71	6 778 \pm 750
M4	1 863 \pm 194	467 \pm 69	6 113 \pm 611	657 \pm 115	281 \pm 38	403 \pm 19	1 450 \pm 164	1 194 \pm 146	12 429 \pm 1356
M5	852 \pm 89	258 \pm 38	3 647 \pm 365	167 \pm 29	197 \pm 27	440 \pm 21	1 449 \pm 164	1 200 \pm 146	8 210 \pm 878
M6	713 \pm 74	311 \pm 46	3 788 \pm 379	264 \pm 46	89 \pm 12	176 \pm 8	589 \pm 67	1 141 \pm 139	7 073 \pm 772
M7	1 108 \pm 115	422 \pm 62	3 524 \pm 352	277 \pm 48	135 \pm 18	214 \pm 10	760 \pm 86	899 \pm 110	7 338 \pm 802
M8	1 050 \pm 109	277 \pm 41	3 076 \pm 308	672 \pm 118	87 \pm 12	139 \pm 7	531 \pm 60	795 \pm 97	6 627 \pm 751
M9	654 \pm 68	232 \pm 34	2 642 \pm 264	493 \pm 86	78 \pm 11	118 \pm 6	423 \pm 48	466 \pm 57	5 105 \pm 574

Resultados apresentados como concentração média \pm desvio padrão com base em análises em triplicata. Todas as amostras apresentaram concentrações de ergosterol e brassicasterol abaixo dos LQ, portanto, os resultados não estão expostos.

Apesar das concentrações absolutas de coprostanol bastante elevadas para as amostras de sedimentos do igarapé do Mindu já indicarem contaminação acentuada por esgoto doméstico, outros índices diagnósticos foram aplicados a fim de uma avaliação mais confiável. Um dos índices utilizados é a percentagem relativa de coprostanol em relação ao somatório de esteróis quantificados nas amostras. A Figura 13 mostra a contribuição relativa dos esteróis individuais nas amostras de sedimentos do igarapé do Mindu.

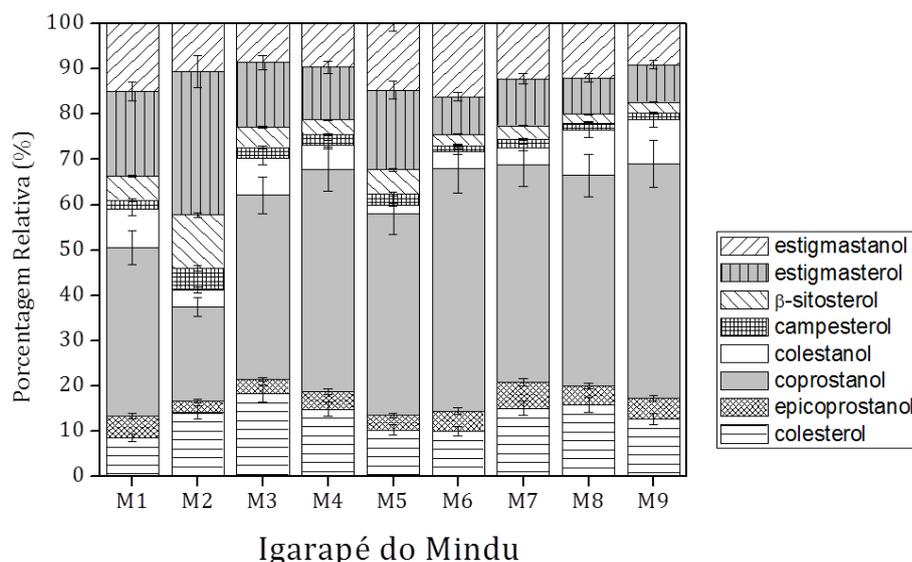


Figura 13: Proporção relativa de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé do Mindu.

Podemos observar na Figura 13 que o coprostanol apresenta a maior porcentagem em relação aos esteróis totais quantificados em praticamente todas as amostras do igarapé do Mindu (exceto M2). A porcentagem de coprostanol variou de 21 a 54 % (m/m) para as amostras M2 e M6, respectivamente.

Tais valores são considerados muito altos e corroboram as elevadas concentrações de coprostanol, indicando que esgoto doméstico é a maior fonte de MO para o igarapé do Mindu. A Tabela 8 apresenta os índices diagnósticos $\text{cop}/(\text{cop}+\text{colestanol})$, $\text{cop}/\text{colestanol}$, $\text{cop}/\text{colesterol}$ e $\text{e-cop}/\text{cop}$ para as amostras de sedimentos do igarapé do Mindu.

Tabela 8: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé do Mindu.

Razões Amostras	cop/ (cop+colestanol)	cop/ colestanol	cop/ colesterol	e-cop/ cop
M1	0,8	4,3	4,3	0,1
M2	0,8	5,5	1,5	0,1
M3	0,8	5,0	2,2	0,1
M4	0,9	9,3	3,3	0,1
M5	0,9	21,8	4,3	0,07
M6	0,9	14,3	5,3	0,1
M7	0,9	12,7	3,2	0,1
M8	0,8	4,6	2,9	0,1
M9	0,8	5,4	4,0	0,1

Todas as amostras de sedimentos do igarapé do Mindu apresentaram o índice cop/(cop + colestanol) maior que 0,8, sendo que valores maiores que 0,7 são indicativos de contaminação acentuada. O índice cop/colestanol foi maior que 4 para todas as amostras, sendo muito maior que o valor de 0,5, indicativo de contaminação. Similarmente, o índice cop/colesterol foi maior que 1 para todas as amostras, superior ao valor de 0,2 que indica aporte de MO fecal para o ambiente. O índice e-cop/cop foi menor que 0,2 para todas as amostras, indicando que o igarapé do Mindu recebe esgoto predominantemente sem qualquer etapa de tratamento.

4.3 Igarapé do Quarenta

As amostras de sedimentos coletadas no igarapé do Quarenta apresentaram concentrações totais de esteróis entre 1 521 e 25 431 ng g⁻¹ (Tabela 9). Além da grande variação das concentrações totais de esteróis entre os pontos de coleta, as concentrações de esteróis individuais também variaram amplamente: colesterol 342–3 946 ng g⁻¹, epicoprostanol 63–961 ng g⁻¹, coprostanol 509–12 830 ng g⁻¹, colestanol 182–741 ng g⁻¹, campesterol <LQ–40 ng g⁻¹, β-sitosterol <LQ–1 111 ng g⁻¹, estigmasterol 174–3 251 ng g⁻¹ e estigmastanol 110–2 591 ng g⁻¹.

A amostra Q1 apresentou a menor concentração total de esteróis, assim como as menores concentrações para a maioria dos compostos, inclusive para coprostanol. A amostra Q1 foi coletada no início do igarapé do Quarenta e próximo a uma região de intensa vegetação, porém é uma área de invasão que apresenta uma grande quantidade de moradias precárias (Comunidade da Sharp). A amostra Q6 apresentou a maior concentração total de esteróis e as maiores concentrações de

praticamente todos os esteróis, especialmente de coprostanol. A elevada concentração de coprostanol observada para a amostra Q6 pode ser resultado de uma série de fatores, como a proximidade com a região do Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus (Prosamim) e com o bairro Educandos, os sucessivos incrementos de contaminantes ao longo do igarapé e o acúmulo devido a maior vazão do Rio Negro na baía do Educando. Apesar da grande variação das concentrações de coprostanol, todas as amostras de sedimentos coletadas no igarapé do Quarenta são classificadas como altamente submetidas ao aporte de esgoto doméstico.

As amostras de sedimentos do igarapé do Quarenta apresentaram baixas concentrações dos esteróis biomarcadores de plantas terrestres, como campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e estigmastanol. O composto β -sitosterol, por exemplo, foi quantificado em apenas duas amostras. Nem mesmo as amostras coletadas próximas às áreas com presença de vegetação apresentaram consideráveis concentrações de esteróis indicativos de MO de origem terrestre.

Tabela 9. Concentrações (ng g^{-1}) de esteróis em amostras de sedimentos do Igarapé do Quarenta.

Amostra	colesterol	epicoprostanol	coprostanol	colestanol	campesterol	β-sitosterol	estigmasterol	estigmastanol	Σesteróis
Q1	456 \pm 47	63 \pm 9	509 \pm 51	182 \pm 32	26 \pm 4	< LQ	174 \pm 20	110 \pm 13	1 521 \pm 176
Q2	342 \pm 36	75 \pm 11	842 \pm 84	331 \pm 58	26 \pm 4	< LQ	197 \pm 22	155 \pm 19	1 968 \pm 233
Q3	446 \pm 46	95 \pm 14	947 \pm 95	448 \pm 78	21 \pm 43	< LQ	270 \pm 30	171 \pm 21	2 397 \pm 288
Q4	343 \pm 36	70 \pm 10	673 \pm 67	334 \pm 58	< LQ	< LQ	180 \pm 20	147 \pm 18	1 746 \pm 210
Q5	680 \pm 71	106 \pm 16	952 \pm 95	359 \pm 63	40 \pm 5	61 \pm 3	272 \pm 31	212 \pm 26	2 681 \pm 309
Q6	3 946 \pm 410	961 \pm 142	12 830 \pm 1283	741 \pm 130	< LQ	1 111 \pm 52	3 251 \pm 367	2 591 \pm 316	25 431 \pm 2701

Resultados apresentados como concentração média \pm desvio padrão com base em análises em triplicata. Todas as amostras apresentaram concentrações de ergosterol e brassicasterol abaixo dos LQ, portanto, os resultados não estão expostos.

As concentrações absolutas de coprostanol superiores a 500 ng g^{-1} são suficientes para revelar o intenso aporte de esgoto doméstico no igarapé do Quarenta. No entanto, os índices diagnósticos foram aplicados a fim de avaliar a correlação entre os vários parâmetros. A Figura 14 mostra a contribuição relativa dos esteróis individuais nas amostras de sedimentos do igarapé do Quarenta.

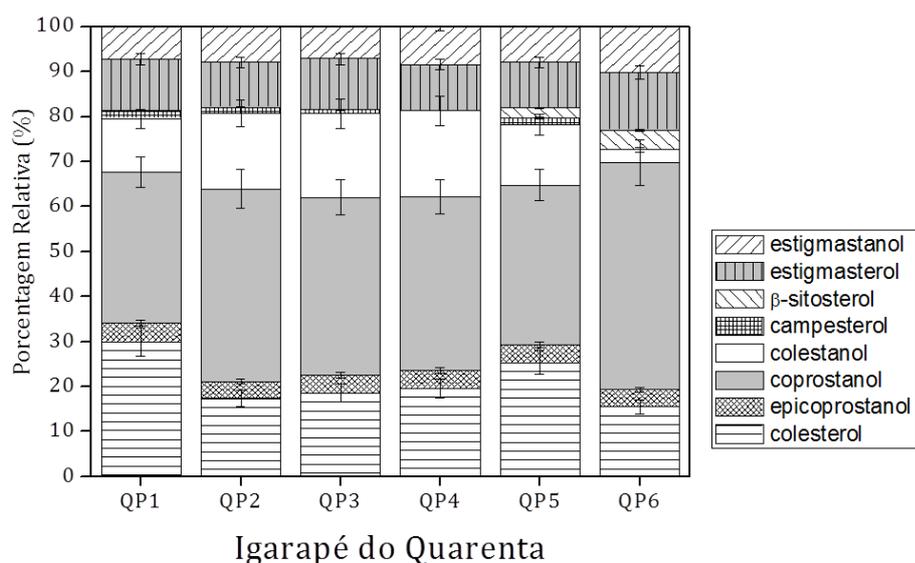


Figura 14: Proporção relativa de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé do Quarenta.

A Figura 14 revela que todas as amostras do igarapé do Quarenta apresentam coprostanol como o esteroide mais abundante. A porcentagem deste esteroide fecal variou de 31 a 50 % (m/m) para as amostras Q1 e Q6, respectivamente. Este resultado corrobora a menor e a maior concentração de coprostanol observadas para Q1 e Q6, respectivamente. As porcentagens relativas de coprostanol indicam que a MO antropogênica proveniente de esgoto doméstico tem forte contribuição em toda a extensão do igarapé do Quarenta.

As porcentagens relativas de esteróis de plantas terrestres, como campesterol 0,8–1,7 % (m/m), β -sitosterol 2,2–4,3 % (m/m), estigmasterol 9,9–11,4 % (m/m) e estigmastanol 7,2–10,1 % (m/m), indicam fraca influência de MO de origem terrestre ao longo do igarapé do Quarenta.

Os índices diagnósticos $\text{cop}/(\text{cop}+\text{colestanol})$, $\text{cop}/\text{colestanol}$, $\text{cop}/\text{colesterol}$ e $\text{e-cop}/\text{cop}$ apresentados na Tabela 10 corroboram as concentrações absolutas e relativas de coprostanol discutidas acima para as amostras de sedimentos do Igarapé do Quarenta.

Tabela 10: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé do Quarenta.

Razões Amostras	cop/ (cop+colestanol)	cop/ colestanol	cop/ colesterol	e-cop/ cop
Q1	0,7	2,8	1,1	0,1
Q2	0,7	2,5	2,5	0,1
Q3	0,7	2,1	2,1	0,1
Q4	0,7	2,0	2,0	0,1
Q5	0,7	2,6	1,4	0,1
Q6	0,9	17,3	3,2	0,07

Todas as amostras de sedimentos do igarapé do Quarenta apresentaram o índice cop/(cop+ colestanol) igual ou maior que 0,7, valor indicativo de contaminação por esgoto doméstico. Ainda, todas as amostras apresentaram o índice cop/colestanol muito maior que o valor (0,5) indicativo de contaminação fecal. Similarmente, todas as amostras apresentaram o índice cop/colesterol maior que 1, indicando que o esterol fecal está presente em maior abundância que seu precursor biológico. Por fim, o índice e-cop/cop apresentou valores iguais ou menores que 0,1 para todas as amostras, indicando que o igarapé do Quarenta recebe ao longo de sua extensão esgoto doméstico sem tratamento.

4.4 Igarapé Tarumã-Açu

As amostras de sedimentos coletadas no igarapé Tarumã-Açu apresentaram concentrações totais de esteróis entre 167 e 1 984 ng g⁻¹ (Tabela11). Apenas as amostras T7 e T9 apresentaram concentrações totais de esteróis elevadas, sendo as demais muito inferiores àquelas encontradas para os sedimentos dos igarapés do Mindu e Quarenta. As concentrações de esteróis individuais variaram da seguinte forma: colesterol 83–368 ng g⁻¹, epicoprostanol 5–45 ng g⁻¹, coprostanol <LD–142 ng g⁻¹, colestanol 5–241 ng g⁻¹, campesterol 5–174 ng g⁻¹, β-sitosterol 29–601 ng.g⁻¹ e estigmasterol 19–692 ng g⁻¹.

As amostras T7 e T9 apresentaram as maiores concentrações totais de esteróis e as maiores concentrações individuais de todos os esteróis. Estas amostras apresentaram concentrações de coprostanol de 142 e 118 ng g⁻¹, respectivamente. Valores acima de 100 ng g⁻¹ são considerados indicativos de

contaminação por esgoto doméstico. As amostras T8 e T10, apresentaram coprostanol abaixo do limite de quantificação do método, enquanto que as demais amostras apresentaram concentrações variando de 5 a 19 ng g⁻¹.

A presença acentuada de vegetação em toda a margem do igarapé Tarumã-Açu refletiu-se nas concentrações de esteróis como campesterol, β -sitosterol e estigmasterol, as quais foram sempre maiores que as concentrações do esterol fecal coprostanol. Este resultado foi observado apenas para as amostras do igarapé Tarumã-Açu, contrastando com aqueles observados para os igarapés completamente inseridos na área urbana, Mindu e Quarenta.

Tabela 11. Concentrações ($ng\ g^{-1}$) de esteróis em amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu.

Amostras	colesterol	epicoprostanol	coprostanol	colestanol	campesterol	β-sitosterol	estigmasterol	estigmastanol	Σesteróis
T1	115 \pm 12	8 \pm 1	16 \pm 2	11 \pm 2	15 \pm 2	35 \pm 2	39 \pm 4	< LQ	238 \pm 25
T2	135 \pm 14	9 \pm 1	15 \pm 1	14 \pm 2	35 \pm 5	79 \pm 4	100 \pm 11	< LQ	386 \pm 39
T3	129 \pm 13	8 \pm 1	10 \pm 1	22 \pm 4	106 \pm 14	288 \pm 14	266 \pm 30	< LQ	829 \pm 77
T4	83 \pm 9	5 \pm 1	7 \pm 1	9 \pm 2	30 \pm 4	64 \pm 3	150 \pm 17	< LQ	346 \pm 35
T5	138 \pm 14	8 \pm 1	7 \pm 1	6 \pm 1	5 \pm 1	14 \pm 1	39 \pm 4	< LQ	216 \pm 23
T6	153 \pm 16	10 \pm 1	19 \pm 2	24 \pm 4	33 \pm 5	96 \pm 5	71 \pm 8	< LQ	406 \pm 41
T7	369 \pm 38	45 \pm 7	142 \pm 14	241 \pm 42	174 \pm 24	601 \pm 28	413 \pm 47	< LQ	1 984 \pm 200
T8	110 \pm 11	6 \pm 1	< LQ	6 \pm 1	16 \pm 2	53 \pm 2	50 \pm 6	< LQ	240 \pm 24
T9	269 \pm 28	24 \pm 3	118 \pm 12	51 \pm 9	236 \pm 32	531 \pm 25	692 \pm 78	< LQ	1 920 \pm 187
T10	102 \pm 11	5 \pm 1	< LQ	5 \pm 1	7 \pm 1	29 \pm 1	19 \pm 2	< LQ	167 \pm 17
T11	96 \pm 10	5 \pm 1	5 \pm 1	6 \pm 1	11 \pm 2	39 \pm 2	63 \pm 7	< LQ	225 \pm 23

Resultados apresentados como concentração média \pm desvio padrão com base em análises em triplicata. Todas as amostras apresentaram concentrações de ergosterol e brassicasterol abaixo dos LQ, portanto, os resultados não estão expostos.

As concentrações absolutas de coprostanol próximas a 10 ng g^{-1} podem não ser suficientemente confiáveis para indicar aporte de esgoto doméstico no igarapé Tarumã-Açu. Neste caso, os índices diagnósticos auxiliam em uma melhor avaliação das fontes de MO para o ambiente. A Figura 15 mostra a contribuição relativa dos esteróis individuais nas amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu.

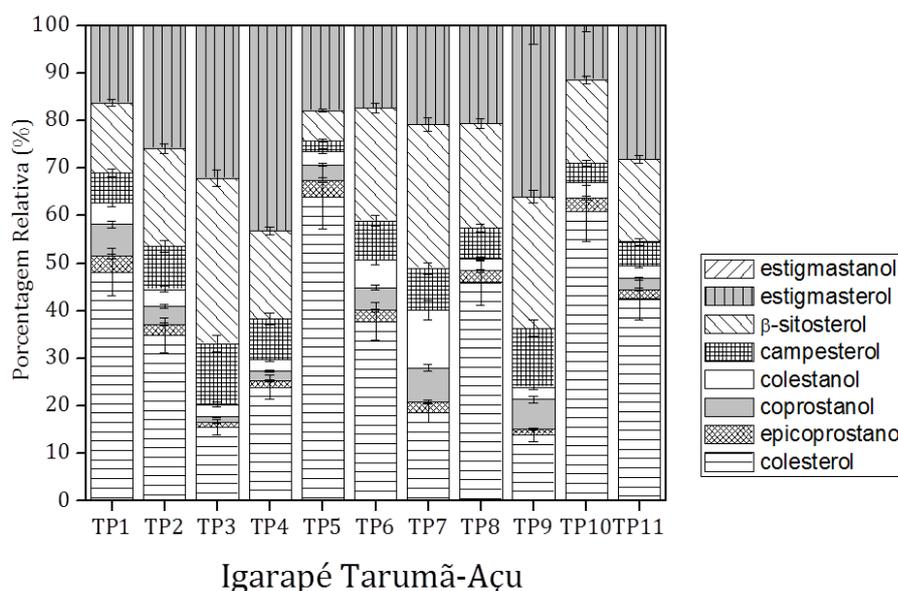


Figura 15: Proporções relativas de esteróis nos sedimentos superficiais do igarapé Tarumã-Açu.

Podemos observar na Figura 15 que o colesterol e o estigmasterol apresentam as maiores porcentagens em relação aos esteróis totais quantificados em todas as amostras do igarapé Tarumã-Açu. O esterol fecal coprostanol apresentou proporção relativa de 0 a 7 % (m/m), sendo que as amostras T1, T7 e T9 apresentaram valores maiores que 5%, indicativo de contaminação por esgoto doméstico. Estes resultados revelam que as fontes biogênicas são os principais contribuintes da MO sedimentar do igarapé Tarumã-Açu, embora a fonte antropogênica devido a entrada de esgoto doméstico seja importante em alguns pontos.

A Tabela 12 apresenta os índices diagnósticos associados às concentrações de coprostanol que auxiliam na avaliação da contaminação por esgoto doméstico no igarapé Tarumã-Açu.

Tabela 12: Índices diagnósticos para amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu.

Razões Amostras	cop)/ (cop+colestanol)	cop/ colestanol	cop/ colesterol	e-cop/ cop
T1	0,6	1,5	0,1	0,5
T2	0,5	1,0	0,1	0,6
T3	0,3	0,5	0,1	0,8
T4	0,4	0,8	0,1	0,7
T5	0,5	1,2	0,05	1,1
T6	0,4	0,8	0,1	0,5
T7	0,4	0,6	0,4	0,3
T8	-	-	-	-
T9	0,7	2,3	0,4	0,2
T10	-	-	-	-
T11	0,4	0,8	0,05	0,9

A maioria das amostras de sedimentos do igarapé Tarumã-Açu apresentou o índice $\text{cop}/(\text{cop} + \text{colestanol})$ igual ou maior que 0,3, sendo este valor considerado por alguns autores como indicativo de início de contaminação por esgoto doméstico. O índice $\text{cop}/\text{colestanol}$ próximo a 1 para várias amostras indica que os isômeros natural e fecal estão presentes em concentrações similares, situação encontrada em ambientes que apresentam aporte de esgoto doméstico. Por outro lado, o índice $\text{cop}/\text{colesterol}$ apresentou valores maiores que 0,2 apenas para as amostras T7 e T9, corroborando as concentrações absolutas e relativa de coprostanol indicativas de contaminação. As demais amostras apresentaram o índice $\text{cop}/\text{colesterol}$ menor que 0,2, possivelmente devido ao acentuado aporte de colesterol a partir de fontes aquáticas que mascara a contribuição fecal. O índice $\text{e-cop}/\text{cop}$ variou amplamente para as amostras de sedimento do Igarapé Tarumã-Açu, apresentando valores na faixa de 0,2 a 1,1. As amostras T3, T5 e T11 apresentaram valores maiores que 0,8, os quais são indicativos de predomínio de aporte de esgoto tratado, possivelmente devido a presença de condomínios alto padrão na região que possuem sistema próprio de tratamento de esgoto. As demais amostras apresentaram valores de 0,2 a 0,8, intervalo considerado um indicativo de aporte misto, esgoto tratado e bruto simultaneamente. Observe que as amostras que apresentaram os menores valores para $\text{e-cop}/\text{cop}$ (próximos a 0,2) são as mesmas que apresentaram as maiores concentrações absolutas e relativas de coprostanol, T7 e T9. Combinando os resultados de concentrações absolutas e relativas de coprostanol e os demais índices diagnósticos, pode-se considerar o igarapé Tarumã-Açu como um ambiente que apresenta uma contaminação por esgoto doméstico de leve a moderada, dependendo do ponto de amostragem.

4.5 Comparação entre os igarapés de estudo e com outros ambientes

Apesar dos inúmeros trabalhos com esteróis, ainda não há um consenso em relação ao nível de coprostanol em sedimentos que seja indicativo de contaminação por esgoto doméstico (TOLOSA et al., 2014). Isso é devido aos vários parâmetros que influenciam o acúmulo de MO, como condição climática da região, vazão d'água do corpo aquático e teores de argila, silte e areia dos sedimentos (KILLOPS & KILLOPS, 2005). Geralmente, valores de concentração de coprostanol de 10 ng.g^{-1} em sedimentos costeiros são considerados aceitáveis para ambientes preservados. Valores acima de 100 ng g^{-1} são geralmente considerados confirmativos de contaminação por esgoto e valores acima de 500 ng g^{-1} são considerados um indicativo de significativa contaminação por esgoto doméstico (TOLOSA et al., 2014; CARREIRA et al., 2011).

Diante desses valores, as concentrações de coprostanol observadas neste estudo indicam contaminação acentuada no igarapé do Mindu e do Quarenta e contaminação leve a moderada no igarapé Tarumã-Açu.

O Mindu é o igarapé mais extenso na área urbana de Manaus. A bacia hidrográfica deste igarapé ocupa aproximadamente 1/4 do território urbano ocupado por cerca de 30% da população (BORGES et al., 2011). Ao cruzar inúmeros bairros, o igarapé do Mindu recebe grande quantidade de esgoto não tratado, resultando na grande quantidade de esterol fecal encontrado em todos os pontos de coleta. A maior parte do igarapé do Quarenta está localizada na zona leste de Manaus, sendo o segundo maior igarapé da área urbana de Manaus. O igarapé do Quarenta atravessa bairros populosos da cidade, como Educandos, Raiz e Crespo, além também da área industrial de Manaus (BRINGEL, 1986). Os altos níveis de esterol fecal encontrado nas amostras de sedimento do igarapé do Quarenta têm origem em parte dos efluentes industriais e, principalmente, do esgoto doméstico de bairros populosos mais próximos à região central da cidade.

Em suma, esses igarapés manifestam-se em vários níveis de degradação ambiental produzidos não apenas pelo adensamento populacional, mas também pela ausência de uma infraestrutura urbana e de políticas públicas que possam impedir o lançamento de lixo e melhore o sistema de rede de esgoto nos igarapés. Caso não se reverta esse quadro, os níveis de degradação ambiental tenderão a

aumentar contaminando cada vez às águas dos igarapés, lençol freático e o solo (ALBUQUERQUE, 2012).

Já o igarapé Tarumã-Açu, localizado na zona oeste da cidade, se encontra ao lado do perímetro urbano e compõe um dos maiores tributários do rio Negro na região. Embora as concentrações absolutas e relativas de coprostanol observadas para as amostras do igarapé Tarumã-Açu sejam menores que àquelas observadas para os igarapés completamente inseridos na área urbana de Manaus, elas já indicam início de contaminação por esgoto doméstico. Alguns pontos do igarapé Tarumã-Açu apresentaram epicoprostanol em concentrações similares, ou mesmo maiores, àquelas encontradas para coprostanol, indicando presença de esgoto tratado. Isso ocorre, pois no processo de tratamento de esgoto, o coprostanol é convertido em epicoprostanol em condições anóxicas (GRIMALT et al., 1990). Possivelmente, o aporte de epicoprostanol é decorrente do descarte de águas residuais provenientes de condomínios de alto padrão da região que dispõem de exclusivas estações de tratamento de esgoto. Esse comportamento foi observado apenas no igarapé Tarumã-Açu, sendo que o aporte de esgoto tratado nos igarapés do Mindu e Tarumã-Açu é possivelmente mascarado devido ao alto aporte de esgoto sem tratamento.

O gráfico de dispersão tridimensional apresentado na Figura 16 ilustra a separação de dois grupos de amostras de acordo com os índices cop/ (cop+ colestanol), cop/ colesterol e e-cop/cop.

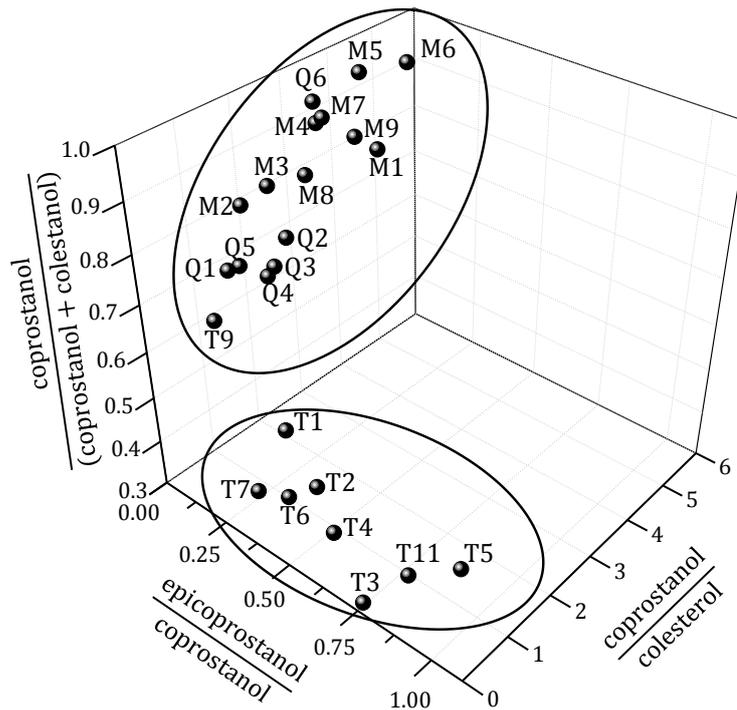


Figura 16: Gráfico de dispersão tridimensional construído com base nos índices coprostanol / (coprostanol + colestanol), coprostanol/colesterol e epicoprostanol/coprostanol.

A Figura 16 apresenta claramente a separação de dois grupos: I) todas as amostras dos igarapés completamente inseridos na área urbana (Mindu e Quarenta) que apresentaram todos os parâmetros para serem classificadas como altamente contaminadas por esgoto doméstico e II) amostras do igarapé parcialmente inserido na área urbana (Tarumã-Açu) que apresentaram parâmetros que indicam contaminação leve a moderada. Apenas a amostra T9 foi classificada, juntamente com as amostras dos igarapés do Mindu e Quarenta, como altamente contaminada.

A comparação das concentrações de coprostanol encontradas nas amostras de sedimentos desse estudo com as reportadas para ambientes ao redor do mundo é apresentada na tabela 13.

Tabela 13: Comparação dos níveis de coprostanol em amostras de sedimentos de diversos ambientes.

Local	Concentração de coprostanol (ng g ⁻¹)	Referência
Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape (Brasil)	10–44	BATAGLION et al. (2016)

Complexo Delta do Níger (Nigéria)	6,38–45,53	SOJINU et al. (2012)
Estuário do Rio São Francisco	10-101	FRENA et al. (2016)
Igarapé Tarumã-Açu	5,0–141	Este estudo
Rio Langat (Malásia)	2,8–420	ADNAN et al. (2012)
Península do Iucatã (México)	0,3–2396	CABRERA et al. (2014)
Baía de Santa Mônica (EUA)	500 – 5100	VENKATESAN & KAPLAN (1990)
Mar Negro, (Rússia)	1 – 5400	READMAN et al. (2005)
Baía de Cienfuegos (Cuba)	10–5400	TOLOSA et al. (2014)
Igarapé do Mindu	600–6112	Este estudo
Rio Capibaribe	519 – 7315	FERNANDES et al. (1999)
Rio Mississippi (EUA)	100-7500	WRITER et al. (1995)
Sistema Estuarino de Itajaí-Açu	4 – 8930	FRENA et al (2016)
Rio Siak (Indonésia)	50–10530	LIEBEZEIT & WÖSTMANN (2010)
Porto de Boston (EUA)	6200 a 12000	EGANHOUSE & SHERBLOM (2001)
Igarapé do Quarenta	509–12829	Este estudo
Baía de Guanabara	330 – 40000	CARREIRA et al. (2004)
Baía de Narragansett (EUA)	130 – 39300	LE BLANC et al. (1992)
Rio de Formosa (Portugal)	100 – 41800	MUDGE & BEBIANNO (1997)
Lagoa de Venezia (Itália)	40 – 44000	FATTORE et al. (1996)
Rio Kaoping (Taiwan)	1000-58000	JENG & HAN (1996)
Rio de la Plata (Argentina)	590-70800	SPERANZA et al. (2018)

Comparando com outros ambientes brasileiros, as concentrações de coprostanol determinadas neste estudo são geralmente muito maiores que as relatadas para o Estuário do Rio São Francisco e Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape, mas são comparáveis àquelas encontradas para o Sistema Estuarino de Itajaí-Açu e Rio Capibaribe, e pouco menores que as encontradas para a altamente contaminada Baía de Guanabara. Comparando com ambientes ao redor do mundo, as concentrações de coprostanol determinadas neste estudo são, de forma geral, muito maiores que aquelas relatadas para o Rio Langat (Malásia), Complexo Delta do Níger (Nigéria), Península do Iucatã (México), mas comparáveis àquelas encontradas para o Mar Negro em Sochi, (Rússia), Porto de Boston (EUA), Rio Mississippi (EUA), Baía de Cienfuegos (Cuba) e Rio Siak (Indonésia).

Entretanto, elas são pouco menores que as encontradas para áreas altamente contaminadas, como Rio de la Plata (Argentina), Baía de Narragansett (EUA), Baía de Santa Mônica (EUA), Lagoa de Venezia (Itália), Rio de Formosa (Portugal) e para o Rio Kaoping (Taiwan).

5. CONCLUSÃO

A ampla distribuição de esteróis nas amostras sedimentares representou diversas fontes de MO para o ambiente de estudo, incluindo plantas terrestres, algas e esgoto doméstico. Os resultados deste trabalho mostram uma contaminação acentuada por esgoto doméstico não tratado nos igarapés do Mindu e Quarenta, os quais atravessam a área urbana de Manaus, e uma contaminação leve a moderada no igarapé Tarumã-Açu.

Apesar de alguns trabalhos reportarem a contaminação dos corpos aquáticos de Manaus, este trabalho representa o primeiro estudo na região a utilizar esteróis para avaliar os níveis de contaminação de igarapés por esgoto doméstico. Os resultados obtidos neste estudo forneceram informações úteis para acessar os níveis de esteróis biomarcadores e as fontes desses compostos nos igarapés do Mindu, Quarenta e Tarumã-Açu. Podendo, assim, contribuir para futuras pesquisas relacionadas a melhorias dos igarapés de Manaus através de políticas ambientais capazes de propor a minimização dos níveis de contaminação pelo despejo de esgoto doméstico não tratado.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU-MOTA, M. et al. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. **Chemosphere**. 2013.
- ADNAN, N.H., et al. Faecal sterols as sewage markers in the Langat River, Malaysia: integration of biomarker and multivariate statistical approaches. **Journal of Environmental Sciences**. 24. 1600-1608. 2012.
- ALBUQUERQUE, A. R. da C., Bacia hidrográfica: unidade de planejamento ambiental. **Revista geonorte**, Edição Especial. 4(4). 201- 209. 2012.
- ALHO, C. J. R. et al. Amazonian freshwater habitats experiencing environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. **Ambio** 44. 412-425. 2015.
- AMANN, B. et al. Spring temperature variability and eutrophication history inferred from sedimentary pigments in the varved sediments of lake Żabińskie, north-eastern Poland, AD 1907–2008. **Global Planet. Change**. 123. 86-96. 2014.
- BATAGLION, G. A. et al. Determination of geochemically important sterols and triterpenols in sediments using UHPLC-MS/MS. **Anal. Chem**. 87. 7771-7778. 2015.
- BATAGLION, G. A. et al. Quantification of Sterol and Triterpenol Biomarkers in Sediments of the Cananéia-Iguape Estuarine-Lagoonal System (Brazil) by UHPLC-MS/MS. **International Journal of Analytical Chemistry**. 2016.
- BIRK, J. J. et al. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1242 1-10. 2012.
- BLAUM, K & LITVINOV Y. A. Preface / **International Journal of Mass Spectrometry**. 1(2). 349-350. 2013.
- BRINGEL, S.R.B. Estudo do nível de poluição nos igarapés do Quarenta e do Parque Dez de Novembro. Relatório Técnico. Instituto de Tecnologia da Amazônia-UTAM. Manaus, 1986. 61 p.

BUJAGIC, I. M. et al. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia, **Environmental Pollution**. 213. 76-83. 2016.

BUSTILLOS, O. V. et al. **A espectrometria de massas quadrupolar**. 1 ed. Vol. 1. Scortecci. São Paulo. 2003.

CAMILLERI, J., VULLIET E. Determination of steroid hormones in sediments based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (modified-QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Anal. Methods**.7. 9577-9586. 2015.

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

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

COOKS R. G.; JARMUSCH, A. K.; WLEKLINSKI, M. Direct analysis of complex mixtures by mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. 377. 709-718. 2015.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Vol. 1. Wiley. New Jersey. 2007.

EGANHOUSE, R. P.; SHERBLOM, P. M. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbo. **Mar. Environ. Res.** 51(1). 51-74. 2001.

ENGEL, M.; MACKO, S. A. **Organic geochemistry: Principles and applications**. 1 ed. Vol. 2. New York . Springer science and Business Media. NY. 2013.

ENKE, C.G. The science of chemical analysis and the technique of mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**. 212. 1-11. 2001.

FANG, J. et al. Source characterization of sedimentary organic matter using molecular and stable carbon isotopic composition of n-alkanes and fatty acids in sediment core from Lake Dianchi, China. **Sci. Total Environ.** p 410–421. 2014.

FATTORE, E., et al. Sterols in sediment samples from Venice Lagoon, Italy. **Chemosphere.** 33(1). 2383-2393. 1996.

FERNANDES, M. B. et al. Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in an eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil. **Sci. Total Environ.** 231 (1). 1-16. 1999.

FERREIRA, E. J. G.; SANTOS, G. M.; LEÃO, E. L. A. (Eds). Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia. In: SILVA, E. N. DOS S.; SILVA, C. P. DE D. A expansão de Manaus como exemplo do processo de extinção dos igarapés. **INPA**, Manaus. 2. 25-42. 1993.

FRENA, M. et al Evaluation of anthropogenic contamination using sterol markers in a tropical estuarine system of northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin.** 109. 619-623. 2016.

FRENA, M. et al. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). **Science of the Total Environment.** 544. p 432-438. 2016.

GOMES, H. G. Investigation of sewage contamination using steroid indexes in sediments of the Guajará Estuary (Amazon coast, Brazil). Brazilian. **Journal of oceanography.** 63(4). 501-510. 2015.

GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** 80, 5678-5683. 2008.

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

GUEDES, J. de A. Geoquímica e Meio Ambiente, **GEO Temas.** 2(1) . 145-151. 2012.
HAJDUK et al., Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. **Clinica Chimica Acta.** 458. 84-98. 2016.

HAIJ-M, M. et al. Wastewater micropollutants as tracers of sewage contamination: analysis of combined sewer overflow and stream sediments. **Environ. Sci.: Processes Impacts**. 16. 2442-2450. 2014.

HANSEN, M. C., et al. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. **Science**. 342(6160). 850-853. 2013.

HARWOOD, J. J.; Molecular markers for identifying municipal, domestic and agricultural sources of organic matter in natural Waters. **Chemosphere**. 959(1). 3-8. 2014.

HOFFMANN & STROOBANT. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. 3 ed. Wiley. Englad. 2007.

JENG, W., HAN, B. Coprostanol in a sediment core from the anoxic Tan-Shui Estuary, Taiwan. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. 42(2). 727-735. 1996.

JESUS, M. S.; et al. Cases distribution of leptospirosis in City of Manaus, State of Amazonas, Brazil, 2000-2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 45(6). 713-716, 2012.

KARASEK. F.W. & CLEMENT, R.E. **Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques**. 1 ed. Elsevier science amsterdan. 2012.

KAUFMANN, A. et al. Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "Where is the crossover point?" **Analytica Chimica Acta**. 673. 60-72. 2010.

KAWAKAMI, S. K. & MONTONE, R. C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. **Chem. Soc.**13(2). 226-232, 2002.

KILLOPS, S.D; KILLOPS, V. J. **Introduction to organic geochemistry**. 2 ed. USA. Blackwell Publishing. 2005.

LA ROVERE, A.L.N. Crespo, S. **Projeto geo cidades: relatório ambiental urbano integrado: GEO MANAUS**. Rio de Janeiro, Consórcio Parceria 21. 2002.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia chromatographica**. 1(22). 2009.

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

LEBLANC, L. A. et al. The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. **Estuarine Coastal Shelf Sci**. 34(5). 439. 1992.

LEEMING, R. et al. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. **Wat. Res**. 30(12). 2893-2900. 1996.

LEMBCKE, J., et al. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**. 46. 21-26. 2005.

LIEBEZEIT, G., WÖSTMANN, R. Coprostanol in Siak River sediments, E Sumatra, Indonesia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 85. 585-588. 2010.

LU & MEYERS. Sediment lipid biomarkers as recorders of the contamination and cultural eutrophication of Lake Erie, 1909-2003. **Organic Geochemistry** . 40. 912-921. 2009.

MARQUES, J. P. C ; PINHEIRO E. DA S. O desflorestamento na metrópole da Amazônia Central: Manaus/AM. In: Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio de 2011, **INPE** p.2882.

MARTIN, C. C. et al. Sewage organic markers in surface sediments around the Brazilian Antarctic station: Results from the 2009/10 austral summer and historical tendencies. **Marine Pollution Bulletin**. 64. 2867-2870. 2012.

MARTINS, C. C. et al. Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**. 78. 218-223. 2014.

Method EPA 3540 C: Soxhlet Extraction. Ohio, **USEPA**. 1996.

MO. S., et al. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Lipids**. 48. 949-956. 2013.

MUDGE, S. M.& LINTERN, D. G, Comparison of Sterol Biomarkers for Sewage with other Measures in Victoria Harbour, B.C., Canada Estuarine. **Coastal Shelf Sci**. 46. 27-38. 1999.

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

NOGUEIRA. A. C. F.; SANSON, F.; PESSOA K. A expansão urbana e demográfica da cidade de Manaus e seus impactos ambientais. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, **INPE**, 5427-5434, Florianópolis. Brasil, 21-26 abril 2007.

PINTO. A. G. N. et al. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. **Acta Amazônica**. 39(3). 627- 638. 2009.

RAINVILLE, P. D. et al. Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 59. 138-150. 2012.

RAU, M. et al. Avaliação de Biomarcadores Geoquímicos e Salinidade em Perfis Sedimentares na Lagoa do Ribeirão em Paulo Lopes, SC. **Rev. Virtual Quim**. 5 (2). 201-221. 2013.

READMAN, J.W., et al. The use of steroid markers to assess sewage contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**. 50 (3). 310-318. 2005.

RESENDE, M. F. et al. The analysis of faecal sterols in sediment samples by HPLC-UV using ultrasound-assisted treatment. **Anal. Methods**. 6. 9581-9587. 2014.

RODRIGUES-ALLER, M. et al. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**. 1292. 2-18. 2013.

SANTANA, G. P. Sediment-distributed metal from the Manaus Industrial District (MID) Region (AM - Brazil). **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**.1. 55-64. 2015.

SHARMA, K, S. Mass spectrometry-The early years. **International Journal of Mass Spectrometry**. 3(8). 349-350. 2013.

SIMONEIT, B. R. T. A review of current applications of mass spectrometry for biomarker/molecular tracer elucidations. **Mass Spectrom. Rev.** 24. 719–765. 2005.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução Marco Grassi. 8. Ed. Thomson. São Paulo-SP. 2007.

SOJINU, S. O. et al. Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and n-alkanes as indicators. **Science of the Total Environment**. 441. 89-96. 2012.

SPERANZA E. D., et al. Early diagenetic alterations of sterol biomarkers during particle settling and burial in polluted and pristine areas of the Rio de la Plata Basin. **Organic Geochemistry**. 117. 1–11. 2018.

STANDING, K. G. & VESTAL, M. L. Time-of-flight mass spectrometry (TOFMS): From niche to mainstream. **International Journal of Mass Spectrometry**. 377. 295-308. 2015.

STRONG, D. J. et al., Organic matter distribution in the modern sediments of the Pearl River Estuary. **Organic Geochemistry**. 49. 68-82. 2012.

TEIXEIRA, J. C.; GUILHERMINO, R. L. Análise da associação entre saneamento e saúde nos Estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados indicadores e dados básicos para a Saúde 2003– IDB 2003. **Eng. sanit. ambient**. 11(3). 277-282. 2006.

TOLOSA, I. et al. Steroid markers to assess sewage and other sources of organic contaminants in surface sediments of Cienfuegos Bay, Cuba. **Mar. Pollut. Bull.** 86(9). 84-90. 2014.

VAL, A. L., et al. **Amazonia: Water Resources and Sustainability**. 1 ed. Springer eBook. 2017.

VENKATESAN, M. I.; KAPLAN, I. R. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica basin, southern California. **Environ. Sci. Technol.** 24(2). 208-214. 1990.

VENKATESAN, M.I. & SANTIAGO, C.A. Sterols in oceans sediments: novel tracers to examine habits of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. **Mar. Biol.** 102. 431-437. 1989.

VENTURINE, N. et al. A multi-molecular marker assessment of organic pollution in shore sediments from the Río de la Plata Estuary, SW Atlantic. **Marine Pollution Bulletin.** 91. 461-475. 2015.

VIEIRA , C.B. The Impact of the Extreme Amazonian Flood Season on the Incidence of Viral Gastroenteritis Cases. **Food Environ Virol.** 2017.

VIEIRA, C. B. Viruses surveillance under different season scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. **Food Environ Virol.** 8. 57-69. 2016.

VOLKMAN, J, K. Sterols in microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol.** 60:495-506. 2003.

WISNIESKI, E. et al. Validação de um método analítico para determinação de marcadores orgânicos geoquímicos em amostras de sedimentos marinhos. **Quim. Nova.** 39 (8). 1007-1014, 2016.

WRITER. J.H., et al. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the fecal sterol, coprostanol. **Water Research.** 29. (1). 1427-1436. 1995.

ZOCATELLI, R., et al. Fecal biomarker imprints as indicators of past human land uses: Source distinction and preservation potential in archaeological and natural archives. *Journal of Archaeological Science* 81.79-89. 2017.

APÊNDICE

Apêndice I. Cromatogramas representativos, obtidos por LC-MS/MS para uma mistura de todos os analitos, apresentando as transições de quantificação e confirmação para os esteróis de interesse.

