



Raquel Lameiro Gaspar

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e
Bioquímica

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS ATRAVÉS DE GC-MSD EM SEDIMENTOS ESTUARINOS E OCEÂNICOS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Química e Bioquímica

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2022



Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos através de GC-MSD em sedimentos estuarinos e oceânicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Raquel Lameiro Gaspar

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Doutora Carla Maria Ferreira Mesquita Palma,
Chefe da Divisão de Química e Poluição do Meio Marinho, Instituto Hidrográfico

Coorientadores: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Associado, NOVA University Lisbon

Júri:

Presidente: Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa Dionísio Andrade

Professora Associada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Investigador, Centro de Química Estrutural, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Orientadora: Doutora Carla Maria Ferreira Mesquita Palma

Chefe da Divisão de Química e Poluição do Meio Marinho, Instituto Hidrográfico

Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos através de GC-MS em sedimentos estuarinos e oceânicos

Copyright © Raquel Lameiro Gaspar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatory lorem ipsum.

AGRADECIMENTOS

Esta etapa não seria concluída sem a ajuda de muitas pessoas que me apoiaram durante todo o percurso. Queria começar por agradecer à minha orientadora, Doutora Carla Palma, por ter proposto este tema em conjunto comigo e por me ter ajudado sempre que tinha dúvidas. Queria também salientar todo o apoio demonstrado durante todo o estágio, revisões do artigo elaborado no âmbito das Jornadas da Hidrografia e da dissertação de mestrado, e por me ter integrado com profissionalismo, simpatia e amabilidade na Divisão de Química e Poluição do Meio Marinho.

Ao meu orientador, professor Mário Eusébio, pela elevada competência e confiança depositada e pelo constante apoio e encorajamento. Foi e continua a ser um modelo a seguir e foi fundamental para tornar este mestrado numa agradável experiência de aprendizagem. Sou grata pelas suas palavras de incentivo em diversos períodos: antes e durante este estágio.

Não queria deixar de agradecer ao Instituto Hidrográfico (IH), designadamente aos Diretores-gerais e Técnicos que apoiaram e autorizaram o desenvolvimento da investigação associada a este trabalho, bem como pelas suas palavras de motivação e ensinamentos que me transmitiram ao longo da elaboração da dissertação e da realização do estágio.

Agradeço também à Doutora Ana Catarina Rocha, por me ter aturado durante o decorrer do estágio, despendido de dias e tardes, por me ter auxiliado quando precisava e por me ter acompanhado neste ano cheio de desafios. Quero agradecer a todas as pessoas com quem tive a oportunidade de trabalhar no IH, por tão carinhosamente me terem acolhido, integrado e ajudado quando era preciso. Aos colegas, mas sobretudo amigos de trabalho mais próximos, Eng. Paula Santos, Rute Martins, Maria João Freire, Filipa Martins, José Almeida e ao Gonçalo Gomes, um agradecimento especial pela vossa paciência, palavras de incentivo e apoio dedicado ao longo deste último ano.

Aos meus amigos que sempre me ajudaram e apoiaram, por me terem distraído e motivado quando o desespero já apertava. A toda a minha família pelo apoio e incentivo que me deram durante este ano. Por fim, mas não menos importantes, aos meus pais pelo apoio incondicional, força e pela motivação revelada em cada palavra e sem os quais jamais chegaria até aqui. Por estarem sempre comigo. Muito obrigada a todos,

Raquel Gaspar

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more,
so that we may fear less.”*

– Marie Curie

RESUMO

A costa portuguesa é bastante evidenciada pela sua extensão e pela qualidade de peixe e moluscos para consumo existente. Para este setor evoluir, é essencial fornecer a informação técnica necessária, crucial para a seleção do local de instalação de unidades de produção, neste âmbito surgiu o projeto AQUIMAR.

A monitorização do ambiente marinho passa pelo estudo de contaminantes químicos, orgânicos e inorgânicos, podendo ser efetuada uma constante avaliação sobre o mesmo. De entre os contaminantes orgânicos, são de elevada relevância os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), devido às suas características nocivas para o meio marinho.

Com este trabalho foi efetuada a quantificação (através da técnica de Cromatografia Gasosa - Detecção por Espectrometria de Massa) e a avaliação das possíveis fontes, dos PAHs em amostras de sedimentos superficiais, recolhidos em cinco áreas da costa continental portuguesa.

Dos resultados obtidos pode-se destacar que, para a generalidade das áreas, os PAHs são de origem pirogénica, ou seja, proveniente da queima de biomassa e de combustíveis fósseis. Contudo algumas das estações amostradas continham PAHs de origem petrogénica.

Relativamente ao nível de contaminação em PAHs nas amostras de sedimento, de acordo com a Portaria n.º 1450/2002 de 12 de novembro, concluiu-se que algumas estações das estudadas estão classificadas como “contaminação vestigiária”.

Os resultados obtidos em termos de somatórios de PAHs demonstraram que a zona costeira do Algarve apresenta uma maior influência antropogénica.

Do estudo efetuado pode-se concluir que tendo em consideração os resultados obtidos em termos de somatório de PAHs, a área do Algarve e do estuário do Sado apresentam maiores concentrações, pelo que estes locais devem ser avaliados juntamente com todas as outras variáveis estudadas no âmbito do projeto AQUIMAR, apurando se são locais adequados para a instalação de mais unidades de aquicultura.

Palavras-chave: Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa, Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, Sedimentos estuarinos, Sedimentos oceânicos

ABSTRACT

The portuguese coast is known for its extension and excellence of the quality of fish and shellfish for consumption. For this sector to evolve, it is essential to provide the necessary technical information, crucial for the selection of production units in this context the AQUIMAR project emerged.

Monitoring the marine environment involves the study of chemical, organic and inorganic contaminants. Among the organic contaminants, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) have high relevance, due to their harmful characteristics for the marine environment.

With this work, one of the goals was the quantification (by applying Gas Chromatography - Detection by Mass Spectrometry), it was also evaluated the possible sources of PAHs in samples of superficial sediments collected in five areas of the Portuguese mainland coast.

From the results obtained, it can be highlighted that, for most areas, PAHs are of pyrogenic origin, that is, from the burning of biomass and fossil fuels. However, some of the stations sampled contained PAHs of petrogenic origin.

Regarding the level of contamination in PAHs in the sediment samples, evaluated under the ordinance 1450/2007 some of the studied areas are classified as having "trace contamination".

The results obtained for the different sums of PAHs showed that the coastal zone of the Algarve has a greater anthropogenic influence. It should also be noted that the highest proportion of carcinogenic PAHs was Ria Formosa.

From the study carried out, it can be concluded that, considering the results obtained in terms of the sum of PAHs, the area of the Algarve and the Sado estuary have higher concentrations, so these places should be evaluated together with all the other variables studied within the scope of the AQUIMAR project, to assess which are the suitable locations for the installation of more aquaculture units.

Keywords: Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Estuarine Sediments, Oceanic Sediments.

Índice de matérias

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	2
1.1.1 Acreditação e a NP EN ISO/IEC 17025	5
1.1.2 Projeto AQUIMAR	5
1.1.3 Legislação e documentos guia	6
1.2 OBJETIVOS	7
1.3 HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	8
1.3.1 Características físico-químicas	10
1.4 DESCRIÇÃO DO PROBLEMA	11
1.5 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	12
2. ESTADO DA ARTE	13
2.1 HIDROCARBONETOS	14
2.1.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	14
2.2 ORIGEM DOS PAHS	15
2.2.1 Distribuição de PAHs por número de anel	16
2.2.2 Origem do perileno	16
2.2.3 Razões de diagnóstico	17
2.2.4 Contaminação de sedimentos	18
2.3 PAHS EM SEDIMENTOS OCEÂNICOS	19
2.4 PAHS EM SEDIMENTOS ESTUARINOS	20
2.5 PAHS NA FAUNA MARINHA	21
2.6 AQUICULTURA	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ÁREA DE ESTUDO	26
3.2 AMOSTRAS DE SEDIMENTOS	30
3.3 PROCEDIMENTO LABORATORIAL	31
3.3.1 Reagentes	31
3.3.2 Padrões	31
3.3.2.1 Soluções-padrão mãe	33
3.3.2.2 Soluções-padrão de trabalho	33
3.3.2.3 Calibradores	34
3.3.2.4 Gama de trabalho	35
3.3.2.5 Soluções-padrão de controlo	36
3.3.3 Equipamentos	37
3.3.4 Preparação de reagentes	38
3.3.4.1 Solução de eluição	38

3.3.4.2 Sílica desativada a 5%	38
3.3.4.3 Alumina desativada a 5%	38
3.3.4.4 Sulfato de Sódio Anidro.....	38
3.3.4.5 Terra de Diatomáceas (DE)	38
3.3.5 <i>Preparação das amostras</i>	39
3.3.6 <i>Determinação do peso seco</i>	39
3.3.7 <i>Técnica de extração</i>	40
3.3.8 <i>Remoção do enxofre</i>	43
3.3.9 <i>Concentração dos extratos</i>	43
3.3.10 <i>Purificação dos extratos</i>	44
3.3.11 <i>Concentração e aferição dos extratos purificados</i>	44
3.3.12 <i>Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas</i>	45
3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PAHS	46
3.5 CONTROLO DE QUALIDADE	49
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS	51
4.1 DISTRIBUIÇÃO E FONTES DE PAHS	52
4.1.1 <i>Área D</i>	53
4.1.2 <i>Área E</i>	54
4.1.3 <i>Ria de Aveiro</i>	55
4.1.4 <i>Estuário do sado</i>	56
4.1.5 <i>Rio Mira</i>	56
4.1.6 <i>Ria Formosa</i>	57
4.2 RAZÕES DE DIAGNÓSTICO	60
4.3 ORIGEM DO PERILENO	62
4.4 HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS COM POTENCIAL CARCINOGENICO	63
5. CONCLUSÃO	67
BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	83
ANEXO A - COORDENADAS DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM.....	84
ANEXO B - MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DE PAHS.....	86
<i>B.1 Preparação das amostras de sedimento</i>	86
<i>B.2 Técnica de extração</i>	86
<i>B.3 Técnicas cromatográficas</i>	87
<i>B.4 Cromatografia em fase gasosa</i>	87
<i>B.5 Espectrometria de massa</i>	87
<i>B.6 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa</i>	88
ANEXO C - CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - ÁREAS DE AMOSTRAGEM PARA O SEDIMENTO, NO ÂMBITO DO PROJETO AQUIMAR.	26
FIGURA 3.2 - ÁREAS DE AMOSTRAGEM ADICIONAIS INCLUÍDAS NO TRATAMENTO DE DADOS.	26
FIGURA 3.3 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA ÁREA A (VIANA DO CASTELO AO PORTO).	27
FIGURA 3.4 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA ÁREA B (AVEIRO À FIGUEIRA DA FOZ).	27
FIGURA 3.5 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA ÁREA C (PENICHE).	28
FIGURA 3.6 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA ÁREA D (SETÚBAL A SINES).	28
FIGURA 3.7 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA ÁREA E (ALGARVE); (A) SAGRES A ALBUFEIRA; (B) ALBUFEIRA A TAVIRA	28
FIGURA 3.8 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA RIA DE AVEIRO.	29
FIGURA 3.9 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NO ESTUÁRIO DO SADO.	29
<i>FIGURA 3.10 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NO RIO MIRA.</i>	29
FIGURA 3.11 - ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM DE SEDIMENTO NA RIA FORMOSA.	29
FIGURA 4.1 - GRÁFICOS CIRCULARES REPRESENTATIVOS DA DISTRIBUIÇÃO POR NÚMERO DE ANEL E SOMATÓRIO DOS PAHS ESTUDADOS.	52
FIGURA 4.2 - ESTAÇÕES AMOSTRADAS E ETAR DA ÁREA D E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS.	53
FIGURA 4.3 - ESTAÇÕES AMOSTRADAS DA ÁREA E E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS; (A) ENTRE SAGRES E ALBUFEIRA; (B) ENTRE ALBUFEIRA E TAVIRA.	54
FIGURA 4.4 - ESTAÇÕES AMOSTRADAS DA ÁREA RA E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS.	55
FIGURA 4.5 - ESTAÇÕES AMOSTRADAS DA ÁREA SA E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS.	56
FIGURA 4.6 - ESTAÇÕES AMOSTRADAS DA ÁREA MI E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS.	56
FIGURA 4.7 – ESTAÇÕES AMOSTRADAS DA ÁREA RF E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO E SOMATÓRIO DE PAHS.	57
FIGURA 4.8 – DISTRIBUIÇÃO DE TEOR DE PAHS POR PONTO DE AMOSTRAGEM; AS ESTAÇÕES NÃO REFERIDAS APRESENTAM OS TEORES DE PAHS < LOQ; (A) AMOSTRAS DE SEDIMENTO OCEÂNICO E (B) AMOSTRAS DE SEDIMENTO ESTUARINO.	58
FIGURA 4.9 - RAZÕES DE DIAGNÓSTICO E FAIXAS LÍMITROFES (DIFERENCIAÇÃO DE FONTES) (TOBISZEWSKI E NAMIEŚNIK, 2012).	61
FIGURA 4.10 - PERCENTAGEM DE PER RELATIVAMENTE A Σ 5-ISÓMEROS E A Σ 18 PAH; Σ 5-ISÓMEROS: B(B+k)F, BEP, BAP, DBA E PER.	62
FIGURA 4.11 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO SOMATÓRIO DOS PAHS COM POTENCIAL CARCINOGENÉTICO NA ÁREA D.	63

FIGURA 4.12 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO SOMATÓRIO DOS PAHS COM POTENCIAL CARCINOGENICO NA ÁREA E.....	64
FIGURA 4.13 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO SOMATÓRIO DOS PAHS COM POTENCIAL CARCINOGENICO NA ÁREA RA.	64
FIGURA 4.14 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO SOMATÓRIO DOS PAHS COM POTENCIAL CARCINOGENICO NA ÁREA SA.	65
FIGURA 4.15 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO SOMATÓRIO DOS PAHS COM POTENCIAL CARCINOGENICO NA ÁREA RF.	65

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 - FÓRMULA QUÍMICA E ESTRUTURA DOS 16 PAHS DA US EPA.....	9
TABELA 1.2 - FÓRMULA QUÍMICA E ESTRUTURA DOS PAHS ADICIONAIS ESTUDADOS.....	10
TABELA 1.3 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PAHS ESTUDADOS.....	10
TABELA 3.1 – REAGENTES E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	31
TABELA 3.2 - REAGENTES UTILIZADOS PARA PREPARAR AS SOLUÇÕES-PADRÃO MÃE E DE TRABALHO, E CALIBRADORES.....	32
TABELA 3.3 - SOLUÇÕES-PADRÃO MÃE E DE TRABALHO USADAS, CONCENTRAÇÕES E UTILIZAÇÃO DAS MESMAS.....	32
TABELA 3.4 - SOLUÇÕES-PADRÃO DE TRABALHO UTILIZADAS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES.....	33
TABELA 3.5 – SOLUÇÃO PADRÃO USADAS PARA OBTENÇÃO DOS CALIBRADORES.....	34
TABELA 3.6 - PAHS E RESPECTIVA GAMA DE TRABALHO.....	35
TABELA 3.7 – SOLUÇÕES-PADRÃO DE CONTROLO PRETENDIDAS PARA UM VOLUME DE SOLUÇÃO DE 10 ML.....	36
TABELA 3.8 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS DURANTE A PARTE EXPERIMENTAL.....	37
TABELA 3.9 – PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA A EXTRAÇÃO ASE.....	41
TABELA 3.10 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO ASE.....	43
TABELA 3.11 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO DE AQUISIÇÃO USADO NO GC-MS DA AGILENT TECHNOLOGIES.....	45
TABELA 3.12 - IÕES USADOS NA QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS PAHS ESTUDADOS.....	46
TABELA 4.1 – RESULTADOS DO SOMATÓRIO DE PAHS EM DIFERENTES ESTUDOS.....	59
TABELA A.1 - NOMENCLATURA E COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS OCEÂNICAS ANALISADAS.....	84
TABELA A.2 - NOMENCLATURA E LIMITES DAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS ESTUARINAS.....	85

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

A – Antraceno

Ace – Acenafteno

Ace-d10 – Acenafteno deuterado

Acy – Acenaftileno

AF – Amostra(s) fortificada(s)

ASE – Extração Acelerada por Solventes (*Accelerated Solvent Extraction*)

bs – Base seca

BaA – Benzo(a)antraceno

BaP – Benzo(a)pireno

BbF– Benzo(b)fluoranteno

BeP – Benzo(e)pireno

BghiP – Benzo(g,h,i)perileno

BkF– Benzo(k)fluoranteno

BP – Branco de procedimento

CA – Critério(s) de aceitação

Chr – Criseno

Chr-d12 – Criseno deuterado

CPAHs – PAHs com potencial carcinogénico

DBA – Dibenzo(a,h)antraceno

DBT – Dibenzotiofeno

DE – Terra de diatomáceas

DCM – Diclorometano

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

F – Fluoreno

Fluo – Fluoranteno

GC – Cromatografia em fase gasosa

GC-MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa

GPS – Sistema de Posicionamento Global

GT – Gama(s) de trabalho

HMW – Elevado Peso Molecular (*High Molecular Weight*)

Ind – Indeno(1,2,3-cd)pireno

IH – Instituto Hidrográfico

IPAC – Instituto Português de Acreditação

LD – Limite(s) de deteção

LMW – Baixo Peso Molecular (*Low Molecular Weight*)

LQ – Limite(s) de quantificação

m/z – Massa/carga do ião

MS – Espectrometria de massa / Espetrómetro de massa

N – Naftaleno

N-d8 – Naftaleno deuterado

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (*Sustainable Development Goals*)

P – Pireno

PAH(s) – Hidrocarboneto(s) aromático(s) policíclico(s)

PAHs US EPA – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

PC – Padrão/Padrões de controlo

PE – Ponto de ebulição

Per – Perileno

Per-d12 – Perileno deuterado

PF – Ponto de fusão

Phe – Fenantreno

Phe-d12 – Fenantreno deuterado

PI – Padrão/Padrões interno(s)

POP(s) – Contaminante(s) orgânico(s) persistente(s) (*Persistent Organic Pollutants*)

PS – Peso seco

SIM – Monitorização de iões seleccionados (*Selected Ion Monitoring*)

Tph – Trifenileno

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*)

Σ - Somatório

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A superfície terrestre encontra-se majoritariamente coberta por água, cerca de 70% (Talley, et al., 2011) . Desta forma, o mar representa de forma inquestionável uma parte fundamental da biosfera, também considerado fonte importante de recursos energéticos, alimentares e minerais, sendo muitos destes renováveis.

Os oceanos têm uma grande capacidade de autodepuração de partículas sólidas, vaporização, destruição de matéria orgânica por oxidação e capacidade depuradora das algas e dos microorganismos (Gadd, 1988) No entanto, não devemos esquecer que a introdução de substâncias poluidoras no meio marinho tem um impacto ecológico muito importante, podendo afetar o equilíbrio dos ecossistemas oceânicos.

A poluição marinha é um dos problemas globais que resulta da expansão das atividades industriais e agrícolas (FAO, 2017). Compostos orgânicos como os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs) têm sido cada vez com mais frequência observados em ambientes aquáticos. Estudos atuais têm constatado a ocorrência de contaminantes orgânicos, como os PAHs, em diversos sistemas aquáticos, como água do mar ou águas superficiais, águas subterrâneas, e, conseqüentemente, na cadeia alimentar.

A contaminação dos oceanos é um componente criticamente importante, mas pouco reconhecido, da poluição global (Andersen et al., 2019). Tem múltiplos impactos diretos e indiretos na saúde humana (*Health, The Global Ocean and Marine Resources*, 2019). A natureza e a magnitude destes efeitos estão apenas agora a começar a ser estudadas e compreendidas.

A poluição também é uma crescente ameaça à saúde humana. Atualmente, é a maior causa ambiental de doenças no mundo, responsável por cerca de 9 milhões de mortes prematuras por ano (Landrigan et al., 2018). Causa também grandes perdas económicas, prejudica as trajetórias nacionais de desenvolvimento económico. Impedindo assim o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (*The Sustainable Development Goals Report*, 2018), em particular, o ODS 3, que exige a melhoria da saúde e do bem-estar humano, e o ODS 14, que exige a prevenção e redução significativa de toda a poluição marinha.

O aumento da poluição dos oceanos, as mudanças climáticas e a acidificação dos oceanos podem causar mudanças na cadeia alimentar marinha. O principal mecanismo pelo qual a poluição altera a cadeia alimentar marinha e afeta a pesca são as variações de abundância e composição de microalgas e outras espécies que são a base da cadeia alimentar marinha (Abbate et al., 2015) (Bauer et al., 2019) (Glibert, 2019). Ocorrendo então uma diminuição da diversidade de espécies, a produtividade das poucas espécies tolerantes à poluição pode levar a reduções acentuadas nas capturas de peixe comercialmente importante, e escassez de alimento.

Os estuários são altamente sensíveis à poluição marinha. Os estuários também são viveiros vitais para muitas espécies de peixes comercialmente importantes. Os pequenos

invertebrados que povoam os estuários são bem capazes de lidar com as mudanças nas condições de salinidade e temperatura causadas pelas influências das marés ribeirinhas e marinhas (Attrill, 2002). No entanto, esses organismos podem ser altamente suscetíveis à poluição, e a poluição costeira pode reduzir a abundância de invertebrados e remover completamente as espécies intolerantes (J. A. Camargo & Alonso, 2006). Estes efeitos estuarinos são particularmente importantes quando a poluição é generalizada. Eventos de poluição de curto prazo e alto impacto (como derrames por exemplo) também podem resultar em alterações na cadeia alimentar e reduções na produtividade de moluscos.

A crescente procura global por peixes como fonte de alimento impulsionou o rápido aumento da aquicultura, o que resultou numa captura abusiva de peixes selvagens usados para alimentação de peixes cultivados (Deutsch et al., 2013). A redução da disponibilidade de peixe para consumo humano tem um impacto direto na saúde humana ao comprometer a segurança alimentar em comunidades costeiras em países com poucos recursos (Breitburg et al., 2018). Esses impactos recaem mais fortemente nos países pobres (Warner et al., 2010), mas os impactos negativos também são vistos em nações economicamente desenvolvidas, onde o marisco constitui uma parte substancial da pesca comercial e tradicional de subsistência (Mathis et al., 2015).

A aquicultura marinha tem crescido na maioria das áreas costeiras do mundo mais rapidamente do que outros grandes setores de produção de alimentos. Embora uma abordagem baseada em ecossistemas se aplique ao manejo da aquicultura nas últimas décadas, estão disponíveis informações limitadas para avaliar a ocorrência de poluição petroquímica em áreas de aquicultura (Pazi et al., 2021).

A monitorização da poluição química e plástica nos oceanos decorre há décadas. Uma abordagem tem sido a medição direta de descargas de contaminantes. Outra estratégia de monitorização de contaminantes químicos tóxicos é medir as concentrações de contaminantes específicos ao longo da coluna de água, em sedimentos ou em organismos denominados de “espécies sentinelas”.

Os projetos realizados por estas entidades permitiram a identificação dos locais onde os metais pesados, contaminantes orgânicos persistentes (POPs) e pesticidas são mais abundantes e têm maior potencial de contaminar a fauna marinha. Esses programas documentaram que as concentrações de contaminantes são mais altas perto de áreas urbanas (Godard-Codding et al., 2011).

Os PAHs são contaminantes presentes no meio ambiente, que apresentam solubilidade moderada a baixa em água, o que leva a uma sorção pelas partículas presentes no meio e a uma subsequente acumulação em sedimentos (UNEP/MAP, 2006).

Devido à sua persistência e lipofilicidade, os PAHs tendem a persistir nos sedimentos. Após deposição nos sedimentos, onde podem ser fortemente absorvidos estes compostos acumulam-se na biota, podendo persistir por longos períodos. Posteriormente os PAHs podem

ser libertados para a água, ameaçando os ecossistemas fluviais urbanos e a saúde humana, e em particular as espécies que neste ambiente habitam. Os PAHs podem também ainda ser transportados, podendo por isso ser detetados em sedimentos que estejam a grandes distâncias da sua fonte de emissão, tornando dessa forma difícil a identificação da fonte de emissão destes compostos (Qin et al., 2020).

Possuem ainda capacidade de se aglomerar e amplificarem nos organismos levando a um aumento da concentração de PAHs nos tecidos, o que representa um risco para a saúde humana (Gouveia et al., 2018).

1.1.1 Acreditação e a NP EN ISO/IEC 17025

A acreditação compreende a avaliação e reconhecimento da habilitação técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade, como, certificações, calibrações, ensaios e inspeções. A acreditação de um laboratório é elementar pois fornece confiança complementar ao laboratório, podendo ser por vezes determinante para os clientes na escolha para realização das suas análises.

A NP EN ISO/IEC 17025 é um documento que visa promover confiança nas atividades que são realizadas nos laboratórios em questão, garantindo que estes possuem aptidões para fornecer resultados válidos. Este documento permite ainda regulamentar o trabalho e o tratamento de dados entre laboratórios a funcionarem em diferentes partes do mundo, uma vez que promove uma maior aceitação de resultados entre países.

Nesta norma são evidenciados diversos requisitos necessários à sua implementação num laboratório e nas atividades nele são efetuadas. É referenciada a importância da confidencialidade e imparcialidade em todas as atividades, bem como a necessidade da implementação de procedimentos de como laborar como trabalho de laboratório, tratamento de dados, *software* e trabalho não conforme (Magnusson e Örnemark, 2014).

1.1.2 Projeto AQUIMAR

O projeto AQUIMAR (Caraterização geral de áreas AQUÍcolas para estabelecimento de culturas MARinhas) tem como objetivo efetuar uma caraterização das condições oceanográficas, físico-químicas, geoquímicas e biológicas para uma otimização da seleção dos locais para implantação de unidades de aquacultura no Plano de Ordenamento do Espaço Marítimo.

As atividades propostas por este projeto centram-se na recolha de informação técnica e científica para aumentar o conhecimento sobre as características oceanográficas (e.g. temperaturas, salinidades, correntes e nutrientes), geoquímicas (e.g. análise composicional, carbono orgânico e metais) e biológicas (e.g. produção primária) da zona costeira Portuguesa. Outro dos principais objetivos desta atividade é a identificação dos locais com maior aptidão para a prática da aquicultura, tendo por base as áreas já delimitadas no Plano de Ordenamento do Espaço Marítimo (aquicultura potencial). E por fim, mas não menos importante proceder à melhoria e otimização dos processos produtivos das culturas existentes, melhorando a eficiência energética e reduzindo a dependência de alimentação externa, abrindo caminho à introdução de novas espécies aquícolas com bom potencial de mercado.

Os objetivos específicos deste projeto são:

1) Compilar e disponibilizar dados históricos relevantes para a caraterização das condições oceanográficas, físico-químicas, geoquímicas e biológicas para a seleção de locais de implantação de unidades de cultivo;

2) Caracterizar as áreas em estudo através da medição de parâmetros e amostragens de água e sedimentos ao longo de 5 zonas costeiras e 4 zonas mais interiores;

3) Avaliar a fenologia do fitoplâncton através de análise temporal de imagens satélite para avaliar a variação espacial e temporal da biomassa;

4) Definir áreas preferenciais de implantação de diferentes tipos de culturas marinhas na zona costeira;

5) Determinar a capacidade de carga do sistema para a aquacultura nas diferentes áreas, incorporando o conhecimento adquirido ao longo do projeto e considerando os aspetos necessários da biologia das espécies;

6) Delinear um plano de gestão que promova o desenvolvimento sustentável da aquacultura nas diferentes áreas consideradas.

1.1.3 Legislação e documentos guia

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) criou uma lista de várias substâncias consideradas prioritárias, tendo em conta as características de algumas moléculas que podem estar presentes no ambiente e os danos que poderão causar. Existem 16 PAHs (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno e Benzo(g,h,i)perileno que se encontram nessa lista e que são por isso considerados prioritários, de acordo com as suas propriedades carcinogénicas e mutagénicas (*Priority Pollutant List*, 2014).

Em Portugal a legislação relativa a sedimentos apenas é encontrada na Portaria 1450/2007 de 12 de novembro, que refere que quando há necessidade de efetuar dragagens os sedimentos devem ser analisados quanto ao seu grau de contaminação em metais, policlorobifenilos, hexaclorobenzeno e PAHs. Esses sedimentos podem ser classificados em 5 classes distintas, de acordo com o seu grau de contaminação

Relativamente aos documentos guia é de referir os documentos da OSPAR (Convenção para a Proteção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste) que definem concentrações de “background” e critérios de qualidade de sedimentos (OSPAR, 2018).

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo efetuar a caracterização dos sedimentos marinhos colhidos no âmbito do projeto AQUIMAR, em termos de concentração de PAHs, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Seleção das amostras a quantificar tendo em consideração os locais de colheita e a proximidade a possíveis fontes de contaminação;
- Determinação de PAHs nas amostras selecionadas de acordo com métodos vigentes no laboratório;
- Avaliação e discussão dos resultados tendo em consideração a legislação existente e documentos guia.

1.3 HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Os PAHs são POPs, os quais têm um elevado impacto no meio ambiente e, por isso, são motivo de numerosos estudos (Macdonald et al., 2005). São compostos potencialmente tóxicos que têm como principais características a elevada hidrofobicidade, baixa reatividade no meio ambiente, e tendência para se acumular em abundância nos tecidos dos organismos vivos (Jesus et al., 2022). Os PAHs são caracterizados como ambientalmente estáveis, resistentes à degradação, bioacumuláveis, hidrofílicos e tóxicos. A distribuição de PAHs em sedimentos pode ser afetada tanto por características do sedimento em si (tamanho de partícula e teor de carbono), ou, por fatores associados à atividade antropogénica (UNEP/MAP, 2006).

Até à data, mais de 100 PAHs foram caracterizados na natureza, 16 dos quais foram classificados pela *United States Environmental Protection Agency*, US EPA, como contaminantes prioritários, face às suas propriedades carcinogénicas e mutagénicas (Andrianova e Quimby, 2019) (Ferrara et al., 2020).

Os PAHs são compostos por átomos de hidrogénio e carbono constituídos por dois ou mais anéis aromáticos. Estes compostos podem ser classificados consoante o número de anéis presentes nestes compostos, são PAHs de peso molecular leve os correspondentes aos de dois ou três anéis aromáticos, e PAHs de peso molecular elevado os correspondentes aos de quatro ou mais anéis aromáticos (Wei e Chee, 2017). A Tabela 1.1 mostra algumas características dos PAHs considerados prioritários pela US EPA, estudados no contexto deste trabalho. A Tabela 1.2 apresenta outros PAHs igualmente importantes na monitorização ambiental, considerados como adicionais.

Tabela 1.1 - Fórmula química e estrutura dos 16 PAHs da US EPA.




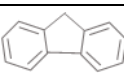

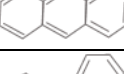
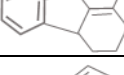
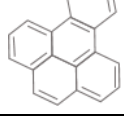
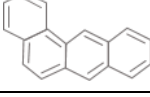
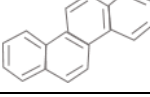
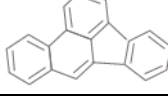
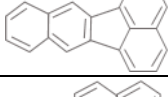
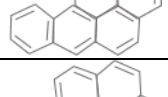
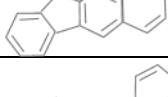
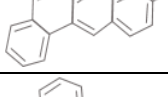
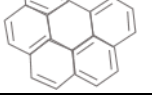


Parâmetro (Abreviatura)	Fórmula química	Estrutura
Naftaleno (N)	$C_{10}H_8$	
Acenaftileno (Acy)	$C_{12}H_8$	
Acenafteno (Ace)	$C_{12}H_{10}$	
Fluoreno (F)	$C_{13}H_{10}$	
Fenantreno (Phe)	$C_{14}H_{10}$	
Antraceno (A)	$C_{14}H_{10}$	
Fluoranteno (Fluo)	$C_{16}H_{10}$	
Pireno (P)	$C_{20}H_{12}$	
Benzo(a)antraceno (BaA)	$C_{18}H_{12}$	
Criseno (Chr)	$C_{18}H_{12}$	
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	$C_{20}H_{12}$	
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	$C_{20}H_{12}$	
Benzo(a)pireno (BaP)	$C_{20}H_{12}$	
Indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind)	$C_{22}H_{12}$	
Dibenzo(a,h)antraceno (DBA)	$C_{22}H_{14}$	
Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)	$C_{22}H_{12}$	

Tabela 1.2 - Fórmula química e estrutura dos PAHs adicionais estudados.

Parâmetro (Abreviatura)	Fórmula química	Estrutura
Benzo(e)Pireno (BeP)	C ₂₀ H ₁₂	
Perileno (Per)	C ₂₀ H ₁₂	

1.3.1 Características físico-químicas

Na Tabela 1.3 apresentam-se as propriedades físico-químicas dos PAHs estudados, podendo-se verificar que quanto mais complexa a sua estrutura mais elevada a massa molecular.

Tabela 1.3 - Propriedades físico-químicas dos PAHs estudados.

PAHs		Nº de anéis (1)	Massa molar (g·mol ⁻¹) (1)	PF* (°C) (2)	PE** (°C) (2)	Solubilidade em água *** (mg·L ⁻¹) a 25°C (2)
PAHs US EPA	Naftaleno (N)	2	128	80	218	31
	Acenaftileno (Acy)	3	152	92	265	16
	Acenafteno (Ace)	3	154	96	279	3,8
	Fluoreno (F)	3	166	116	293	1,9
	Fenantreno (Phe)	3	178	101	340	1,1
	Antraceno (A)	3	178	216	340	0,045
	Fluoranteno (Fluo)	4	202	111	384	0,26
	Pireno (P)	4	202	149	360	0,13
	Benzo(a)antraceno (BaA)	4	228	158	400	0,011
	Criseno (Chr)	4	228	255	448	0,006
	Benzo(b)fluoranteno (BbF)	5	252	167	---	0,0015
	Benzo(k)fluoranteno (BkF)	5	252	217	480	0,0008
	Benzo(a)pireno (BaP)	5	252	179	496	0,0038
	Indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind)	6	276	163	---	0,00019
	Dibenzo(a,h)antraceno (DBA)	5	278	266	---	0,0006
Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)	6	276	278	---	0,00026	
PAHs adicionais	Benzo(e)Pireno (BeP)	5	252	178	---	0,0063
	Perileno (Per)	5	252	273	350	0,00040

* Ponto de Fusão

** Ponto de Ebulição

*** ou concentração mássica desta substância na água

(1) Mackay e Fraser, 2000 (2) International Agency for Research on Cancer, 2010.

Através da mesma Tabela pode ainda apurar-se que a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e que a solubilidade em água é inversamente proporcional ao seu peso molecular. Assim, PAHs de baixo peso molecular são mais voláteis quando comparados com os de peso molecular mais elevado.

1.4 DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

Os oceanos abrigam alguns dos ecossistemas mais diversos do planeta e sustentam economias de países por todo o mundo (IPCC, 2019) (Whitmee et al., 2015), sendo, portanto, essenciais para a saúde e bem-estar humano (Depledge et al., 2019) (Rockström et al., 2009) (Depledge et al., 2013) (Fleming et al., 2015).

Apesar do seu vasto tamanho, os oceanos estão ameaçados e a atividade humana é a principal fonte da ameaça (IPCC, 2019). As mudanças climáticas e diversas outras perturbações ambientais de origem humana causam um aumento das concentrações de CO₂ atmosférico, levando à acidificação dos oceanos, que por sua vez destrói os recifes de coral, prejudicando o desenvolvimento da fauna marinha e principalmente os microorganismos produtores de oxigénio na base da cadeia alimentar (Keeling et al., 2010) (Hönisch et al., 2012). Consequentemente os oceanos estão cada vez menos ricos em oxigénio, levando a uma diminuição da quantidade e qualidade do peixe (Pauly & Zeller, 2016) (Cheung et al., 2016).

A aquicultura nacional constitui uma importante alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado, sendo considerada um setor estratégico pelo Governo português. Portugal possui uma tradição de moluscicultura, produção de peixes de água doce e salgada, uma tecnologia moderna, empresários empenhados e condições geográficas e climáticas, adequadas à prática destas atividades. Há indubitavelmente lugar para o desenvolvimento sustentável desta atividade numa perspetiva de gestão integrada das zonas costeiras (Mestre, 2008).

Os impactos das atividades humanas na área de piscicultura marinha levam a uma consequente ressuspensão e remobilização dos PAHs sedimentares na coluna de água. Além disso, a contaminação de PAHs tem sido encontrada em sedimentos devido ao transporte marítimo, escoamento, marinas, portos e atividades náuticas nas áreas de aquacultura. Devido à estrutura lipofílica dos PAHs, estes podem ser facilmente acumulados na cadeia alimentar, causando efeitos adversos ao ecossistema marinho e ao Homem (Pazi et al., 2021). Sendo esta prática cada vez mais utilizada e essencial não só em termos económicos como de sustento alimentar, surge então uma crescente necessidade de monitorizar os locais da prática desta atividade.

No entanto, para se conseguir desenvolver o sector e torná-lo mais atrativo a investidores, é fundamental fornecer a informação técnica, como por exemplo dados meteorológicos, oceanográficos, geoquímicos e físico-químicos, necessários para as potenciais empresas poderem ultrapassar um dos maiores desafios desta atividade, a elevada exposição às más condições marítimas, existentes em mar aberto. Tal informação será crucial para a seleção do local de instalação da unidade de produção, assim como para desenvolver as ferramentas tecnológicas necessárias para a produção, considerando as condições existentes. Por outro lado, esta informação, será também pertinente para avaliar a possibilidade de introdução de novas espécies no cultivo marinho em Portugal.

Posto isto, a necessidade em melhorar o conhecimento acerca das condições hidrodinâmicas e físicas existentes ao longo da costa portuguesa para dar apoio à escolha do local de implantação das unidades de cultivo torna-se clara.

É, portanto, importante determinar e identificar os compostos contaminantes bem como os seus teores, tendo sempre em conta as legislações vigentes e os documentos guias de modo a projetar tendências futuras e oferecer orientação com base científica para entender os efeitos destes contaminantes na prática de aquacultura.

1.5 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO

A presente dissertação, encontra-se estruturada em cinco capítulos. Após esta introdução o documento encontra-se organizado da seguinte forma:

- **Estado da Arte** (Capítulo 2): apresenta um levantamento do estado da arte relativo aos PAHs e à prática de aquicultura, tendo como foco trabalhos e pesquisas existentes.
- **Metodologia** (Capítulo 3): descreve os procedimentos desde a amostragem até os ensaios laboratoriais realizados, necessários para a análise, identificação e quantificação dos PAHs das amostras de sedimento das áreas de estudo.
- **Apresentação e discussão dos resultados obtidos** (Capítulo 4): são apresentados os resultados obtidos durante o estudo e é realizada uma discussão pormenorizada dos resultados obtidos e estabelecidas comparações com estudos realizados.
- **Conclusão** (Capítulo 5): apresenta uma avaliação global do trabalho realizado, as respetivas conclusões.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 HIDROCARBONETOS

Estima-se que sejam inseridas nos oceanos, por ação voluntária ou involuntária, milhões de toneladas de hidrocarbonetos por ano, representando assim, uma das principais causas de poluição dos oceanos (Oil in the Sea III, 2003).

Os hidrocarbonetos são integrantes do material orgânico terrestre que entra nas massas de água. O estudo destes compostos em ambientes aquáticos deve ser efetuado na coluna de água, organismos e sedimentos (Medeiros et al., 2005).

2.1.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Os PAHs têm sido alvo de vários estudos devido ao seu potencial carcinogénico documentado em experiências com animais (Abdel-Shafy e Mansour, 2016), sendo frequentemente associados a um aumento de incidência de vários tipos de cancro (WHO, 2004) (Division of Toxicology e Medicine, 2009). Devido às suas propriedades físico-químicas e à sua ubiquidade, o risco para a saúde humana resultante da exposição aos PAHs é significativo. De facto, e associado ao seu carácter lipofílico, os PAHs podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou inalação, sendo distribuídos rapidamente pelo organismo (WHO, 2004). Adicionalmente, alguns PAHs possuem a aptidão de se biomagnificar nos organismos, amplificando assim a sua concentração nesses organismos (Qin et al., 2020).

A persistência de PAHs no meio varia com a massa molecular, sendo que os mais leves se degradam com maior facilidade (tempo de meia vida do antraceno por exemplo varia entre 420 -1200 dias em sedimentos) (Vlachodimitropoulos, 2008), enquanto os mais pesados tendem a persistir por longos períodos (tempo de meia vida do Benzo(a)pireno em sedimentos é de 5 –10 anos) (Bukowska et al., 2022).

Tendo em consideração a frequência de ocorrência destes contaminantes no ambiente e o seu potencial mutagénico e carcinogénico, a convenção de proteção do meio marinho OSPAR (Comissão de Oslo e Paris) de 2009 refere estes compostos como compostos prioritários para monitorização ambiental.

2.2 ORIGEM DOS PAHS

No geral, todos os compostos químicos em elevada abundância têm um certo efeito tóxico para o ambiente, porém, a sua persistência atribui-lhes um crescente efeito nocivo. O facto de serem substâncias quimicamente estáveis, confere um elevado risco mesmo após a cessação das suas emissões, como acontece com alguns hidrocarbonetos.

É por isso importante desenvolver formas de monitorizar o meio marinho visando compreender as alterações que nele ocorrem e implementando as medidas necessárias para tentar eliminar/minimizar os contaminantes nele presentes.

Os PAHs podem ser categorizados quanto ao modo como entram nos ecossistemas, o que se revela importante para controlo das suas fontes emissoras (Oliveira et al., 2020).

Assim os PAHs podem ser de:

- Fonte natural, resultantes da ação da natureza (e.g., jazidas de petróleo ou atividade vulcânica) ou de

- Fonte antropogénica, decorrente da atividade humana (e.g., tráfego automóvel, indústrias ou queima de resíduos) (Lubecki e Kowalewska, 2010).

Estes compostos podem ainda ser classificados quanto à sua origem:

(a) biogénica e diagenética, ou seja, originados por microrganismos, plantas e algas, ou no decorrer de alterações da matéria orgânica lentas, respetivamente, ou

(b) petrogénica, gerados no decurso da formação do petróleo ou

(c) pirogénica, formados por processos de combustão incompleta (Stogiannidis e Laane, 2015).

A distinção entre origens de PAHs pode ser feita de diversas formas: através da distribuição de PAHs por número de anel predominante no sedimento da estação amostrada, verificando a origem do composto Perileno presente em cada amostra de sedimentos e por fim, pelas razões de diagnóstico entre diversos PAHs estudados.

Vários estudos nas diversas áreas estuarinas portuguesas foram realizados sendo portanto possível comparar os resultados obtidos no presente estudo (Serafim et al., 2013) (Rocha e Palma, 2019) (Gonçalves et al., 2016) (Pérez-Fernández et al., 2015) (Viñas et al., 2009) (Mai et al., 2002). Outros estudos internacionais em áreas estuarinas demonstram teores elevados neste tipo de ecossistema marinho (Vasconcelos et al., 2007).

2.2.1 Distribuição de PAHs por número de anel

A identificação de fontes de PAHs pode ser feita avaliando o seu conteúdo de acordo com o número de anéis benzênicos. Como pode ser observado na Figura 2.1, produtos petrolíferos (origem petrogénica) contêm principalmente PAHs de 2 a 3 anéis, com os restantes em níveis mais baixos.



Figura 2.1 - Identificação da origem dos PAHs usando a distribuição por anel.

Pelo contrário no caso em que há predominância de PAHs de 5 ou 6 anéis benzênicos, a origem dos PAHs será pirogénica (Stogiannidis e Laane, 2015).

Os padrões de distribuição de PAHs são geridos pela termodinâmica de processos de baixa temperatura, enquanto os fatores cinéticos de processos de elevadas temperaturas são importantes durante a combustão. As diferenças do tipo de substrato e transformação durante o transporte também estão relacionadas com disparidades nas proporções (Yunker et al., 2002).

Fontes petrogénicas introduzem no meio PAHs mais estáveis, como Phe, P, Chr e BghiP, pois são criados por processos de baixa temperatura e controlados por propriedades termodinâmicas (e.g, formação de petróleo). O A, Fluo, BaA e Ind são PAHs gerados por combustão incompleta (origem pirogénica), são menos estáveis (Rocha e Palma, 2019).

De modo a discriminar fontes de PAHs, pode ser efetuada uma avaliação tendo em consideração PAHs com a mesma razão massa/carga de modo a reduzir diferenças de propriedades dos PAHs como a solubilidade, volatilidade e adsorção. Os compostos A, Fluo, BaA e Ind são menos estáveis, sendo estes obtidos a altas temperaturas por combustão incompleta (origem pirogénica) (Stogiannidis e Laane, 2015).

2.2.2 Origem do perileno

O perileno é geralmente introduzido naturalmente, sendo formado por decomposição de matéria orgânica (diagénese) ou produzido por microrganismos ou algas (perileno biogénico). No entanto, pode também ser gerado por processos de combustão (pirogénicos) ou estar presente no petróleo (petrogénico) e dependendo do modo como é introduzido no meio ambiente, pode ter origem antropogénica (e.g. tráfego automóvel ou derrames de petróleo, processos industriais) ou origem natural (e.g. atividade vulcânica ou escudações de jazidas de petróleo) (Stogiannidis e Laane, 2015).

A identificação da fonte de perileno pode ser feita usando a percentagem de perileno em relação aos isómeros de cinco anéis aromáticos ($\%Per/\Sigma 5\text{-isómeros}$), se a percentagem neste parâmetro for acima de 10% indicam origem diagenética. Os isómeros de cinco anéis aromáticos são os PAHs: BbF, BkF, BaP, DBA, BeP e Per. Em contraste, as estações amostradas cuja percentagem de isómeros de cinco anéis aromáticos se encontram abaixo 10% indicam que a sua origem é pirogénica (Bakhtiari et al., 2009) (Rocha e Palma, 2019).

Pode ser feita outra avaliação usando a proporção de perileno para PAHs parentais totais ($\% Per/\Sigma 18\text{ PAHs}$), sendo os 18 PAHs referidos os 16 da US EPA mais o Per e o BeP. As concentrações que tenham uma variação entre 1 e 4% são então classificadas como sendo de origem pirogénica (Fang et al., 2003).

2.2.3 Razões de diagnóstico

A avaliação das razões de diagnóstico, utilizada para discriminar fontes de PAHs, é efetuada tendo em consideração PAHs com a mesma razão massa/carga de modo a reduzir diferenças de propriedades dos PAHs como a solubilidade, volatilidade e adsorção.

Os compostos A, Fluo, BaA e Ind são menos estáveis, sendo estes obtidos a altas temperaturas por combustão incompleta (origem pirogénica) (Stogiannidis e Laane, 2015). Por outro lado, as fontes petrogénicas apresentam PAHs mais estáveis, como o Phe, P, Chr e BghiP, sendo estes controlados pelas propriedades termodinâmicas e gerados por processos a baixa temperatura.

As razões mais utilizadas são $A/(A+Phe)$, $Fluo/(Fluo+P)$, $BaA/(BaA+Chr)$ e $Ind/(Ind+BghiP)$ (Rocha e Palma, 2019). Sendo que a razão $A/(A+Phe)$ é útil para diferenciar entre fonte petrogénica e pirogénica, e as últimas três para discriminar entre fontes pirogénicas (Tobiszewski e Namieśnik, 2012).

Os padrões de distribuição de PAH, no decorrer da síntese de petróleo, são diretamente dependentes da termodinâmica dos processos de baixa temperatura, enquanto os fatores cinéticos dos processos de alta temperatura são importantes durante a combustão (Rocha e Palma, 2019).

Os PAHs de origem petrogénica, como o Chr (m/z 228) e o BghiP (m/z 276), pois são formados por processos de reduzida temperatura (por exemplo, formação de petróleo). O A, Fluo, BaA e Ind são PAHs com uma menor estabilidade introduzidos no meio por combustão incompleta (origem pirogénica) (Stogiannidis e Laane, 2015).

A análise da origem destes compostos através de gráficos que relacionam razões de PAHs, como $BaA/(BaA + Chr)$ para $(Fluo/(Fluo + P))$, $A/(A + Phe)$ para $Fluo/(Fluo + P)$ e $Ind/(Ind + BghiP)$ para $(Fluo/(Fluo + P))$ tem sido amplamente utilizada. Assim, as razões mais discriminatórias para fontes pirogénicas são: $Fluo/(Fluo + P)$, $BaA/(BaA + Chr)$ e $Ind/(Ind + BghiP)$, enquanto $A/(A + Phe)$ é útil para diferenciação entre fontes pirogénicas e petrogénicas (Tobiszewski e Namieśnik, 2012).

Contudo, esta abordagem apresenta algumas limitações (Galarnau, 2008). A primeira é que cada tipo de fonte é assumido como estando associado a proporções relativas das espécies em questão que são únicas. A outra é que as proporções relativas das espécies em questão são assumidas como conservadas entre cada fonte de emissão. Outros estudos detetaram problemas semelhantes (Zhang et al., 2005) (Katsoyiannis et al., 2011).

Embora os estudos que usam as razões de diagnóstico em sedimentos e outras matrizes, serem diferentes (Pérez-Fernández et al., 2015) (Serafim et al., 2013), ambos usaram razões de diagnóstico em simultâneo com métodos alternativos de análise de dados.

A origem dos PAHs também pode ser distinguida através da utilização da razão entre PAHs de baixo peso molecular (LMW) e PAHs de alto peso molecular (HMW) (Montuori et al., 2022). Os LMW são os hidrocarbonetos que possuem 2 a 4 anéis enquanto os HMW são os hidrocarbonetos constituídos por 5 a 6 anéis. Assim, razões LMW/HMW > 1 indicam fontes petrogénicas; Razões LMW/HMW < 1 indicam fontes pirogénicas.

2.2.4 Contaminação de sedimentos

A Portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro define intervalos de acordo com a concentração de determinados parâmetros, inorgânicos e orgânicos, onde estão incluídos o somatório de PAHs, permitindo a distinção por classes:

- Classe 1 (<300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Material dragado limpo – pode ser depositado no meio aquático em locais sujeitos a erosão ou utilizado em praias sem normas restritivas.
- Classe 2 (300-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Material dragado com contaminação vestigiária – pode ser imerso no meio aquático tendo em atenção as características do meio e o uso do mesmo.
- Classe 3 (2000-6000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Material dragado ligeiramente contaminado – pode ser utilizado para desaterros ou no caso de imersão, necessita de estudo aprofundado do local de deposição e monitorização do mesmo.
- Classe 4 (6000-20000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Material dragado contaminado – recomendação de posterior cobertura de solos impermeáveis.
- Classe 5 (>20000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Material muito contaminado – idealmente não deverá ser dragado, os dragados deverão ser encaminhados para tratamento e/ou deposição em aterro de resíduos devidamente autorizado, sendo proibida a sua imersão.

Esta classificação, com base na Portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro, específica para dragados, no caso de estudos de monitorização ambiental é meramente indicativa.

2.3 PAHS EM SEDIMENTOS OCEÂNICOS

Estes compostos são persistentes, principalmente em ambientes aquáticos, devido a sua baixa solubilidade em água e pela tendência de se associarem com material particulado, uma importante fonte de alimento para um grande número de organismos marinhos (Honda e Suzuki, 2020).

As características do ambiente marinho têm influência na distribuição dos PAHs no meio ambiente. O teor de carbono orgânico no sedimento é um parâmetro relevante, pois quanto mais ricos em carbono orgânico, mais forte é a afinidade dos PAHs (Han et al., 2015). Ainda sobre as características do ambiente marinho que podem influenciar na distribuição dos PAHs, é de salientar que o tempo de contato entre estes compostos e sedimentos envelhecidos abaixo da superfície fortalece as interações contaminante matriz; e com isto constata-se uma diminuição da disponibilidade dos PAHs ao longo da profundidade da coluna sedimentar.

A capacidade de adsorção e as propriedades físico-químicas dos PAHs tornam os sedimentos e solos bons locais onde estes compostos se podem sedimentar e, conseqüentemente, acumular, podendo assim ser utilizados como indicadores de poluição ambiental. Os PAHs acumulam-se tendo em conta a sua tendência de se agregarem e a sua hidrofobicidade, tornando-se assim num grave problema não só para a saúde pública, como também para os ecossistemas marinhos e para as espécies que nestes habitam (Temerdashev et al., 2020).

Os PAHs possuem ainda aptidão para serem transportados a distâncias extensas, tornando difícil a identificação das respetivas fontes de emissão destes compostos, podendo por isso ser detetados em solos que estejam a grandes distâncias da sua fonte de emissão (Ukalska-Jaruga e Smreczak, 2020).

2.4 PAHS EM SEDIMENTOS ESTUARINOS

Os estuários são zonas estratégicas em termos ambientais e socioeconômicos, com elevada atividade biológica, onde se processam trocas importantes de ordem sedimentar, física e química. Estes sistemas caracterizam-se, essencialmente, por serem locais de baixa profundidade, pela receção de nutrientes e de matéria orgânica transportados pelos rios ao longo das bacias hidrográficas, que criam condições favoráveis ao desenvolvimento dos produtores primários e, conseqüentemente, ao suporte de cadeias tróficas. Assim, a inserção de PAHs em estuários, pode afetar a qualidade da água e dos sedimentos permitindo a acumulação destes compostos nas cadeias alimentares.

Por estes motivos os estuários tornam-se ambientes extremamente afetados por contaminação e conflitos ambientais, dificultando a realização da sua função de fornecedor de abrigo para muitas espécies de organismos e grande produtor biológico (Vasconcelos et al., 2007).

A contaminação proveniente da atividade industrial pode ser caracterizada por elevada carga orgânica, metálica e de nutrientes. Esta contaminação é emitida para os rios ou diretamente para os estuários, o que constitui uma ameaça para as comunidades que residem associadas ao sedimento, já que a maioria dos contaminantes emitidos por atividades antropogénicas tende a ser adsorvido pela matéria particulada e a concentrar-se no ambiente sedimentar (Kim et al., 1999).

Os estuários funcionam, como anteriormente referido, como recetores diretos dos desperdícios industriais e municipais e também de compostos agrícolas, que originam um aumento das concentrações de metais e de contaminantes orgânicos nos sedimentos. Deste modo, os seus sedimentos são considerados um reservatório de contaminantes orgânicos tais como PAHs (Ma et al., 2015). Ao atuar como um reservatório de contaminantes, estes sistemas reduzem a contaminação de ecossistemas circundantes.

2.5 PAHS NA FAUNA MARINHA

Os oceanos são fontes de enormes benefícios, seja pelos seus recursos minerais, nutricionais ou pelas suas características como habitat. O peixe para consumo humano é a principal fonte de proteína da dieta, sendo que em 2019 foram consumidos mais de 11 milhões de toneladas de peixe, somente na Europa (Commission e Fisheries, 2021). O consumo mundial de marisco tem sofrido incrementos anualmente, sendo suportado, pela indústria da aquicultura. Os derrames de hidrocarbonetos incitam também a redução da atividade fotossintética do fitoplâncton e das algas que apresentam uma elevada toxicidade quando ingeridos (Quigg et al., 2021).

Os PAHs, de acordo com a sua estrutura química, são pouco reativos expressando baixa toxicidade. Contudo, certos processos químicos podem tornar estes compostos mais reativos e conseqüentemente mais tóxicos. A interação de oxigénio com os PAHs faz com que ocorra um efeito de polarização, levando à formação de espécies reativas. Sendo esta a razão pela qual os PAHs se tornam mais tóxicos para peixes, após exposição a radiação ultravioleta (Ekunwe et al., 2005).

Um estudo mostrou que o benzo(a)pireno (BaP) pode ser letal também para culturas de *Escherichia coli* (Harrison e Raabe, 1967). Trabalhos anteriores também expuseram a primeira prova das características carcinogénicas destes compostos em peixes expostos "in vivo" (Tuvikene, 1995). Os peixes usualmente exibem menor concentração de PAHs nos tecidos, pois detêm maior aptidão para metabolizar estes compostos. Os moluscos, por outro lado, tendem a acumular PAHs pois são incapazes de metabolizá-los e excretá-los totalmente (Camargo e Toledo, 2002) (Azeredo et al., 2006).

A absorção de PAHs está sujeita à sua biodisponibilidade, bem como à fisiologia dos organismos envolvidos (Meador et al., 1995). Os processos fundamentais envolvidos na absorção de PAHs nos organismos são: bioacumulação, biomagnificação e bioconcentração. O processo de bioacumulação é a absorção de PAHs por organismos aquáticos através de diversos tipos de exposição, como absorção dérmica, respiração e alimentação. A biomagnificação é o incremento da concentração de compostos nos organismos através da alimentação ao longo da cadeia trófica (Mackay e Fraser, 2000) (Bienfang et al., 2012). E por fim, a bioconcentração é a absorção de PAHs unicamente da água, através da pele e/ou respiração.

Os PAHs têm a aptidão de atravessar as membranas celulares, devido às suas características lipofílicas, esta característica possibilita a acumulação destes compostos em diferentes tecidos. As aves, os mamíferos e os peixes, devido ao sistema oxidase bem desenvolvido, têm a capacidade de metabolizar parte dos hidrocarbonetos ingeridos (Hac-Wydro et al., 2019).

As concentrações dos PAHs em organismos marinhos tendem a ser influenciadas por fatores como a qualidade nutricional, temperatura da água, consumo de oxigénio (Jesus et al.,

2022) e pela sua fisiologia (Perugini et al., 2007). O tempo de meia-vida dos PAHs em vários tecidos biológicos (bivalves, crustáceos e peixes) é da ordem dos 10 dias e é cerca de cinco vezes maiores para PAHs com maior massa molar (Baali e Yahyaoui, 2020).

Os peixes podem converter até 99% dos PAHs em metabólitos no prazo de 24 horas, modificando as concentrações e o padrão nos diversos tecidos (Bua et al., 2021). Por não possuírem um sistema de metabolização eficiente, os PAHs podem ser bioacumulados por organismos de baixos níveis tróficos. Os organismos de níveis tróficos superiores, por outro lado, biotransformam com facilidade estes compostos, não sucedendo biomagnificação dos PAHs ao longo da cadeia alimentar (Honda e Suzuki, 2020). Um estudo realizado por (Wan et al., 2007) sugeriu que a diluição trófica dos PAHs na cadeia alimentar marinha, pode ser devida a um resultado da baixa eficiência de assimilação e de uma eficiente transformação metabólica nos níveis tróficos superiores.

O estudo dos PAHs na fauna marinha é fundamental para fazer uma estimativa da biodisponibilidade destes contaminantes, bem como os seus efeitos toxicológicos em animais aquáticos, pois estudos fundamentados exclusivamente nas concentrações de contaminantes em sedimento não são suficientes para essa finalidade.

2.6 AQUICULTURA

A aquicultura em Portugal teve uma grande evolução nos últimos anos, tendo passado por diversas fases. Embora a pesca de captura permaneça relevante, a aquicultura já demonstrou ter um papel importante na segurança alimentar global, crescendo 7,5% por ano desde 1970. Nas décadas seguintes foi dada maior relevância à produção de bivalves e ao desenvolvimento de pisciculturas, tanto de água doce, como de espécies marinhas (Wijsman et al., 2019).

De acordo com as estatísticas correspondentes a 2019, a produção aquícola total (14 336 toneladas), traduziu um aumento de 2,5% face a 2018. As vendas da aquicultura geraram uma receita de 118,5 milhões de euros, superior em 22,4% relativamente a 2018. Por outro lado, a produção de moluscos e crustáceos em 2019 diminuiu 28,9%, tendo representado apenas 46,6% da produção aquícola total, face a 67,2% em 2018 (INE, 2020).

Mundialmente, o maior produtor através de aquicultura é a China, com cerca de metade de todo o peixe consumido no mundo (DGRM, 2014).

É de notar que os valores totais apresentados representam menos de 1% da produção aquícola da Noruega (3 milhões de toneladas), e menos de 1% do valor faturado também pela Noruega (OCDE, 2022). Apesar de existirem diferenças bastante relevantes na geomorfologia da zona costeira de Portugal e da Noruega, principalmente devido à existência de áreas calmas na Noruega, como os *fjords*, que têm condições muito vantajosas para a instalação de unidades de cultivo, os números indicados acima parecem indicar a existência de um grande potencial de crescimento deste sector em Portugal.

Esta situação também é evidenciada pela extensão da costa portuguesa e pela excelência da qualidade da água existente. Assim, a aquicultura portuguesa está bem posicionada para tirar partido de um mercado nacional grande consumidor de peixe e de um mercado comunitário altamente deficitário em produtos da pesca.

Os objetivos para a aquicultura europeia visam criar emprego, disponibilizar aos consumidores produtos de qualidade e saudáveis, promover padrões de salubridade e de bem-estar animal para as espécies cultivadas e assegurar o desenvolvimento ambientalmente equilibrado da atividade aquícola (DGRM, 2014).

De entre as principais espécies produzidas em aquicultura no nosso País, os bivalves produzidos em regime extensivo representam uma parte significativa da produção nacional. As estratégias de desenvolvimento da aquicultura incorporam muitas das recomendações constantes de códigos de prática de aquicultura responsável, verificando-se que no nosso País, as empresas e os profissionais deste subsector, partilham o mesmo tipo de preocupações e princípios defendidos pelos seus congéneres europeus.

São evidentes os esforços de coordenação entre as autoridades, para direcionar o desenvolvimento e a aplicação de políticas, regulamentação e procedimentos, no sentido da sustentabilidade ambiental, económica e social da atividade de aquicultura.

A aquicultura nacional constitui uma importante alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado, sendo considerada um setor estratégico pelo Governo. A aquicultura portuguesa está bem posicionada para tirar partido de um mercado nacional grande consumidor de peixe e de um mercado comunitário altamente deficitário em produtos da pesca. Portugal possui uma tradição de moluscicultura, produção de peixes de água doce e salgada, uma tecnologia moderna, empresários empenhados e condições geográficas e climáticas, adequadas a estas atividades (Rocha et al., 2022).

A aquicultura, desde que corretamente exercida, não deve ser considerada como uma ameaça ao ecossistema (FAO, 2010). A quantidade de impacto ambiental causado está intimamente relacionada com a intensidade do sistema de aquicultura. Quanto mais intenso o sistema, maiores os efeitos ambientais.

No entanto, para se conseguir desenvolver o sector e torná-lo mais atrativo a investidores, é essencial fornecer a informação técnica necessária para as potenciais empresas poderem ultrapassar uma das maiores limitações desta atividade, a elevada exposição às más condições marítimas, existente em mar aberto. Tal será possível, através do cruzamento dos dados utilizados para a caracterização das diferentes áreas, com o conhecimento sobre a biologia das espécies, nomeadamente a nível das condições ótimas para crescimento, engorda, reprodução, etc.

Sabe-se hoje que existe um interesse elevado por parte de alguns investidores internacionais em introduzir algumas espécies novas, características de águas mais frias, como o salmão e o bacalhau. Esses investidores têm alegadamente capacidade para desenvolver tecnologia e/ou trazer novas estruturas para o país de forma a viabilizar a produção, especialmente no Norte do país, onde as temperaturas são por norma mais baixas (DGRM, 2014).

Existem também estudos preliminares sobre os depósitos sedimentares existentes, e a dinâmica sedimentar de cada região, o que permite, por exemplo, definir áreas de acumulação e erosão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

No total foram analisadas em laboratório **50 amostras**, correspondentes às 5 áreas oceânicas no âmbito do projeto AQUIMAR (Figura 3.1):

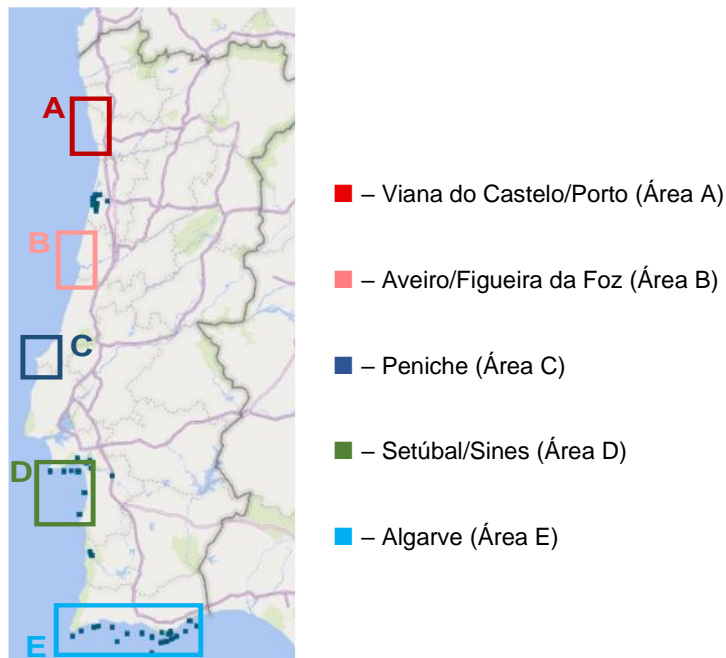


Figura 3.1 - Áreas de amostragem para o sedimento, no âmbito do Projeto AQUIMAR.

Posteriormente, aquando da realização do **tratamento aos dados obtidos**, além de ter sido feito o tratamento às 50 amostras analisadas, foram também adicionadas 24 amostras previamente analisadas. Na Figura 3.2 estão representadas as áreas adicionais para serem sujeitas ao tratamento de dados neste trabalho.



Figura 3.2 - Áreas de amostragem adicionais incluídas no tratamento de dados.

O estuário do Sado não estando incluído no âmbito do projeto AQUIMAR, foi também incluído no tratamento de dados efetuado.

Assim, no total foi feito o **tratamento dos dados de 74 amostras** ao longo da costa portuguesa, e nas áreas estuarinas acima referidas, estando a sua nomenclatura bem como os pontos de amostragem descritos na Tabela A.1 no anexo A. As amostras cujo teor de PAHs foi determinado em laboratório no presente estudo, corresponderam às 50 amostras de sedimentos das áreas oceânicas, representadas na Tabela A.2 no anexo A.

Nas Tabelas A.1 e A.2 (anexo A), são também apresentadas as coordenadas geográficas das estações de amostragem obtidas através de um sistema de posicionamento global (GPS) portátil, bem como a respetiva identificação atribuída. As Figuras 3.3 a 3.7 mostram as estações amostradas nas 5 áreas oceânicas cobertas.



Figura 3.3 - Estações de amostragem de sedimento na Área A (Viana do Castelo ao Porto).

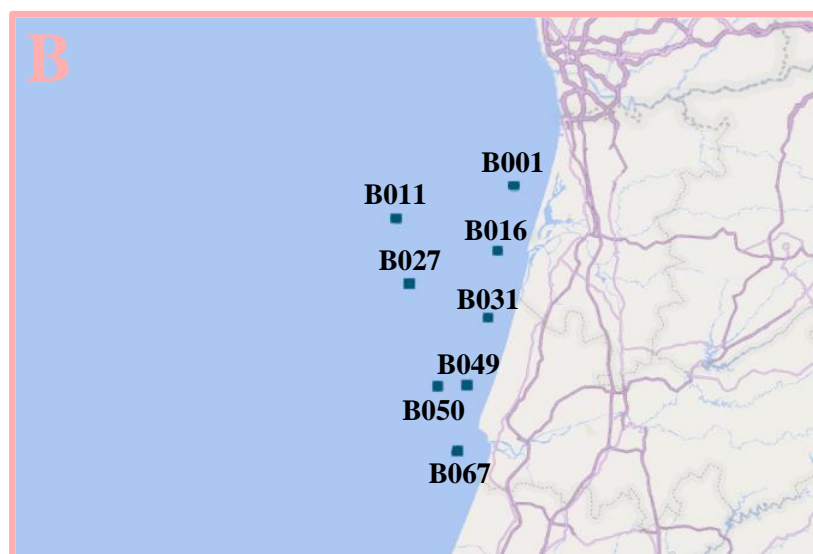


Figura 3.4 - Estações de amostragem de sedimento na Área B (Aveiro à Figueira da Foz).

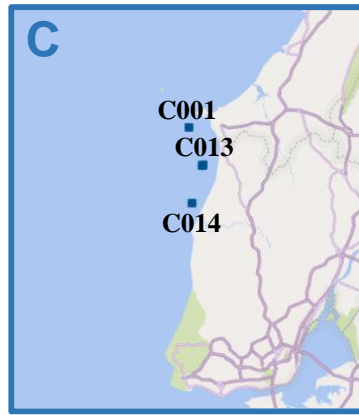


Figura 3.5 - Estações de amostragem de sedimento na Área C (Peniche).

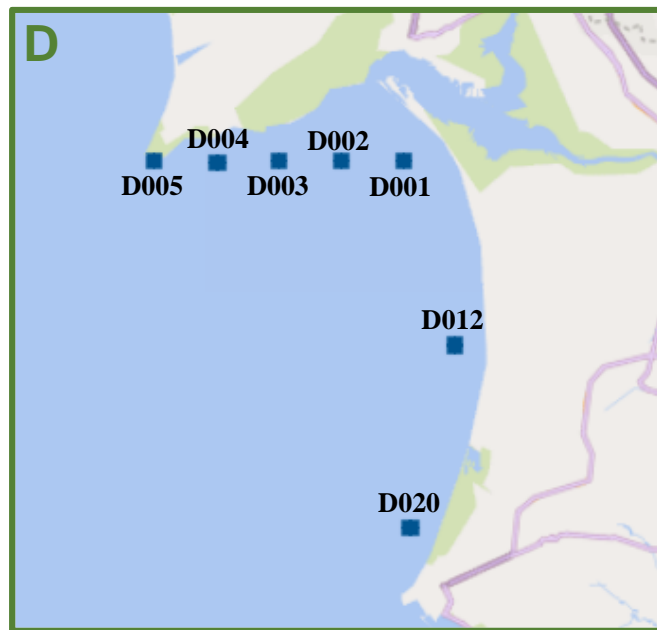


Figura 3.6 - Estações de amostragem de sedimento na Área D (Setúbal a Sines).

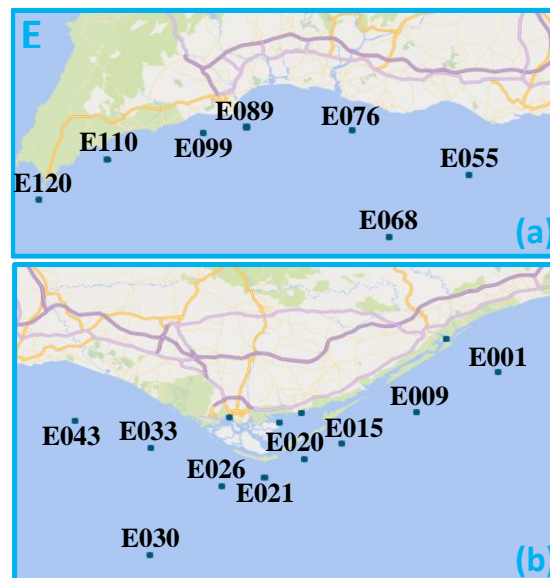


Figura 3.7 - Estações de amostragem de sedimento na Área E (Algarve); (a) Sagres a Albufeira; (b) Albufeira a Tavira

As Figuras 3.8 a 3.11 mostram as estações amostradas (cuja análise dos teores não foi efetuada no presente trabalho) das áreas estuarinas cobertas.

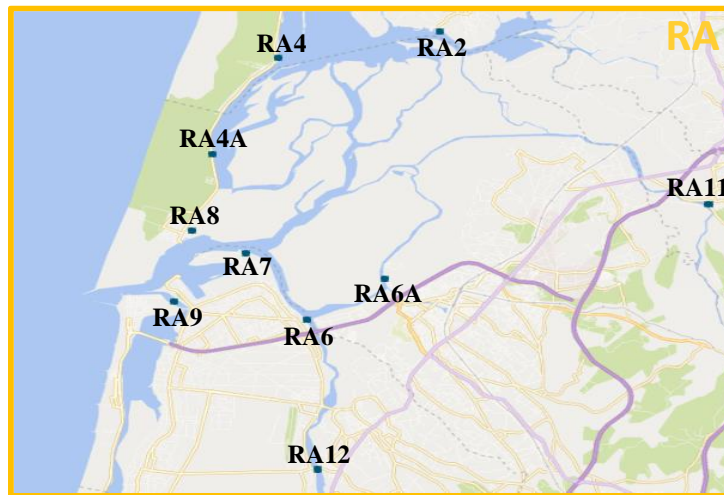


Figura 3.8 - Estações de amostragem de sedimento na Ria de Aveiro.

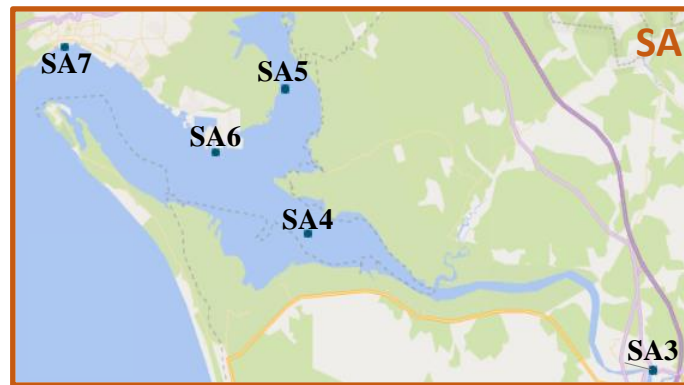


Figura 3.9 - Estações de amostragem de sedimento no estuário do Sado.

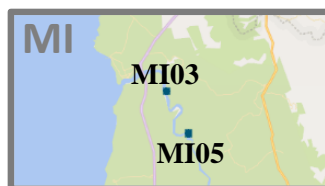


Figura 3.10 - Estações de amostragem de sedimento no rio Mira.



Figura 3.11 - Estações de amostragem de sedimento na ria Formosa.

3.2 AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

A colheita das amostras de sedimento foi efetuada usando dragas do tipo *Smith-McIntyre* para os sedimentos oceânicos.

De modo a preservar as amostras de sedimentos superficiais, estas foram armazenadas em recipientes adequados, congeladas a - 18°C e abrigadas da luz até entrada no laboratório.

No total, como já foi referido, foi incluído neste estudo um tratamento dos dados inerentes a 74 amostras de sedimento oceânico e estuarino superficial (restritas aos primeiros 10 cm de profundidade) recolhidas nos anos de 2018 (áreas A, D, E e SA), e 2019 (áreas B, C, D, RA, SA, MI e RF) sendo os pontos de igual nomenclatura de coordenadas geográficas iguais. Foram também realizadas algumas análises a amostras recolhidas em 2020 na área B, correspondentes às amostras também analisadas nas mesmas estações em 2019.

O ano de recolha de cada amostra pode ser encontrado nas Tabelas A.1 e A.2 no anexo A.

3.3 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

3.3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados encontram-se enunciados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Reagentes e suas características.

Reagente	Marca	Massa volumétrica (g·mL ⁻¹)	Pureza (%)	Descrição
n-Hexano (C ₆ H ₁₄)	Merck	0,663	≥ 98.0	Suprasolv® n-Hexane for gas chromatography ECD and FID (1.04371.2500), 2.5 L
Acetona (C ₃ H ₆ O)	Merck	0,791	≥ 99.8	Suprasolv® Acetone for gas chromatography ECD and FID (1.00012.2500), 2.5 L
Ácido clorídrico (HCl)	Fisher Chemical	1,180	≈ 37	Hydrochloric acid S.G 1.18, Analytical reagent grade, H/1200/PB17, 2.5 L
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Merck	1,325	≥ 99.8	Suprasolv® Dicloromethane for gas chromatography ECD and FID (1.06054.2500), 2.5 L
Iso-octano	Merck	0,690	≥ 99.8	LiChrosolv® iso-octano para cromatografia em fase líquida (1.04717.2500), 2.5 L
Óxido de Silício / Sílica Gel (SiO ₂)	Merck	2,650	---	Silica gel 60 extra pure for column chromatography (1.07754.1000), 1 Kg
Óxido de Alumínio Básico / Alumina Básica (Al ₂ O ₃)	Merck	3,950	---	Aluminium oxide 90 active basic (0.063-0.200 mm) (active stage I) for column chromatography (1.01076.1000)
Sulfato de Sódio Anidro (Na ₂ SO ₄)	Merck	2,680	≥ 99.0	EMSURE® Sodium sulfate anhydrous for analysis (1.06649.1000)
Tiras de cobre	Merck	---	---	EMSURE® Copper foil about 0.1 mm thickness for analysis (1.02700.0250)
Azoto gasoso (N ₂ (g))	Air Liquide	0,97	≥ 99.0	ALPHAGAZ™ 2 AZOTO / N ₂ (Refª. P0272L50S2A001)
Hélio (He (g))	Air Liquide	0,14	99.99	ALPHAGAZ™ 2 HELIO / He (Refª. P0252L50S2A001)

3.3.2 Padrões

De referir que quando se efetuou a preparação de todas as soluções-padrão descritas nos pontos 3.3.2.1 a 3.3.2.5, os balões volumétricos foram lavados duas vezes com n-Hexano previamente a serem acrescentados os volumes de cada solução-padrão. Por fim todas as soluções foram aferidas com n-Hexano e homogeneizadas.

As soluções-padrão foram obtidas através do uso de ampolas com soluções reagente, contendo os 16 PAH US EPA, PAHs adicionais e cinco padrões internos deuterados (Tabela 3.2). Os cinco padrões internos (PI) deuterados utilizados foram: naftaleno-d8 (N-d8), acenafteno-d10 (Ace-d10), fenantreno-d10 (Phe-d10), criseno-d12 (Chr-d12) e perileno-d12 (Per-d12).

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados para preparar as soluções-padrão mãe e de trabalho, e calibradores.

Designação	Descrição	PAHs presentes	Características
Solução reagente A	<i>Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix (Sigma-Aldrich; ref^a CRM 48905)</i>	16 PAHs da US EPA	Concentração de PAHs de 2000 µg·mL ⁻¹ cada, em DCM:benzeno
Solução reagente B	<i>PAH Mix 64 (Dr Ehrenstorfer; ref^a DRE-YA 06100400BD)</i>	- 16 PAHs da US EPA - PAHs adicionais (Per e BeP)	Concentração de PAH de 2000 µg·mL ⁻¹ cada em benzeno:DCM
Solução reagente C	<i>US EPA 8270 Semivolatile Internal Standard Mix (Sigma-Aldrich; ref^a CRM 48902)</i>	Padrões internos deuterados: N-d8, Ace-d10, Phe-d10, Chr-d12 e Per-d12	Concentração de Padrões internos de 2000 µg·mL ⁻¹ em DCM
Reagentes sólidos	<i>Perileno (Fluka; ref.^a 77340)</i>	Per	Reagente no estado sólido
	<i>Benzo(e)pireno (Janssen Chemical; ref.^a 10.561.85)</i>	BeP	

As soluções-padrão mãe e de trabalho utilizadas estão apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Soluções-padrão mãe e de trabalho usadas, concentrações e utilização das mesmas.

Solução-padrão	Concentração (µg·mL ⁻¹)	Utilização
Mãe de PAHs adicionais (BeP e Per)	100	Preparação da solução-padrão de trabalho de 16 PAHs US EPA e PAHs adicionais usada na preparação de calibradores; preparação da solução-padrão de trabalho de 16 PAHs US EPA e da solução-padrão de trabalho de PAHs adicionais, ambas usadas na preparação de soluções-padrão de controle e em fortificações
Trabalho de 16 PAHs US EPA e PAHs adicionais	50	Preparação de calibradores
Trabalho de 16 PAHs US EPA	25	Fortificações e preparação de soluções-padrão de controle
Trabalho de PAHs adicionais	25	Fortificações e preparação de soluções-padrão de controle
Trabalho de 5 padrões internos	25	Padrão interno adicionado aos extratos a analisar
	50	Preparação dos calibradores e das soluções-padrão de controle

3.3.2.1 Soluções-padrão mãe

A solução-padrão mãe de PAHs adicionais, serve para a preparação das soluções-padrão de trabalho que devem conter os PAH adicionais.

Prepararam-se então 50 mL da **solução-padrão mãe de PAHs adicionais** a partir de 5 mg de cada um dos reagentes sólidos: Per e BeP. Por fim adicionou-se solvente n-Hexano:DCM (80:20, v/v), obtendo-se uma concentração final de Per e BeP de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.3.2.2 Soluções-padrão de trabalho

Na Tabela 3.4 estão representadas as soluções-padrão de trabalho

A **solução-padrão de trabalho de 16 PAHs e PAHs adicionais** foi preparada através da diluição de 1000 μL da solução-padrão mãe de PAHs adicionais e 50 μL da solução reagente B (inclui todos os 16 PAHs US EPA). Perfazendo um volume de solução de 2 mL com n-Hexano.

Prepararam-se 10 mL da **solução-padrão de trabalho de 16 PAHs US EPA ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)** adicionando 125 μL da solução reagente A, de concentração inicial de $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, usando como solvente uma mistura de n-Hexano:DCM (90:10, v/v).

Foram preparados 20 mL da **solução-padrão de trabalho de PAHs adicionais ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)**, através da adição de 5 mL da solução-padrão mãe de PAHs adicionais, usando como solvente uma mistura de n-Hexano:DCM (90:10, v/v).

Por fim, procedeu-se à preparação das **solução-padrão de trabalho de 5 PI ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)**, nos volumes de 10 e 5 mL, respetivamente, a partir da diluição de 125 μL da solução reagente C, usando como solvente uma mistura de n-Hexano:DCM (90:10, v/v).

Tabela 3.4 - Soluções-padrão de trabalho utilizadas e respetivas concentrações.

	Composição	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Solvente
16 PAHs US EPA	16 PAHs prioritários US EPA	25,00	n-Hexano:DCM (90:10, v/v)
Padrão Interno	N-d8; Ace-d10; Phe-d10; Chr-d12 e Per-d12	50,00	
PAHs Adicionais	BeP e Per	25,00	
16 PAHs US EPA e PAHs Adicionais	16 PAHs prioritários US EPA, BeP e Per	50	n-Hexano

3.3.2.3 Calibradores

Durante a análise foram utilizados os calibradores representados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Solução padrão usadas para obtenção dos calibradores.

	Volume de solução (mL)	Volume a pipetar (μL)		Solvente	Concentração dos 16 PAHs US EPA e PAHs adicionais ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração dos 5 PI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
		Solução-padrão trabalho de 16 PAHs US EPA e PAHs adicionais (de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Solução-padrão trabalho de 5 PIs (de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
N1	10	20	300	n-Hexano	0,10	1,50
N2	10	72	300		0,36	
N3	10	122	300		0,61	
N4	10	174	300		0,87	
N5	10	224	300		1,12	
N6	10	276	300		1,38	
N7	10	360	300		1,80	
N8	10	446	300		2,23	

A preparação dos calibradores foi efetuada de acordo com os volumes representados na Tabela 3.5.

3.3.2.4 Gama de trabalho

A gama de trabalho foi definida de acordo com metodologias internas do Instituto Hidrográfico (NT.LB.58), sendo utilizados 8 calibradores. Tanto a gama de trabalho do método como a instrumental utilizadas neste estudo encontram-se na Tabela 3.6, para os 16 PAHs US EPA e para os PAHs adicionais analisados.

Tabela 3.6 - PAHs e respetiva gama de trabalho.

PAHs	Gama de trabalho	
	Instrumental ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Método ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
N	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
Acy	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
Ace	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
F	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
Phe	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
A	0,100 a 1,38	6,7 a 120,0
Fluo	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
P	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
BaA	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
Chr	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
BbF *	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
BkF *	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
B(b+k)F *	0,200 a 2,76	13,3 a 184,0
BaP	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
Ind	0,100 a 1,38	6,7 a 92,0
DBA	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
BghiP	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
BeP	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7
Per	0,100 a 2,23	6,7 a 148,7

* Quantificação dos picos cromatográficos do BbF e BkF em conjunto, reportando o parâmetro Benzo(b+k)fluoranteno (B(b+k)F), nas situações em que não houve resolução cromatográfica suficiente (avaliação da resolução com recurso a uma ferramenta do *software* de processamento de dados cromatográficos que determina a altura do vale entre dois picos; aceite existência de resolução cromatográfica para picos com altura de vale superior a 50%).

3.3.2.5 Soluções-padrão de controlo

A validação e verificação da calibração são efetuadas pela análise cromatográfica das soluções-padrão de controlo. Estas soluções são preparadas com o propósito de garantir a qualidade da determinação instrumental, dentro dos limites da gama de trabalho. Estas soluções foram preparadas a partir da adição de diferentes volumes das três soluções-padrão de trabalho:

- a Solução-padrão de trabalho de 16 PAHs US EPA ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- a Solução-padrão de trabalho de PAHs adicionais ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- e a Solução-padrão de trabalho de 5 padrões internos ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Na Tabela 3.7 apresentam-se as concentrações dos padrões de controlo (PC) para um volume final de solução de 10 mL. O solvente utilizado foi então o n-Hexano.

Tabela 3.7 – Soluções-padrão de controlo e concentrações pretendidas para um volume de solução de 10 mL.

Padrão de Controlo	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Volume a pipetar (μL)		
	PAHs individuais / B(b+k)F	PAHs adicionais	dos Padrões Internos	Solução-padrão de trabalho de 16 PAHs US EPA ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução-padrão de PAHs adicionais ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução-padrão de 5 Padrões Internos ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)
PC1a	0,10 / 0,20	0,10	1,5	40	40	300
PC1b	0,20 / 0,40	0,20	1,5	80	80	300
PC2	1,06 / 2,12	1,07	1,5	424	424	300

Resumindo, em cada sequência de análise foi efetuada uma calibração pela análise dos calibradores, sendo esta validada pela análise dos três PC já referidos: um de concentrações próximas às do calibrador de concentração mais baixa da gama de trabalho (PC1a), uma outra com concentrações entre os dois calibradores de concentrações mais baixas da gama de trabalho (PC1b) e a terceira com concentrações na proximidade do nível intermédio da gama de trabalho (PC2). As concentrações do PC1a e do PC1b estão relacionadas com os diferentes LOQ dos PAHs analisados. A verificação da calibração foi efetuada através da análise do PC2, a cada 10 injeções e sempre no final de cada sequência de análise.

3.3.3. Equipamentos

Para além de terem sido utilizados diversos equipamentos (Tabela 3.8), foi também usado material corrente de laboratório, devidamente tratado segundo metodologias internas do laboratório (IL.LB.26), que foi utilizado durante toda a parte experimental.

Tabela 3.8 - Equipamentos utilizados durante a parte experimental.

Equipamento	Descrição	Utilização
Liofilizador	<i>Labcongo Lyph Lock 1L</i>	Liofilização
Moinho	<i>Fritsch Pulverisatte 2</i>	Moagem
Peneiro de malha < 2mm	---	Fracionar a amostra em partículas < 2mm
Seringa analítica automática	<i>eVol da SGE Analytical Science</i>	Preparação das soluções-padrão, bem como para as fortificações e adição dos cinco padrões internos (com seringas de 100 µL e 500 µL)
Balança analítica	<i>Kern EW420</i>	Obtenção da massa de sedimento necessária para a extração, bem como para a aferição dos extratos
Balança	<i>Mettler (PE 1600)</i>	Obtenção das massas necessárias de óxido de alumina e de sílica gel
Mufra	<i>Nabertherm</i>	Desativação dos reagentes (sílica gel, óxido de alumina, sulfato de sódio anidro e terra de diatomáceas)
Extrator acelerado por solvent	<i>ASE 200 Accelerated Solvent Extractor da Dionex</i>	Extração das amostras
Evaporador	<i>TurboVap da Zymark</i>	Concentração de extratos
Cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrómetro de massas	GC-MS da Agilent Technologies (6890N Network GC System acoplado ao 5975B inert XL EI/CI MSD e um amostrador automático 7683B Series injector)	Aquisição de dados cromatográficos

3.3.4 Preparação de reagentes

3.3.4.1 Solução de eluição

Solução preparada no dia da sua utilização, misturando n-Hexano e diclorometano na proporção de 90% e 10% (v/v), respetivamente. A quantidade preparada desta solução foi determinada consoante o número de amostras a analisar.

3.3.4.2 Sílica desativada a 5%

Ativação: Primeiramente é colocada sílica (reagente na Tabela 3.1) num cadinho na mufla a $160^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, durante cerca de 16 horas. Após as 16 horas, transfere-se o cadinho para o exsiccador até ao momento de desativação.

Desativação: Remove-se a sílica ativada do exsiccador, e pesa-se rigorosamente a quantidade de sílica necessária para a purificação num *erlenmeyer* tarado. Adicionar água ultrapura na proporção de 5% (p/p), procedendo-se depois à agitação manual até desaparecer toda a humidade visível, aliviando a pressão (reação exotérmica). Agitar em agitador orbital durante cerca de 45 minutos, interrompendo a meio do tempo para trocar o *erlenmeyer* de posição e assim garantir maior homogeneização.

3.3.4.3 Alumina desativada a 5%

Ativação: Primeiramente é colocado um cadinho com alumina (reagente na Tabela 3.1) na mufla a $400^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$, durante cerca de 16 horas. Após as 16 horas, transfere-se o cadinho para o exsiccador até ao momento de desativação.

Desativação: Remove-se a alumina ativada do exsiccador, e é pesada rigorosamente a quantidade de alumina necessária para a purificação num *erlenmeyer* tarado. Adicionar água ultrapura na proporção de 5% (p/p), procedendo-se depois à agitação manual até desaparecer toda a humidade visível, aliviando a pressão (reação exotérmica). Agitar em agitador orbital durante cerca de 45 minutos, interrompendo a meio do tempo para trocar o *erlenmeyer* de posição e assim garantir maior homogeneização.

3.3.4.4 Sulfato de Sódio Anidro

Pesar o sulfato de sódio necessário para um cadinho, e colocá-lo na mufla a 550°C , durante cerca de 6 horas. Após as 6 horas, transfere-se o cadinho para o exsiccador até ser usado no passo de purificação dos extratos.

3.3.4.5 Terra de Diatomáceas (DE)

Pesar o DE para um cadinho, e colocá-lo na mufla a 550°C , durante cerca de 6 horas. Após as 6 horas, transfere-se o cadinho para o exsiccador até ser usado no passo de purificação dos extratos.

3.3.5 Preparação das amostras

As amostras sofrem um pré-tratamento que envolve primeiramente a crivagem das amostras, em peneiros em aço inoxidável (malha de 2mm), após este processo as amostras são homogeneizadas e colocadas em caixas de *petri* devidamente identificadas, e congeladas a -18°C.

De seguida, as amostras de sedimento são liofilizadas, durante certo período que seja adequado.

Por fim, procede-se à moagem num moinho de óxido de zircónio, para reduzir os sedimentos a pó. Terminado este tratamento, as amostras são conservadas e preservadas a -18°C até ao momento de análise.

3.3.6 Determinação do peso seco

Foi determinado o peso seco de cada uma das amostras com o intuito de apresentar os resultados em base seca (bs). Começou-se por secar durante cerca de 30 minutos, numa estufa a 105°C, as caixas de *petri*. Após este processo, as caixas são deixadas a arrefecer num exsiccador até estarem à temperatura ambiente.

De seguida procedeu-se à pesagem das caixas de *petri*, sendo pesada em cada uma cerca de 1 g de amostra e colocadas na mesma estufa durante 16 horas (pelo menos) dando-se assim a primeira secagem. Concluída a 1ª secagem, as caixas foram colocadas num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente, registando-se a massa da caixa com a amostra. O processo descrito anteriormente é repetido, sendo as amostras submetidas a nova secagem durante cerca de 30 minutos, procedendo-se assim à 2ª secagem. Foi também registada a massa desta 2ª secagem após arrefecimento das amostras.

Caso a diferença de massas seja superior a 0,002 g procede-se a uma 3ª secagem, caso a diferença fosse inferior, é usado para o cálculo do peso seco os valores da 1ª e 2ª secagens. Procedeu-se ainda à análise de duplicados a cada 10 amostras, tendo os duplicados sido aceites no caso de os valores diferirem em menos que 0,10%.

3.3.7 Técnica de extração

A técnica de extração utilizada foi a Extração Acelerada por Solventes (ASE), este tipo de extração permite combinar o aumento de temperatura com a pressão, para uma maior eficiência no processo de extração.

O equipamento é composto por dois carrocéis, onde num são colocadas as células de ASE e no outro *vials* de extração. Para além disso, o ASE possui recipientes de solventes que estão ligados a uma bomba para ser possível introduzir o solvente na célula de extração e também um forno que permite colocar a célula à temperatura pretendida para se proceder à extração.

A célula que contém a amostra é introduzida no forno do equipamento que a aquece até uma temperatura elevada, após atingidas as condições de pressão e temperatura, o solvente é bombeado para o interior dessa mesma célula até a encher, ficando a célula durante alguns minutos à pressão e temperatura definidas no método de extração sem fluxo de solventes. Durante este passo, em que o sistema mantém tais condições, são feitas descargas de solvente para *vials* de recolha dos extratos.

Quando terminado o período estático do sistema (sem fluxo de solvente), é feita uma introdução de solvente na célula, que ocorre ao mesmo tempo da descarga de extrato para o vial de recolha, completando-se assim um ciclo. Por fim ocorre a descarga do extrato para o vial de recolha e é feita a purga da célula com introdução de azoto gasoso, para que seja possível remover todo o extrato da célula. Terminada a extração, os extratos são deixados arrefecer até à temperatura ambiente antes de prosseguir para o próximo passo, e o equipamento retoma as condições operacionais iniciais para que possa ser realizada uma nova extração.

Preparação das amostras para extração:

As células de ASE foram preparadas de forma semelhante para todas as amostras. Foram colocados 2 filtros de celulose (previamente tratados segundo metodologias internas do laboratório – IL.LB.26) em cada uma das extremidades da célula, um antes de colocar o enchimento e outro depois. Após o empacotamento das células com Terra de Diatomáceas (DE) e amostra, ou apenas DE no caso dos brancos, e adicionados os filtros, a célula é fechada e colocada no carrossel superior do equipamento, podendo então dar início à extração no ASE.

É importante garantir a qualidade dos ensaios realizados, devendo ser realizados controlos de brancos, amostras replicadas, amostras fortificadas. O controlo de qualidade de brancos é efetuado com o objetivo de indicar a interferência de outras espécies na amostra e possíveis traços de analito encontrados nos reagentes usados, ou no decorrer da preservação, preparação e análise. Este controlo é feito através da análise de um branco de procedimento (BP), de um branco fortificado (BF) por cada conjunto de amostras analisadas num dia. A amostra fortificada é efetuada por cada conjunto de amostras analisadas.

A extração das amostras foi efetuada em matriz liofilizada e moída em moinho de ágata. A todas as células foi feita uma lavagem da célula com solvente (n-Hexano). Na Tabela 3.9 está sintetizada a preparação das células:

Tabela 3.9 – Preparação das células para a extração ASE.

	Massa (g)		Preparação das células de ASE
	DE	Amostra	
BP	9	---	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar a célula com solvente*; - Colocar 1 filtro de celulose** numa ponta da célula; - Pesar DE; - Empacotar DE na célula, compactando***; - Colocar 1 filtro de celulose** na outra ponta antes de fechar; - Colocar no ASE.
BF	9	---	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar a célula com solvente*; - Colocar 1 filtro de celulose** numa ponta da célula; - Pesar DE; - Empacotar DE até meio da célula; - Fortificar com 50 µL de Solução-padrão de Trabalho de 16 PAHs US EPA (25 µg·mL⁻¹) e 50 µL de SP de Trabalho de PAHs adicionais (25 µg·mL⁻¹). - Empacotar*** com o restante DE; - Colocar 1 filtro de celulose** na outra ponta antes de fechar; - Colocar no ASE.
Amostras	5	15	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar a célula com solvente*; - Colocar 1 filtro de celulose** numa ponta da célula; - Pesar o DE e a amostra; - Homogeneizar a amostra pesada e o DE; - Empacotar DE na célula, compactando***; - Colocar 1 filtro de celulose** na outra ponta antes de fechar; - Colocar no ASE.
Amostras fortificadas	5	15	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar a célula com solvente*; - Colocar 1 filtro de celulose** numa ponta da célula; - Pesar o DE e a amostra; - Homogeneizar a amostra pesada e o DE; - Empacotar a mistura de DE e amostra até meio da célula; - Fortificar com 50 µL de Solução-padrão de Trabalho de 16 PAHs US EPA (25 µg·mL⁻¹) e 50 µL de SP de Trabalho de PAHs adicionais (25 µg·mL⁻¹). - Empacotar*** com o restante DE; - Colocar 1 filtro de celulose** na outra ponta antes de fechar; - Colocar no ASE.

* n-Hexano

**previamente tratados

***compactar com suaves pancadas, para que o solvente possa circular através do DE

- **BP:** Pesar 9 g de DE para um copo de vidro. Colocar um filtro de celulose previamente tratado (tratados conforme o descrito na Instrução de Laboratório IL.LB.26) numa extremidade da célula. Transferir o DE do copo para a célula, empacotando-o, dando ligeiras pancadas, de modo a preencher todo o reservatório da célula do ASE. Colocar outro filtro de celulose no topo da célula, e pressionar suavemente com um instrumento adequado (devidamente lavado). Por fim colocar a célula empacotada e corretamente fechada no ASE, para dar início à extração. O BP é efetuado apenas uma vez por conjunto de amostras ou lote analisado para controlo de qualidade.

- **BF:** Colocar um filtro de celulose previamente tratado, numa das extremidades da célula. Pesar 9g de DE para um copo de vidro, de modo semelhante à preparação da célula de BP. Desta vez, a célula foi empacotada apenas até metade, e depois fortificada com 50 µL de uma Solução-Padrão de Trabalho de 16 PAHs US EPA (25 µg·mL⁻¹) e com 50 µL de uma Solução-Padrão de Trabalho de PAHs adicionais (25 µg·mL⁻¹) (com o intuito de obtenção de uma fortificação a meio da gama de trabalho). Foi então de seguida empacotado o restante DE na célula e introduzido um segundo filtro de celulose no topo da célula. Colocar a célula empacotada e corretamente fechada no ASE, para dar início à extração. O BF é efetuado com cada lote analisado apenas 1 vez por lote para controlo de qualidade.

- **Amostras:** Pesar 15 g da amostra que é pretendida analisar e cerca de 5 g de DE para um copo de vidro, sendo ambas de seguida homogeneizadas. Colocar um filtro de celulose previamente tratado, numa das extremidades da célula e empacotar de modo a preencher todo o reservatório. Por fim, colocar outro filtro de celulose na extremidade superior da célula e pressionar para proceder então ao fecho da célula. Segue-se então a introdução da célula no ASE, para proceder à extração.

- **Amostras fortificadas:** Colocar um filtro de celulose previamente tratado numa extremidade da célula. Pesar 15 g da amostra e cerca de 5 g de DE, e homogeneizar. Metade da mistura é transferida para a célula, sendo esta depois fortificada com 50 µL de uma Solução-Padrão de Trabalho de 16 PAHs US EPA (25 µg·mL⁻¹) e com 50 µL de uma Solução-Padrão de Trabalho de PAHs adicionais (25 µg·mL⁻¹). Seguidamente, foi então colocado o restante DE e o segundo filtro na extremidade superior da célula. Finalmente, a célula é fechada e colocada no sistema de extração, ASE. Apenas é necessária uma amostra fortificada para o controlo de qualidade.

Antes da introdução das células empacotadas no ASE, foram realizadas algumas lavagens, com a mistura de solventes, com o intuito de renovar o solvente que se encontra no interior do sistema. É também efetuada o carregamento da sequência de extração, no *software* do ASE.

As condições de operação utilizadas no ASE, encontram-se na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Condições de operação do ASE.

Parâmetro	Condição de operação
Pressão	2000 psi
Temperatura	100°C
Tempo de pré-aquecimento	1 minuto
Tempo de aquecimento	5 minutos
Tempo estático	5 minutos
Nº de ciclos	2
Volume de solvente	50% do volume da célula de extração
Tempo de purga	120 segundos
Solvente	n-Hexano:acetona (50:50, v/v)

3.3.8 Remoção do enxofre

No fim da extração por ASE, os extratos não possuem apenas os compostos que pretendemos avaliar, também contêm outros componentes químicos (interferentes), como o enxofre, que podem tornar difícil a identificação dos analitos durante a análise cromatográfica. Uma opção para remoção do enxofre presente nas amostras é a adição de cobre ativado.

O cobre foi ativado o mais próximo possível da sua utilização, para garantir máxima ativação. A ativação foi efetuada colocando tiras de cobre submersas em ácido clorídrico ($6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo depois lavadas abundantemente em água ultra-pura, acetona para remoção de vestígios de água, e diclorometano para remover quaisquer vestígios de acetona (caso estes existissem a solução apresentaria uma aparência turva). Por fim é também feita uma lavagem com o solvente, n-Hexano.

A todos os extratos, inclusive os brancos, foram adicionadas tiras de cobre ativado, sendo a quantidade de tiras adicionada dependente da quantidade de enxofre observado na área superficial das tiras de cobre.

Finalmente, os extratos são deixados a repousar num sistema apropriado de refrigeração durante a noite, antes de seguirem para a próxima etapa.

3.3.9 Concentração dos extratos

Foi necessário também proceder à concentração dos extratos (obtidos por ASE) a um volume inferior a 2 mL, tendo-se utilizado o sistema de evaporação *TurboVap*. Os extratos foram concentrados num banho de 25°C com pressão de azoto regulada para 0,5 bar.

Durante este passo de concentração, teve-se o cuidado de não deixar ocorrer evaporação dos extratos até à sua secura, o que poderia levar à perda dos componentes químicos de interesse.

3.3.10 Purificação dos extratos

Os extratos resultantes foram posteriormente purificados de modo a garantir a eliminação de componentes que de alguma forma pudessem interferir com a análise subsequente tais como pigmentos e conteúdo de características lipídicas.

Deste modo foi efetuada a purificação dos extratos por cromatografia de adsorção em coluna de Sílica Gel e Alumina Básica, ambas desativadas a 5%. As colunas são empacotadas com lã de vidro e lavadas com hexano. De seguida, enche-se a coluna com hexano e empacota-se sequencialmente com 5 g de Sílica Gel desativada a 5%, 5 g de Alumina Básica desativada a 5% e meia espátula de Sulfato de Sódio (previamente tratado termicamente a 550°C durante 6h). Após empacotamento, deixa-se escoar o hexano até ao topo dos adsorventes ficando a coluna pronta para receber a amostra.

Introduziu-se a amostra na coluna, regulando-se a torneira de modo a ajustar o caudal de eluição a uma gota por segundo, aproximadamente. Ao recipiente contendo o extrato a purificar, adicionaram-se 5 mL de uma solução de n-Hexano/Diclorometano (90:10, v/v) de modo a lavar o recipiente de evaporação e recuperar o extrato retido nas paredes. Foi repetida a lavagem do recipiente com mais 5 mL da solução. Por fim adicionaram-se 40 mL de eluente à coluna e deixou-se eluir até à secura. Os extratos foram recolhidos para balões volumétricos de 50 mL, ficando armazenados até ao próximo passo.

3.3.11 Concentração e aferição dos extratos purificados

Os extratos purificados foram concentrados a aproximadamente 2 mL em sistema de *TurboVap* e transferidos para tubos graduados previamente pesados. O extrato obtido foi concentrado numa corrente de azoto até ser reduzido a um volume ligeiramente inferior a 1mL.

A cada extrato foram adicionados 50 µL de SP de trabalho de 5 PI (25 µg·mL⁻¹) e depois foram aferidos a peso com solvente (neste caso hexano), de modo a obter massa de extrato igual a 0,663 g (correspondente a 1 mL de hexano considerando que a densidade do hexano é igual à densidade do extrato da amostra). Terminada a aferição os extratos foram transferidos para *vials* contendo *inserts* e colocados em *rackets* para serem analisados no GC-MS. O restante extrato ficou armazenado a 4°C nos tubos em atmosfera saturada de hexano para evitar perdas por evaporação.

3.3.12 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massas

Para a análise cromatográfica foram preparados quatro tipos de padrões: padrão mãe, padrões de trabalho, padrões de calibração e padrões de validação/verificação da calibração (de acordo com o ponto 3.3.2).

Os resultados, assim como todo o controlo instrumental foram obtidos recorrendo ao software *Mass Selective Detector Productivity Chemstation D.03.00*, programado com os métodos de processamento desenvolvidos internamente para a quantificação de PAHs.

As condições experimentais do método de aquisição usadas no trabalho efetuado apresentam-se na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Condições experimentais do método de aquisição usado no GC-MS da Agilent Technologies.

Componente	Parâmetro	Condição
Seringa	Capacidade	10 μL
Lavagem da seringa	Pré-injeção	Hexano; 5 ciclos; 10 μL
	Pós-injeção	Iso-octano; 5 ciclos; 10 μL
	Rinse	3 vezes; 10 μL
Injetor	Tipo	On column
	Temperatura	3°C acima da temperatura do forno
	Volume de injeção	1 μL
Cromatógrafo	Gás de arrasto	Hélio, 1,1 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pressão constante
	Programa temperaturas	60°C (1 min)
		9°C·min ⁻¹ até 100°C
		5°C·min ⁻¹ até 310°C
Interface	310°C (30 min)	
Espectrómetro de massa	Ficheiro de calibração	Atune.u (condições de autotune)
	Temperatura da fonte iónica	230°C
	Temperatura do quadropolo	150°C
	Ionização	Impacto eletrónico a 70 eV
	Electromultiplicador	0 V acima do valor do autotune
	Modo de registo de espetros	Selected Ion Monitoring (SIM)

3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PAHS

Antes de se proceder à análise por GC-MS é necessário proceder à verificação das condições:

- Verificar se existiam *vials* para resíduos, de modo que o equipamento pudesse descartar os solventes e extratos usados na lavagem da seringa;
- Verificar se os *vials* de solvente pré-lavagem (n-Hexano) e solvente pós-lavagem (isooctano) continham quantidade suficiente dos respectivos solventes;
- Verificar a existência de fugas no sistema, bem como calibrar o detetor do MS, podendo tal ser feito através de um *tune* do detetor MS. Com o *tune*, é gerado um relatório que permite verificar as condições operacionais do equipamento.

Os PAHs estudados foram identificados e quantificados com base nos respectivos íons de identificação e quantificação (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 - Íons usados na quantificação e identificação cromatográfica dos PAHs estudados.

Analito	Massa/Carga do íon (m/z)	
	Íons de quantificação	Íons de confirmação
N-d8	136	68
N	128	102
Ace-d10	164	162
Acy	152	151
Ace	153	154
F	166	165
Phe-d10	188	184
Phe, A	178	176
Chr-d12	240	236
Fluo, P	202	200
BaA, Chr+Tph	228	229
Per-d12	264	260
BbF, BkF, BaP	252	250
Ind, BghiP	276	274
DBA	278	279
BeP	252	250
Per	252	250

Utilizando o software, *Mass Selective Detector Productivity Chemstation D.03.00*, procedeu-se à definição da sequência a ser usada para cada análise, definindo a ordem de análise de acordo com as posições dos extratos, bem como o nome do ficheiro com o qual o cromatograma seria guardado e também o método de aquisição a ser utilizado.

Após selecionada a sequência para a análise, procedeu-se à transferência dos calibradores, padrão de controlo e extratos das amostras para *vials* que continham no seu interior um *insert* onde eram colocados os extratos. Depois de transferidos os extratos para os respetivos vials e destes serem devidamente selados com tampas, foram colocados no tabuleiro de amostragem do equipamento pela ordem que foi definida na sequência carregada no GC-MS.

As sequências de análise utilizadas seguiram sempre uma ordem específica, com o intuito de cumprir o controlo de qualidade. Foi sempre feita primeiro uma injeção de n-Hexano, depois injeção dos calibradores, por ordem de concentração crescente, de seguida os padrões de controlo e os extratos das amostras, sendo injetado o padrão de controlo com a concentração a meio da GT a cada 10 injeções e no final de cada sequência (Tabela 3.6).

Todos estes cálculos foram realizados em ficheiros *Microsoft Excel* interligados, que permitiam a organização e melhor perceção dos dados obtidos e do cumprimento do controlo de qualidade a associado (controlo de qualidade realizado no anexo C).

Para os cálculos da recuperação foi utilizada a seguinte equação:

Equação 3.1 - Cálculo da taxa de recuperação.

$$\% \text{ Recuperação do BF} = \frac{[X]_{\text{Obtida}}^{\text{BP}}}{[X]_{\text{Teórica}}} \times 100$$

$$\% \text{ Recuperação da AF} = \frac{[X]_{\text{Obtida}}^{\text{AF}} - [X]_{\text{Obtida}}^{\text{A}}}{[X]_{\text{Teórica}}} \times 100$$

Onde,

$[X]_{\text{Obtida}}^{\text{BP}}$ – concentração do analito X obtida pela análise dos cromatogramas no ensaio do BP

$[X]_{\text{Obtida}}^{\text{AF}}$ – concentração do analito X obtida pela análise dos cromatogramas da amostra fortificada;

$[X]_{\text{Obtida}}^{\text{A}}$ – concentração do analito X obtida pela análise dos cromatogramas da amostra;

$[X]_{\text{Teórica}}$ – concentração do analito X que existe em teoria no extrato conseguido do ensaio de recuperação.

A calibração, em análises quantitativas, relaciona a resposta de um sistema de medida de um processo com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Deve ser sempre efetuada com cada análise, existindo critérios para a aceitação da calibração, como a linearidade e a estabilidade entre calibrações. A gama de concentração da calibração deve contemplar a totalidade da faixa de trabalho da rotina do laboratório, por pelo menos, 5 pontos homogeneamente distribuídos na reta (Castro et al., 2000).

Para realizar a quantificação de amostras propriamente dita, foi essencial traçar a reta de calibração contendo padrões do N1 ao N8 de concentrações conhecidas. Estes padrões foram sempre injetados a partir do N1 até ao N8, ou seja, do valor mais baixo para o de maior concentração. A calibração possibilitou então o cálculo da seguinte relação:

Equação 3.2 - Reta de calibração.

$$\frac{A_X}{A_{PI}} = m \frac{[X]_{ext}}{[PI]_{ext}} + b$$

Onde,

A_X e A_{PI} – área do pico gerado pelo analito X ou do padrão interno (PI) nos cromatogramas respetivos;

$[PI]_{ext}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) – concentração do PI no extrato analisado no GC-MS;

m – declive da reta de calibração;

b – ordenada na origem;

$[X]_{ext}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) – concentração do analito X obtida através da reta de calibração respetiva (dada pelo GC-MS).

Assim, foi possível efetuar o cálculo da concentração do analito X correspondente ao volume de extrato utilizado, através da equação:

Equação 3.3 - Cálculo da concentração do analito X no extrato.

$$[X]_{ext} = \frac{\left[\left(\frac{A_X}{A_{PI}}\right) - b\right]}{m} \times [PI]_{ext}$$

Para fazer a conversão para base seca para cada analito foi utilizada a equação:

Equação 3.4 - Cálculo para conversão da concentração em base seca e correção da recuperação.

$$[X] = \frac{[X]_{ext}^a \times V_f}{m_a} \times \frac{100}{\% Rec} \times \frac{100}{\% PS}$$

Onde,

$[X]_{ext}^a$ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) – concentração do analito X na amostra, com correção à recuperação em matriz inerte e ao peso seco;

V_f (mL) – volume final da amostra sujeito à análise, ou seja, 1 mL;

m_a (kg) – massa da amostra;

% Rec – recuperação; para fazer a correção da recuperação para N e Acy com recuperações médias calculadas previamente, estipuladas pela validação do método;

% PS – peso seco; para conversão para peso seco introduz-se o termo $100/\%PS$.

3.5 CONTROLO DE QUALIDADE

Durante todo o processo laboratorial foram respeitadas as normas de laboratório de acordo com NP EN ISO/IEC-17025:2018 e Guia RELACRE 13, 2000. O laboratório tem um grande conjunto de métodos de ensaio acreditados de acordo com a ISO 17025, estando os métodos validados e os resultados apresentados com uma incerteza associada.

O controlo de qualidade do método inclui a monitorização e verificação dos seguintes parâmetros:

- Análise de Duplicados;
- Análise de Brancos de Procedimento (BP);
- Ensaio de Recuperação (BF e AF);
- Calibração Analítica (coeficiente de correlação da reta);
- Análise de Soluções-Padrão de Controlo;

Para a grande maioria dos duplicados efetuados neste estudo para as amostras de sedimentos o critério de aceitação (CA) foi verificado.

A análise de BP, realizada em todas as análises, possibilita a deteção de contaminações existente durante a execução laboratorial. Esta análise pode ser então usada para corrigir os resultados quando os teores de PAHs do branco se aproximam do LD do analito em questão.

Os ensaios de recuperação, permitiram verificar a eficiência não só da análise como de todo o processo laboratorial, permitiram também a correção dos resultados obtidos.

A calibração, cumpre o controlo de qualidade quando o coeficiente de correlação é superior ou igual a 0,990. Quando este critério não foi cumprido foi desprezado o(s) padrão(s) de calibração em causa, tendo em conta que no mínimo são precisos 5 padrões para a obtenção de uma reta de calibração. Sendo assim, nos casos em que este coeficiente não cumpriu os critérios poderá ser necessário repetir a análise, ou através da eliminação de algum ponto da curva ou até mesmo:

- do N1 ao N6: só pode ser eliminado 1 ponto da reta;
- do N1 ao N8: podem ser eliminados até 3 pontos da reta.

De referir que nunca devem ser eliminados N1, N6 e N8 uma vez que correspondem aos extremos da reta de calibração.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Para a análise e tratamento dos resultados de PAHs obtidos foi usada a aplicação informática Microsoft Office Excel 2016. Esta aplicação foi ainda utilizada para a elaboração dos gráficos em que estão representadas as estações amostradas e os teores e distribuições dos diversos PAHs.

Para efeitos de cálculo, todos os valores ao nível do LQ foram considerados em metade do seu valor absoluto conforme definido no artigo 7º do Decreto-Lei n.º 103/2010. Para efeitos do somatório dos PAHs, os valores ao nível do LQ foram considerados como zero. Os gráficos foram efetuados de acordo com o referido.

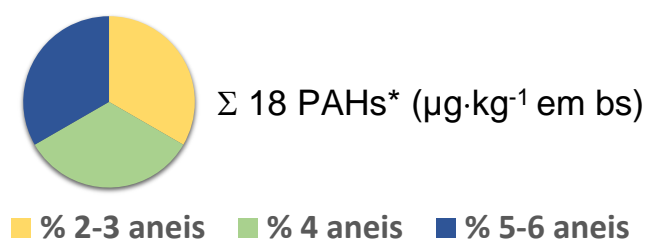
4.1 DISTRIBUIÇÃO E FONTES DE PAHS

Nas Figuras 4.2 a 4.8 estão representadas as distribuições por número de anel dos PAHs nas regiões amostradas.

As áreas de amostragem A, B e C apresentaram os teores de PAHs em todas as estações abaixo do LQ, pelo que não foi efetuada a representação gráfica da distribuição dos PAHs por número de anel.

As estações amostradas cuja soma de PAHs se encontra abaixo do LQ, estão representadas por “<27 µg/kg” pelo que os dados da distribuição de PAHs por anel não são representados.

Os gráficos circulares representam as distribuições de PAHs de acordo com a Figura 4.1:



* PAHs US EPA + Tph (junto com o Chr) + BeP

Figura 4.1 - Gráficos circulares representativos da distribuição por número de anel e somatório dos PAHs.

As distribuições por número de anel e somatório dos PAHs, por ponto de amostragem dos sedimentos oceânicos estão representadas nas Figuras 4.2 a 4.4.

4.1.1 Área D

Observando a Figura 4.2 verifica-se que as estações com somatório de PAHs mais elevado foram as estações D003 (209 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), e D004 (971 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (campanha de 2019) e D005 (672 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (campanha de 2018). Verifica-se ainda que há uma maior % de PAHs de 4-6 anéis, pelo que a origem será pirogénica, ou seja, provenientes de combustão incompleta.

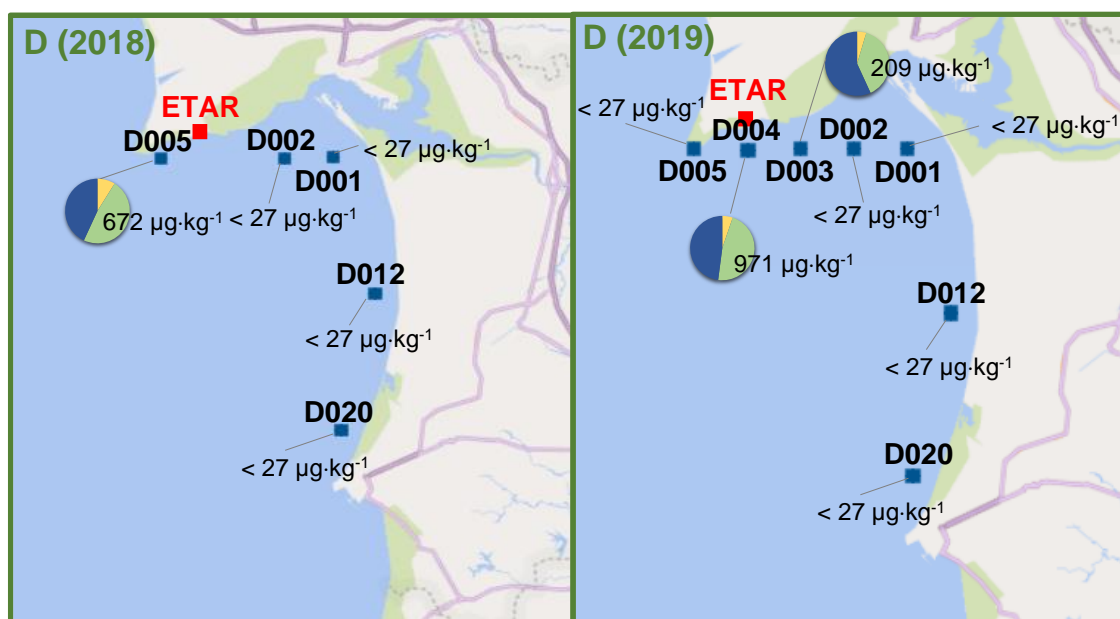


Figura 4.2 - Estações amostradas e ETAR da área D e respetiva distribuição e somatório de PAHs.

Estes valores elevados nestas estações na zona de Sesimbra podem estar associados à atividade portuária ou à proximidade de instalações de tratamento de resíduos (ETAR – SIMARSUL) (colocar a referência da pesquisa).

Tendo em consideração a Portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro verifica-se que as estações D005 (campanha de 2018) e D004 (campanha de 2019) estão classificadas como “classe 2 – contaminação vestigiária”, com o Σ 18 PAHs entre 300-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Já para as restantes estações o nível de contaminação é de “classe 1 – material limpo”, uma vez que o Σ 18 PAHs é inferior a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

4.1.2 Área E

De acordo com a Figura 4.3 (a), verifica-se que nas estações de amostragem E110 e E099 foram observados os maiores teores de PAHs, e que a origem dos mesmos é pirogénica. Na Figura 4.3 (b), denota-se a mesma origem (pirogénica), e um teor mais elevado de PAHs nas estações E020 e E015.

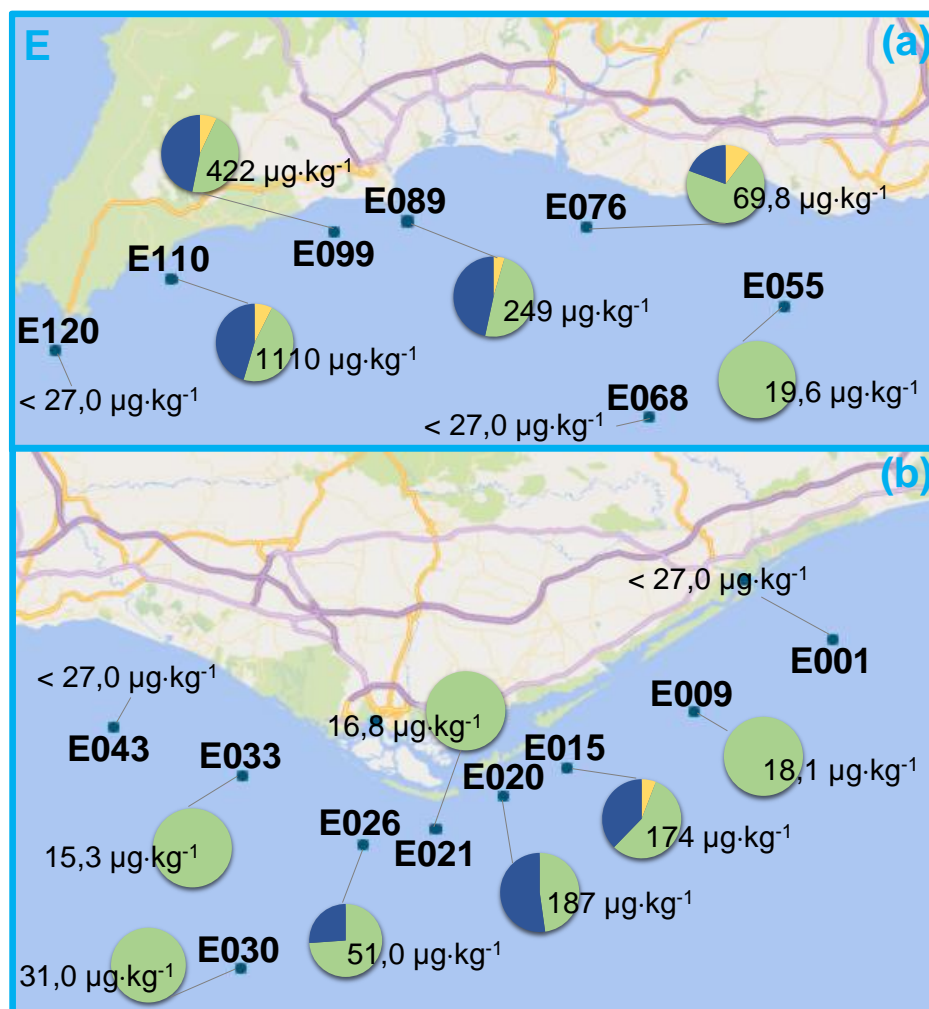


Figura 4.3 - Estações amostradas da área E e respetiva distribuição e somatório de PAHs; (a) entre Sagres e Albufeira; (b) entre Albufeira e Tavira.

Esta área na sua generalidade apresenta alguns teores de somatório de PAHs superiores aos das restantes áreas, apesar de serem valores muito baixos. Isto pode dever-se à atividade portuária e/ou antropogénica típica desta zona costeira.

Nas Figuras 4.4 a 4.7 apresentam-se os resultados obtidos em termos de somatório de PAHs e ainda tendo em consideração o número de anéis, nas áreas estuarinas estudadas.

De acordo com a portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro. A estação E110 é classificadas como “classe 2 – contaminação vestigiária”, com o Σ 18 PAHs entre 300-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. As restantes estações são classificadas de “classe 1 – material limpo”.

4.1.3 Ria de Aveiro

Observando a Figura 4.4 verifica-se que em todas as estações há predominância dos PAHs de 4 a 6 anéis, salvo para as estações RA11, RA9, RA4A, RA2 e RA6A onde a percentagem de PAHs de 2 a 4 anéis é superior.

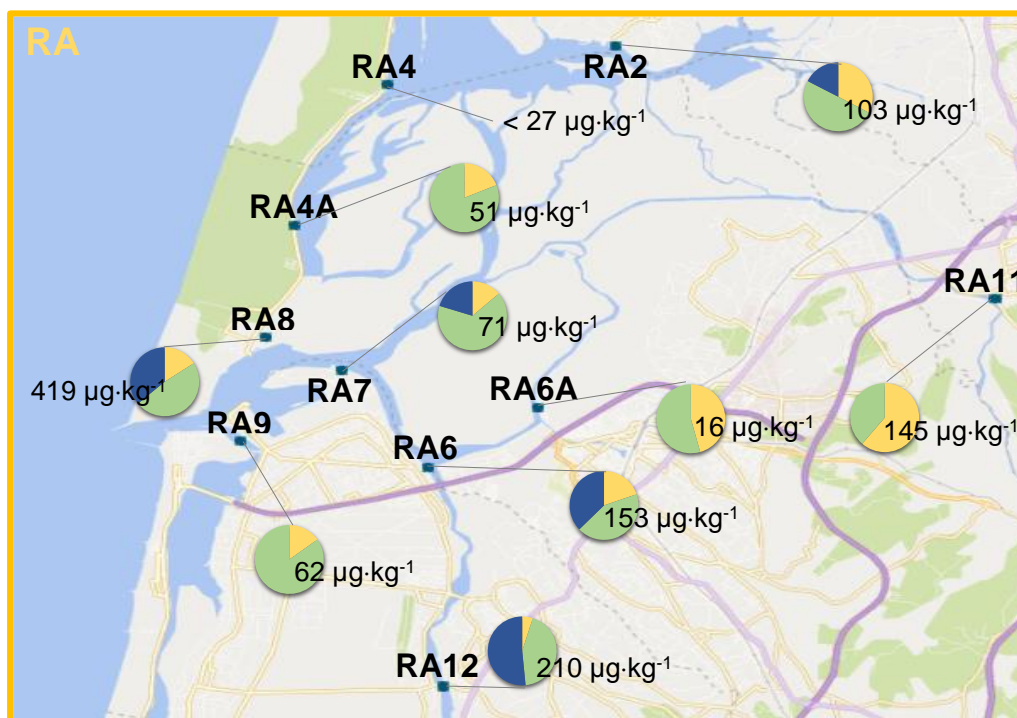


Figura 4.4 - Estações amostradas da área RA e respetiva distribuição e somatório de PAHs.

Podemos assim (através desta análise) aferir que nesta zona da ria de Aveiro a origem dos PAHs é petrogénica (para as estações referidas anteriormente) apesar da soma de PAHs não ser muito elevada comparativamente às restantes áreas já analisadas. Será posteriormente feita uma avaliação das razões de diagnóstico para as mesmas estações, de modo a confirmar (ou não) as origens referidas.

De acordo com a portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro a estação RA8 está classificada como “classe 2 – contaminação vestigiária”. Já para as restantes estações o nível de contaminação é de “classe 1 – material limpo”, uma vez que o Σ 18 PAHs é inferior a 300 µg·kg⁻¹.

4.1.4 Estuário do sado

Na área de amostragem representada na Figura 4.5 também podem ser observados valores elevados de somatório de PAHs, isto deve-se ao facto de se encontrar um estaleiro naval, Lisnave de Setúbal, junto à estação amostrada SA6, podendo considerar-se que os sedimentos superficiais têm origem pirogénica.

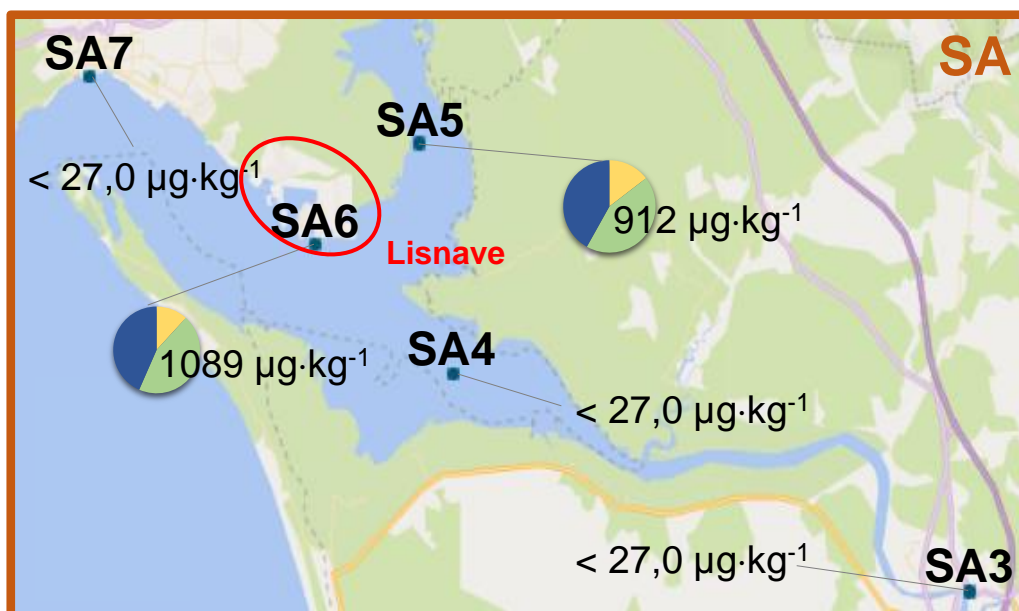


Figura 4.5 - Estações amostradas da área SA e respetiva distribuição e somatório de PAHs.

De acordo com a portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro as estações SA5 e SA6 estão classificadas como “classe 2 – contaminação vestigiária”, com o Σ 18 PAHs entre 300-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Já para as restantes estações, uma vez que o Σ 18 PAHs é inferior a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, o nível de contaminação é de “classe 1 – material limpo”.

4.1.5 Rio Mira

Nesta área o somatório de PAHs analisados é relativamente baixo em comparação com as restantes áreas amostradas, sendo a estação MI05 de origem petrogénica (abundância de PAHs de 2 a 4 anéis), como pode ser aferido através da Figura 4.6. Será mais uma vez feita uma avaliação/confirmação destes resultados através das razões de diagnóstico.

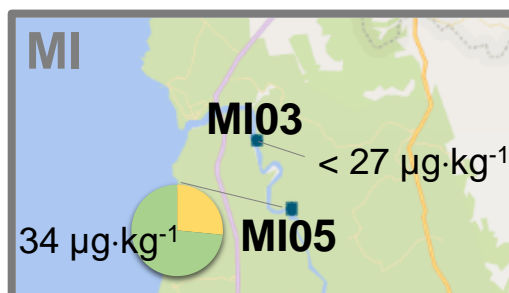


Figura 4.6 - Estações amostradas da área MI e respetiva distribuição e somatório de PAHs.

De acordo com a portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro nesta área de amostragem, em todas as estações foi considerado um nível de contaminação de “classe 1 – material limpo”, uma vez que o Σ 18 PAHs é inferior a $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

4.1.6 Ria Formosa

Pela observação da Figura 4.7, pode-se referir que a estação onde foram observados teores mais elevados do somatório dos 18 PAHs estudados foi a estação RF30, área cujos sedimentos superficiais poderão ser de origem pirogénica.

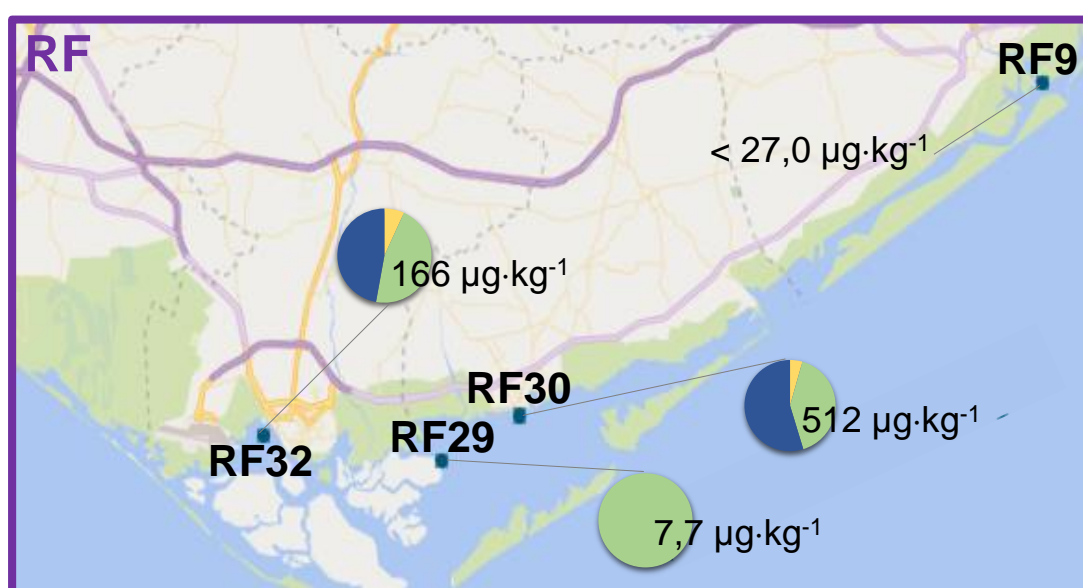


Figura 4.7 – Estações amostradas da área RF e respetiva distribuição e somatório de PAHs.

De acordo com a portaria nº 1450/2007 de 12 de novembro a estação RF30 também está classificada como “classe 2 – contaminação vestigiária”. As restantes estações apresentam um nível de contaminação correspondente à “classe 1 – material limpo”

Conclui-se relativamente às quatro áreas interiores estudadas e tendo em consideração a distribuição de somatório dos 18 PAHs de cada estação amostrada que as estações E110, E099, D004, D005, SA5, SA6 e RF30 exibem os teores mais elevados, variando de $1110 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs a $422 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs.

Adicionalmente foi apurado que os PAHs identificados nas áreas amostradas poderão ser maioritariamente de origem pirogénica, salvo nas estações MI05, RA2, RA4A, RA6A, RA9 e RA11 que poderão ser de origem petrogénica.

Foi também aferido neste estudo que os PAHs mais abundantes nos sedimentos são o Fluo, o P e o B(b+k)F (Figura 4.8).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

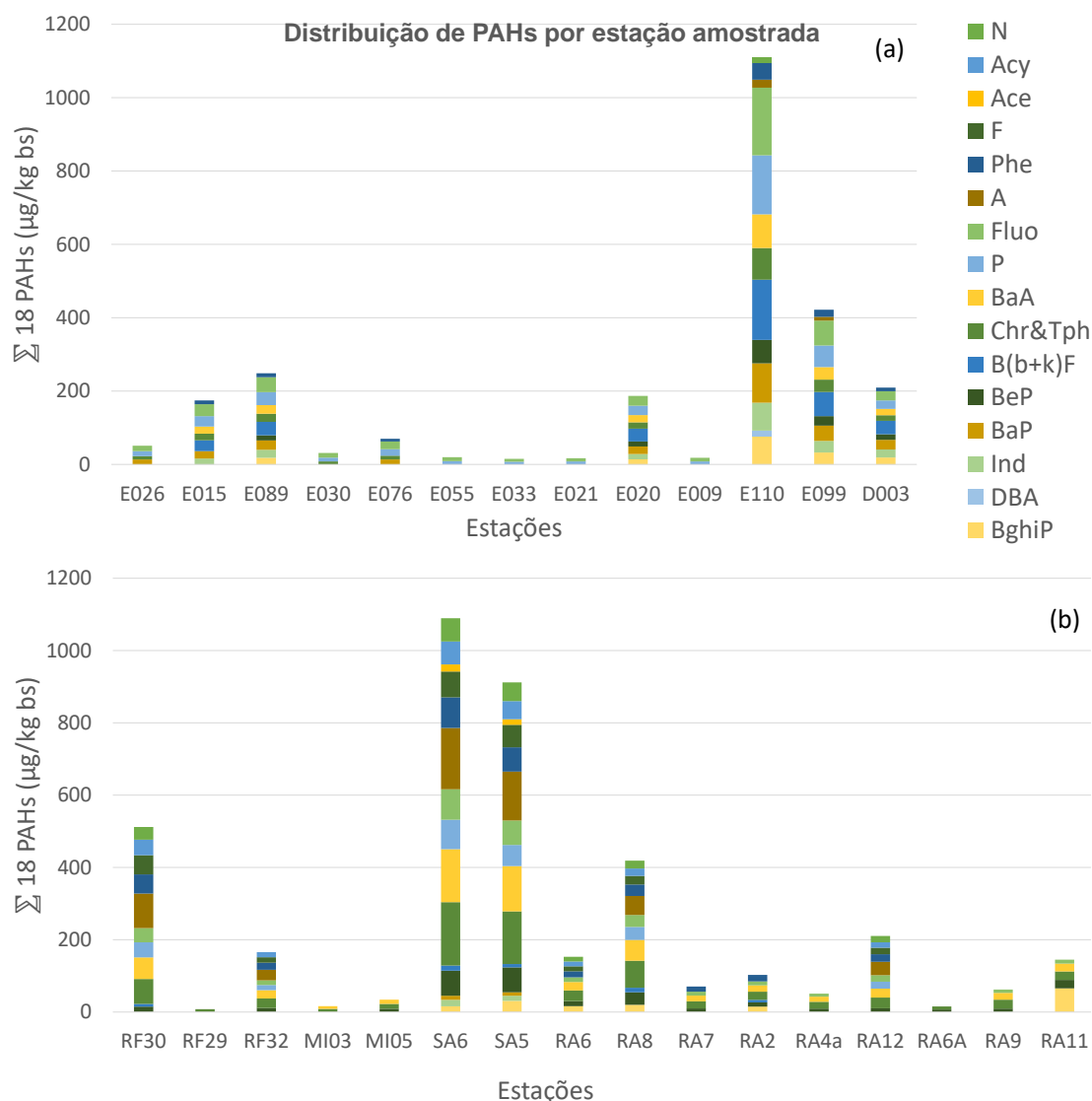


Figura 4.8 – Distribuição de teor de PAHs por ponto de amostragem; As estações não referidas apresentam os teores de PAHs < LQ; (a) amostras de sedimento oceânico e (b) amostras de sedimento estuarino.

Na Tabela 4.1 apresentam-se os resultados obtidos no presente trabalho nas áreas oceânicas e estuarinas e ainda os resultados descritos em outros trabalhos, nomeadamente: em rias espanholas como a de Arousa e de Vigo, e grandes focos de atividade antropogénica na China como a baía de *Linding* e o porto de Macao.

Em Gonçalves et al., 2016 obtiveram-se valores semelhantes de somatório de PAHs (16 PAHs da US EPA em vez dos 18 analisados no presente estudo) para duas das áreas estuarinas também estudadas neste trabalho, 117 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs para o estuário do Sado e 57 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs na ria Formosa, áreas que apresentam o teor mais elevado de somatório de PAHs em relação às áreas estuarinas. No entanto, no estudo de Rocha e Palma (2019), onde foram analisados vários estuários, os teores de somatório obtidos encontram-se dentro dos intervalos adquiridos em estudos anteriores, sendo os valores mais elevados registados para o estuário do Sado, corroborando-se portanto a origem pirogénica dos sedimentos nesta região, com outros estudos.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Em Serafim et al. (2013), os resultados obtidos dizem respeito a amostras colhidas no ano de 2010 verificando-se uma semelhança de nº de anel predominante em todas as áreas exceto no rio Mira. Neste estudo foi também o estuário do Sado que apresentou maior valor na soma de PAHs, enquanto que o rio Mira foi a área estuarina estudada com menor concentração dos 18 PAHs usados no estudo

Os restantes ecossistemas marinhos contendo atividade antropogénica de outros estudos como, Pérez-Fernández et al., 2015; Viñas et al., 2009 e Mai et al., 2002, servem para perceber que de facto existe uma semelhança na origem dos PAHs. Contudo o somatório de PAHs obtido no presente estudo, não é comparável aos resultados obtidos em Espanha e na China. Nestas regiões, os intervalos do somatório de PAHs são muito superiores, cerca de 23-6647 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs para a ria de Arousa em Espanha, e 9220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs para o porto de Macao, na China. Isto pode-se dever à diferença de densidade populacional, e consequente, à atividade portuária elevada, nestes locais em comparação com as zonas estuarinas portuguesas estudadas.

Tabela 4.1 – Resultados do somatório de PAHs em diferentes estudos.

Área	PAHs usados no estudo	Σ PAHs ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs)	Nº de anel predominante	Referência
Estuário do Sado, Portugal	Σ 18 PAHs	<27-1089	4-6	Presente trabalho
Ria Formosa, Portugal	Σ 18 PAHs	<27-512	4-6	
Ria de Aveiro, Portugal	Σ 18 PAHs	<27-419	2-4	
Rio Mira, Portugal	Σ 18 PAHs	<27-34	4-6	
Estuário do Sado, Portugal	16 US EPA, BeP	44-2237	4-6	Serafim et al., 2013
Ria Formosa, Portugal	16 US EPA, BeP	46-1998	4-6	
Ria de Aveiro, Portugal	16 US EPA	15-26	2-4	
Rio Mira, Portugal	16 US EPA	37-57	2-4	
Estuário do Sado, Portugal	16 US EPA, BeP	44-2237	4-6	Rocha e Palma, 2019
Ria Formosa, Portugal	16 US EPA, BeP	46-1998	4-6	
Ria de Aveiro, Portugal	16 US EPA, BeP	123-781	4-6	
Estuário do Sado, Portugal	16 US EPA	117	3-4	Gonçalves et al., 2016
Ria Formosa	16 US EPA	57	3-4	
Ría Arousa, Espanha	16 US EPA	23-6647	4	Pérez-Fernández et al., 2015
Ría de Vigo, Espanha	12 US EPA, BeP	28-3203	4-6	Viñas et al., 2009
Linding Bay, China	16 US EPA	156-1006	4-6	Mai et al., 2002
Macao Harbor, China	16 US EPA	9220	4-6	

4.2 RAZÕES DE DIAGNÓSTICO

As razões de diagnóstico são utilizadas para discriminar fontes de PAHs, sendo efetuadas tendo em consideração PAHs com a mesma razão massa/carga. A diferença entre calores de formação dos PAHs integrantes no cálculo da razão permite aferir o nível de discriminação entre fontes.

No presente estudo como já foi referido, também pode ser utilizada a razão LMW/HMW para apurar a origem dos PAHs, sendo esta razão inferior a 1 em todas as estações de amostragem. Assim, a origem dos PAHs segundo este tipo de estudo permite concluir que os PAHs em todas as estações são de origem pirogénica ($LMW/HMW < 1$), este resultado permite então avaliar de um modo sintético e mais rápido a origem dos PAHs.

Na Figura 4.9 os gráficos elaborados apresentam as razões $A/(A + Phe)$ para Fluo/(Fluo + P), $BaA/(BaA + Chr)$ para Fluo/(Fluo + P) e $Ind/(Ind + BghiP)$ para Fluo/(Fluo + P). Em todos os pontos de amostragem das áreas amostradas a razão Fluo/(Fluo + P) é superior a 0,5 indicando combustão de carvão e biomassa (madeira e/ou queima de carvão) como potenciais fontes de PAHs. A razão $A/(A + Phe)$ é maior que 0,1 apontando para ter combustão como fonte primária. As razões $BaA/(BaA + Chr)$ e $Ind/(Ind + BghiP)$ encontram-se maiores ou iguais a 0,5 para todos os locais confirmando então a combustão como um principal fonte de PAHs para os locais analisados.

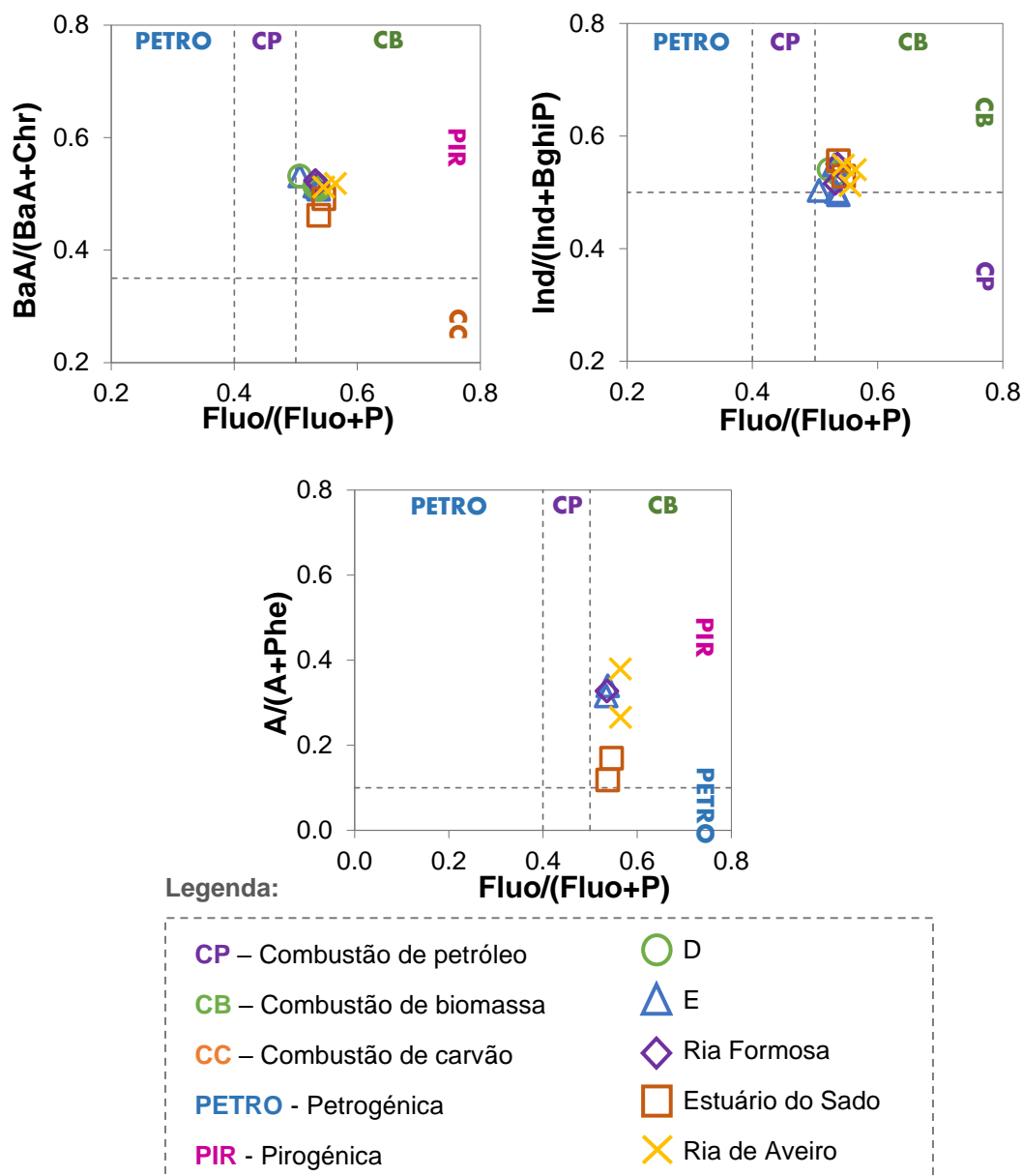


Figura 4.9 - Razões de diagnóstico e faixas limítrofes (diferenciação de fontes) (Tobiszewski e Namieśnik, 2012).

No entanto, como podemos ver na Figura 4.9, alguns pontos de amostragem no Algarve e no estuário do Sado demonstraram uma ligeira influência da combustão de petróleo. Este facto não pode ser diretamente corroborado com nenhum fator como a influência industrial ou o escoamento de águas na zona (como já tinha sido analisado anteriormente na distribuição de PAHs na área E), podendo ter a ver com o intenso tráfego marinho na região.

Assim, podemos aferir que os processos de combustão são a principal fonte, corroborando o anteriormente referido. Ainda que a combustão de biomassa seja o processo mais evidente, é notório, para algumas estações na área de Sagres/Tavira (área E) um ligeiro contributo da combustão de petróleo.

4.3 ORIGEM DO PERILENO

Para comprovar a sua origem, na Figura 4.10 estão representadas as percentagens de Per relativamente ao total de PAHs contendo 5 anéis (Σ 5-isómeros) e ao total de PAHs parentais analisados (Σ 18 PAHs).

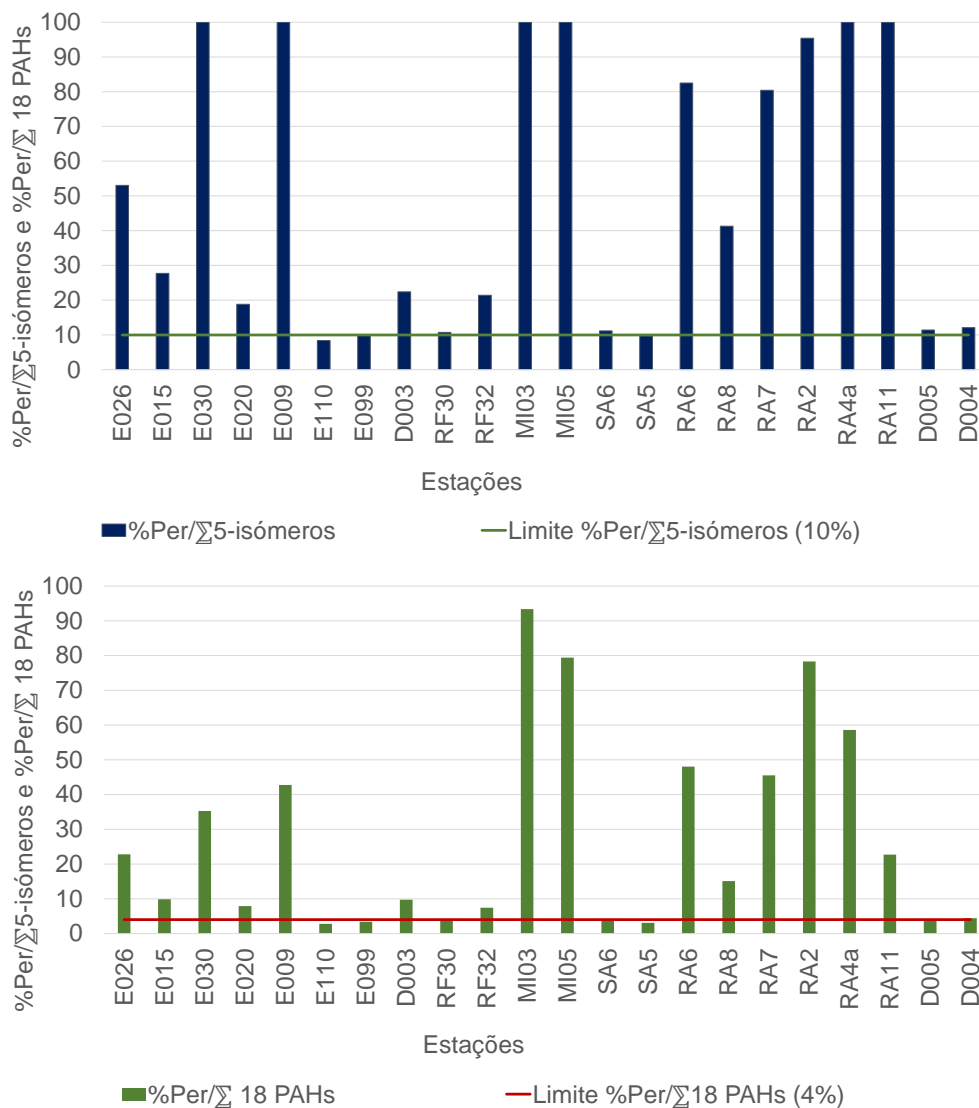


Figura 4.10 - Percentagem de Per relativamente a Σ 5-isómeros e a Σ 18 PAH; Σ 5-isómeros: B(b+k)F, BeP, BaP, DBA e Per.

Os dados apresentados na Figura 4.10 revelam que o Perileno é, para a maioria dos sedimentos, formado por diagénese dado que a %Per/ Σ 5-isómeros excede o critério de 10%, excetuando-se as estações E099 (9,9%), E110 (8,4%) e SA5 (9,7%) para as quais é evidenciado uma contribuição pirogénica.

Em relação às contribuições pirogénicas de Per em relação ao somatório dos PAHs estudados, foram encontradas %Per/ Σ 18 PAHs inferiores a 4% para as estações E110 (2,8%), E099 (3,4%), SA6 (3,8%), SA5 (3,1%) e D005 (3,7%) sendo corroborada a origem pirogénica do Per nestes sedimentos.

4.4 HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS COM POTENCIAL CARCINOGÊNICO

Existem alguns PAHs que são considerados como tendo potencial carcinogénico (BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, Ind e DBA) (CPAHs) (Qiao et al., 2006), assim sendo foi analisado o somatório dos PAHs carcinogénicos (Σ CPAHs). Os resultados obtidos para o somatório dos PAHs considerados com potencial carcinogénico encontram-se representados nas Figuras 4.11 a 4.15.

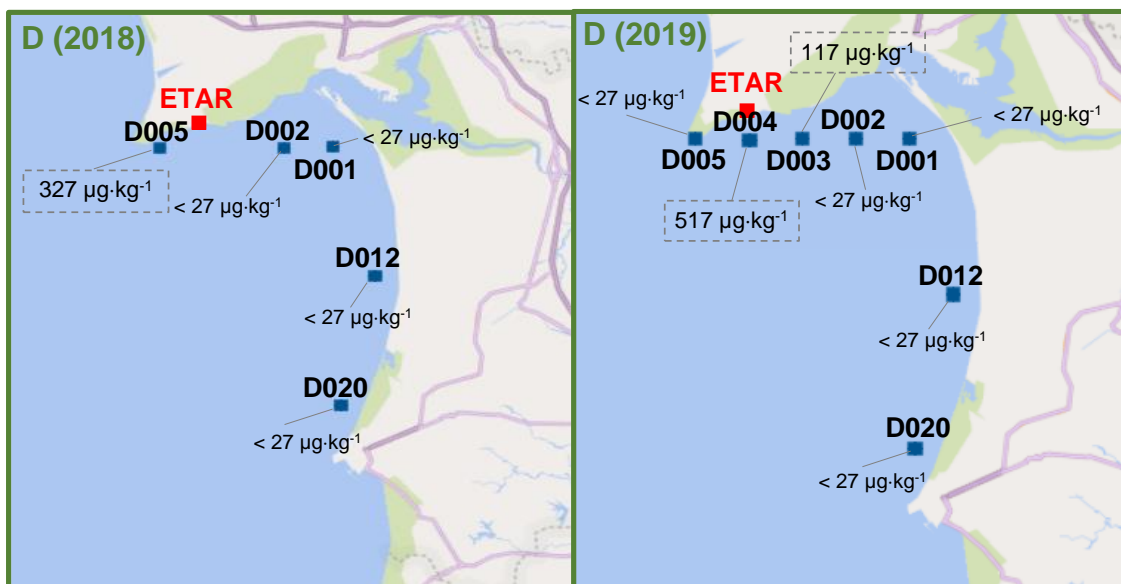


Figura 4.11 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogénico na área D.

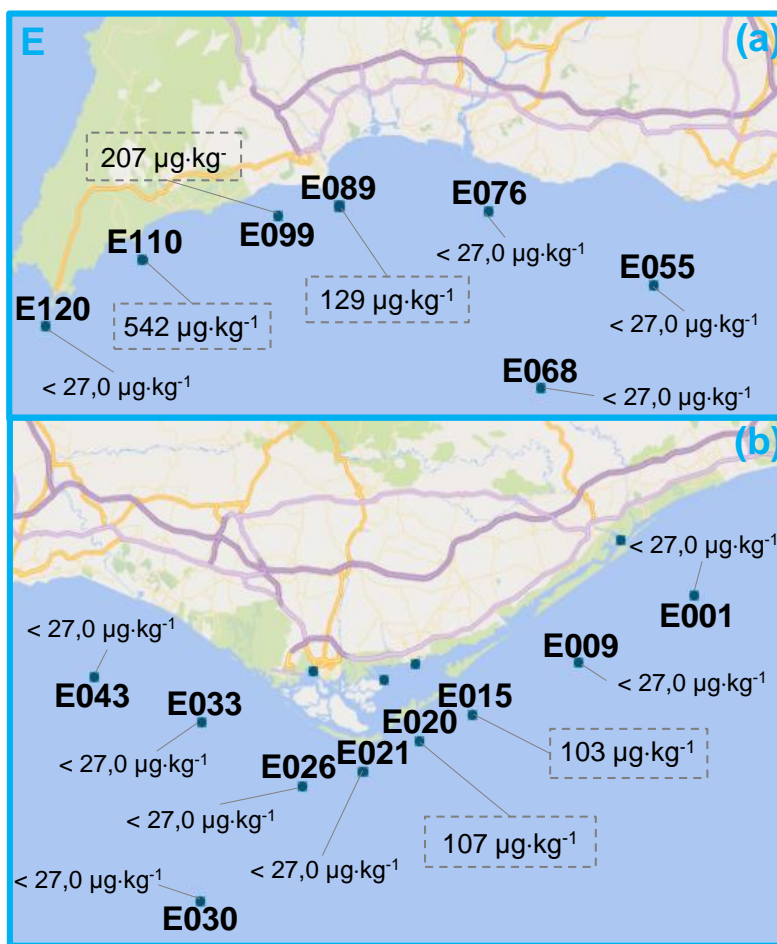


Figura 4.12 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogênico na área E.

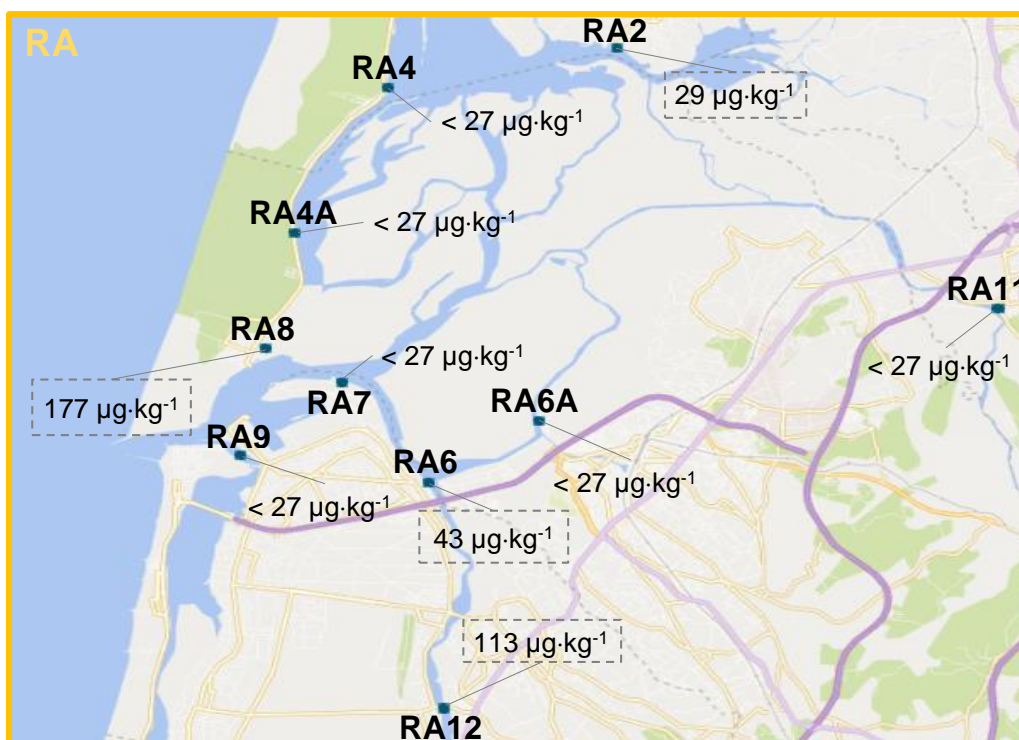


Figura 4.13 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogênico na área RA.

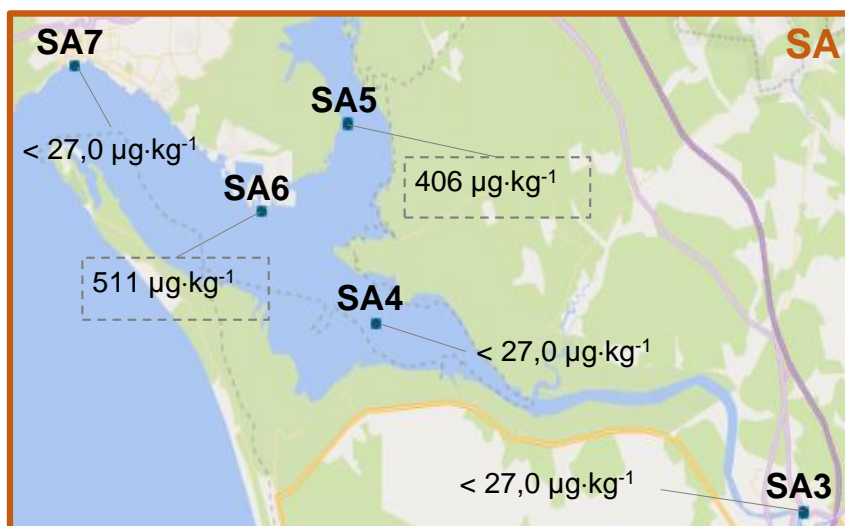


Figura 4.14 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogénico na área SA.

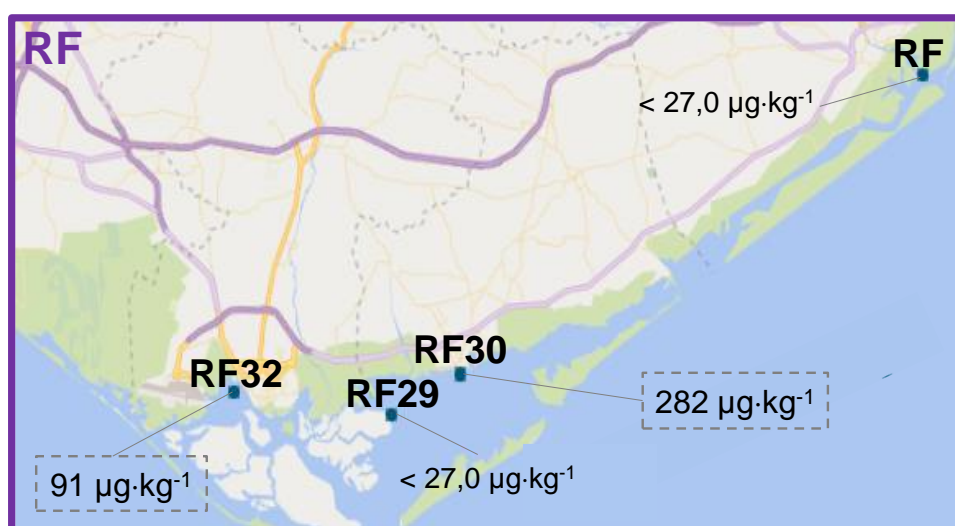


Figura 4.15 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogénico na área RF.

De acordo com as Figuras 4.11, 4.12 e 4.14 os valores mais elevados, à semelhança do que se verificou para o somatório dos 16 PAHs da US EPA, foram registados nas estações E110 ($542 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), D004 ($517 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) e SA6 ($511 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs).

Quando comparados os resultados obtidos para o ΣCPAHs para as estações da área E (Figura 4.12) com as do estuário do Sado (Figura 4.14) verificamos que, variaram entre < 27 e $542 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs para a área E (sendo a com o teor mais elevado a E110), sendo o intervalo registado para o estuário do Sado, entre < 27 e $511 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs (exceto os valores nulos) (sendo a com o teor mais elevado a SA6).

Analisando a Figura 4.13, referente à zona da ria de Aveiro, foi possível apurar que as estações RA8 e RA12, com 177 e $113 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (respetivamente), foram as estações com maior teor de PAHs carcinogénicos. Na zona de amostragem da ria Formosa (Figura 4.15), as estações RF30 e RF32, com 282 e $91 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (respetivamente), apresentam os valores mais elevados de PAHs carcinogénicos.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram estudadas as concentrações de PAHs nos sedimentos colhidos nas áreas oceânicas Sagres/Tavira (área E), Sines/Setúbal (área D), Peniche (área C), Figueira da Foz/Aveiro (área B), Porto/Viana do Castelo (área A), no estuário do Sado (SA), no rio Mira (MI) e nas rias de Aveiro (RA) e Formosa (RF).

Foi efetuada a avaliação da concentração de somatório de PAHs de acordo com a Portaria 1450/2007 12 de Novembro, assim como a avaliação do potencial carcinogénico e a origem dos PAHs através de diversos métodos.

De acordo com a portaria 1450/2007 de 12 de Novembro, verifica-se que as amostras E110 (com 1110 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), SA6 (com 1089 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), D004 de 2019 (com 971 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), SA5 (com 912 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), D005 de 2018 (com 672 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), RF30 (com 512 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), E099 (com 422 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) e RA8 (com 419 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) têm os valores mais elevados do somatório de PAHs estudados, apresentando concentrações que correspondem à classe 2 - “contaminação vestigiária”.

Foram utilizadas as classificações de acordo com a Portaria 1450/2007 para uma análise indicativa, face à inexistência de valores guia para sedimentos oceânicos e estuarinos. Verificou-se que as zonas com maior número de sedimentos avaliados como pertencendo à classe 2, ou seja, como “material dragado com contaminação vestigiária”, são os sedimentos recolhidos no estuário do Sado, na zona de Setúbal/Sines e no Algarve. Também foram encontradas estações assim classificadas nas rias de Aveiro e Formosa, mas em menor número. A totalidade dos sedimentos recolhidos na zona de Viana do Castelo/Porto, Aveiro/Figueira da Foz, Peniche e rio Mira pertencem à classe 1, sendo classificadas como “material dragado limpo”.

Com a utilização de diferentes abordagens efetuadas, verificou-se que as amostras de sedimento recolhidas no Algarve (nomeadamente na zona de Sagres) apresentaram valores dos diversos PAHs estudados semelhantes aos registados para as amostras do estuário do Sado, o que pode ser justificado pela semelhante pressão antropogénica, e neste caso talvez portuária, existente nessas regiões.

Relativamente aos PAHs com potencial carcinogénico os valores mais elevados foram registados nas estações E110 (542 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), D004 (517 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), SA6 (511 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), SA5 (406 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs), D005 de 2018 (326 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) e RF30 (282 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bs) localizadas no distrito de Setúbal e no Algarve. Estas estações são as que apresentam também os valores mais elevados do somatório dos PAHs.

Nas avaliações realizadas para apurar a origem dos PAHs verificou-se que a razão LMW/HMW (razão entre PAHs de menor peso molecular e de maior peso molecular), para todas as estações é inferior a 1 (maior quantidade de PAHs de 2 a 4 anéis do que de 4 a 6) o que indica que a origem destes hidrocarbonetos é pirogénica. Foi feito também um estudo para apurar a origem do PAH adicional, Per, em cada amostra, de modo a perceber se o PAH perileno nas amostras resultava realmente de processos de combustão lenta (origem pirogénica), ou não.

Por fim, e mais uma vez para confirmar a origem dos PAHs foram feitos gráficos com razões entre diversos PAHs (razões de diagnóstico), todas estas análises permitiram de facto confirmar que a principal fonte é pirogénica através de combustão de biomassa com ligeira contribuição de combustão de petróleo.

A análise dos 16 PAHs US EPA individuais permitiu verificar que o PAH com teores mais elevados foram o Fluoranteno (Fluo) e o Pireno (P). O composto com teores mais baixos foi o Acenaftileno (Acy), em que o teor de somatório de todas as amostras obtido foi nulo.

Em suma, em relação aos resultados dos sedimentos, as estações E110 e SA6 foram as que apresentaram valores mais elevados do somatório dos diversos PAHs estudados. Dada a localização deste ponto de amostragem (perto da zona de Sagres) e a sua proximidade a zonas de praia/protegidas, estes resultados parecem dever-se sobretudo ao intenso tráfego marítimo proveniente de ação humana que é habitual nessa zona.

Em relação ao estudo da viabilidade de locais para a prática de aquicultura, pode-se referir que quanto menor a quantia de substâncias prejudiciais e até mesmo cancerígenas que possa ser assimilada por organismos marinhos como os peixes e moluscos, melhor a qualidade da produção da atividade aquícola em questão. Através do presente estudo - a análise de PAHs pode-se referir que as áreas de Viana do Castelo/Porto, Aveiro/Figueira da Foz e Peniche, parecem ser as mais indicadas em termos de serem zonas sem contaminação nos compostos estudados.

O presente trabalho permite ainda ter um conjunto de dados de PAHs nas áreas de Sagres/Tavira, Sines/Setúbal, Peniche, Figueira da Foz/Aveiro, Porto/Viana do Castelo, no estuário do Sado, no rio Mira e nas rias de Aveiro e Formosa, que irão contribuir para a tomada de decisão relativamente a locais para a prática de aquicultura.

As análises efetuadas neste estudo podem servir como valores de referência para estudos posteriores. Futuramente, e com a realização de mais análises geofísicas, químicas, os resultados obtidos com o presente estudo, podem ajudar na avaliação de contaminação por PAHs. Por outro lado, a presença e/ou determinada concentração de um ou vários PAHs nos sedimentos poderá ainda alterar a solubilidade e a disponibilidade de outros compostos que podem ser prejudiciais para os animais marinhos. Este desafio de tentar racionalizar a relação entre contaminantes em peixe para consumo humano e o risco destes compostos para os seres vivos torna-se ainda mais significativo no estudo dos PAHs com elevado potencial cancerígeno como o BaP.

O presente estudo, permitiu então confirmar que os sedimentos marinhos realmente acumulam PAHs, sugerindo que as principais fontes possíveis nas regiões referidas neste trabalho poderão ser as atividades de pesca, turismo, embarcações locais, portos e descargas de águas residuais domésticas. Possibilitou a apresentação de um conjunto de informações sobre a distribuição e abundância dos PAHs na costa portuguesa, e ainda que todas as zonas A, B e C se encontram aptas para a prática de aquicultura (nesta vertente do estudo).

Assim, sugere-se novas investigações e estudos de modo a enriquecer o conhecimento da concentração de PAHs ao longo da costa portuguesa, nas águas e sedimentos e ainda pesquisas e trabalhos abrangendo as restantes matrizes, como biota. Estudo em biota permitiriam estudar o comportamento destes compostos, o que seria uma sugestão para futuros estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2015.03.011>
- Andersen, J., Murray, C., Reker, J., Green, N., & Harvey, E. T. (2019). *Contaminants in Europe's Seas*.
- Andrianova, A. A., & Quimby, B. D. (2019). Optimized GC/MS/MS Analysis for PAHs in Challenging Matrices. *Agilent Technologies*, 10.
- Attrill, M. J. (2002). A testable linear model for diversity trends in estuaries. *Journal of Animal Ecology*, 71(2), 262–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2002.00593.x>
- Azeredo, A., Toledo, M. C. de F., & Camargo, M. C. R. de. (2006). Determinação de benzo(a)pireno em pescados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1), 89–93. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100015>
- Baali, A., & Yahyaoui, A. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Influence to Some Aquatic Species. In *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86213>
- Bakhtiari, A. R., Zakaria, M. P., Yaziz, M. I., Lajis, M. N. H., Bi, X., & Rahim, M. C. A. (2009). Vertical distribution and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in anoxic sediment cores of Chini Lake, Malaysia: Perylene as indicator of land plant-derived hydrocarbons. *Applied Geochemistry*, 24(9), 1777–1787. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.05.008>
- Bauer, B., Gustafsson, B. G., Hyytiäinen, K., Meier, H. E. M., Müller-Karulis, B., Saraiva, S., & Tomczak, M. T. (2019). Food web and fisheries in the future Baltic Sea. *Ambio*, 48(11), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01229-3>
- Bienfang, P. K., Trapido-Rosenthal, H., & Laws, E. A. (2012). Bioaccumulation/Biomagnifications in Food Chains. In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology* (pp. 822–845). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0851-3_50
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., ... Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371). <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>
- Bua, R. O., Contino, A., & Giuffrida, A. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Mullus surmuletus* from the Catania Gulf (Sicily, Italy): distribution and potential health risks.

- Environmental Science and Pollution Research*, 28(7), 7756–7765.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11052-z>
- Bukowska, B., Mokra, K., & Michałowicz, J. (2022). Benzo[a]pyrene—Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6348. <https://doi.org/10.3390/ijms23116348>
- Camargo, M. C. R. de, & Toledo, M. C. F. (2002). Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22(1), 49–53. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000100009>
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Castro, A. F. R., Cabrita, L. J., Marques, A., Contreiras, A., Ferreira, A., Alfaiate, B., Cardiga, B., Rola, E., Lourenço, H., Fernandes, H., Móra, I. D., Andrade, I., Correia, J., Cunha, M., Ferreira, M. da L., Bernardes, M. do C., Soares, M. I. N., Martins, M. L., Gomes, M. N., ... Marques, R. (2000). *Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. <https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>
- Cheung, W. W. L., Reygondeau, G., & Frölicher, T. L. (2016). Large benefits to marine fisheries of meeting the 1.5°C global warming target. *Science*, 354(6319), 1591–1594. <https://doi.org/10.1126/science.aag2331>
- Commission, E., & Fisheries, D.-G. for M. A. and. (2021). *The EU fish market : 2020 edition*. Publications Office. <https://doi.org/doi/10.2771/664425>
- Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Depledge, M. H., Harvey, A. J., Brownlee, C., Frost, M., Moore, M. N., & Fleming, L. E. (2013). Changing Views of the Interconnections Between the Oceans and Human Health in Europe. *Microbial Ecology*, 65(4), 852–859. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0173-0>
- Depledge, M. H., White, M. P., Maycock, B., & Fleming, L. E. (2019). Time and tide. *BMJ*, l4671. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4671>
- Deutsch, L., Troell, M., & Limburg, K. (2013). Global trade of fisheries products: implications for marine ecosystems and their services. In *Ecosystem services and global trade of natural resources* (pp. 136–163).

- DGRM - Direção-Geral de Recursos Naturais, S. e S. M. (2014). *Plano estratégico para a aquicultura portuguesa 2014-2020*. https://www.dgrm.mm.gov.pt/documents/20143/43770/Plano_Estrat%C3%A9gico_Aquicultura_2014_2020.pdf
- Division of Toxicology, A., & Medicine, E. (2009). *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/>.
- Ekunwe, S., Hunter, R., & Hwang, H.-M. (2005). Ultraviolet Radiation Increases the Toxicity of Pyrene, 1-Aminopyrene and 1-Hydroxypyrene to Human Keratinocytes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1), 58–62. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010058>
- Fang, M.-D., Lee, C.-L., & Yu, C.-S. (2003). Distribution and source recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Hsin-ta Harbour and adjacent coastal areas, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin- Mar Pollut Bull*, 46(8), 941–953. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00099-7)
- FAO. (2017). *Water pollution from agriculture: a global review Executive summary LED BY*.
- Ferrara, L., Trifuoggi, M., Toscanesi, M., Donadio, C., Barra, D., Aiello, G., & Arienzo, M. (2020). Source identification and eco-risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of seawaters facing the former steel plant ILVA, Naples, Italy. *Regional Studies in Marine Science*, 35, 101097. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101097>
- Fleming, L., Depledge, M., McDonough, N., White, M., Pahl, S., Austen, M., Goksoyr, A., Solo-Gabriele, H., & Stegeman, J. (2015). The Oceans and Human Health. In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199389414.013.12>
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations. (n.d.). *AQUACULTURE DEVELOPMENT 4. Ecosystem approach to aquaculture*.
- Gadd, G. M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. In K. J. Rehm (Ed.), *Biotechnology Handbook* (Vol. 6b, pp. 401–433). VCH Verlagsgesellschaft. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291224431684480>
- Galarneau, E. (2008). Source specificity and atmospheric processing of airborne PAHs: Implications for source apportionment. *Atmospheric Environment*, 42(35), 8139–8149. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.07.025>
- Glibert, P. M. (2019). Phytoplankton in the aqueous ecological theater: Changing conditions, biodiversity, and evolving ecological concepts. *Journal of Marine Research*, 77(2), 83–137. <https://doi.org/10.1357/002224019828474304>

- Godard-Codding, C. A. J., Clark, R., Fossi, M. C., Marsili, L., Maltese, S., West, A. G., Valenzuela, L., Rowntree, V., Polyak, I., Cannon, J. C., Pinkerton, K., Rubio-Cisneros, N., Mesnick, S. L., Cox, S. B., Kerr, I., Payne, R., & Stegeman, J. J. (2011). Pacific Ocean–Wide Profile of CYP1A1 Expression, Stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios, and Organic Contaminant Burden in Sperm Whale Skin Biopsies. *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 337–343. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901809>
- Gonçalves, C., Teixeira, C., Basto, M. C. P., & Almeida, C. M. R. (2016). PAHs levels in Portuguese estuaries and lagoons: Salt marsh plants as potential agents for the containment of PAHs contamination in sediments. *Regional Studies in Marine Science*, 7, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.05.004>
- Gouveia, V., Almeida, C. M. R., Almeida, T., Teixeira, C., & Mucha, A. P. (2018). Indigenous microbial communities along the NW Portuguese Coast: Potential for hydrocarbons degradation and relation with sediment contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.063>
- Hąc-Wydro, K., Poleć, K., & Broniatowski, M. (2019). The impact of selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the morphology, stability and relaxation of ternary lipid monolayers imitating soil bacteria membrane. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.020>
- Han, Y. M., Bandowe, B. A. M., Wei, C., Cao, J. J., Wilcke, W., Wang, G. H., Ni, H. Y., Jin, Z. D., An, Z. S., & Yan, B. Z. (2015). Stronger association of polycyclic aromatic hydrocarbons with soot than with char in soils and sediments. *Chemosphere*, 119, 1335–1345. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.021>
- Harris, D. C. (2007). Quantitative Chemical Analysis 7E Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*, 53–77. https://www.academia.edu/32945832/Quantitative_Chemical_Analysis_7E_Daniel_C_Harris
- Harrison, A. P., & Raabe, V. E. (1967). Factors Influencing the Photodynamic Action of Benzo[a] pyrene on Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 93(2), 618–626. <https://doi.org/10.1128/jb.93.2.618-626.1967>
- Health, The Global Ocean and Marine Resources*. (2019).
- Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1363. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>
- Hönisch, B., Ridgwell, A., Schmidt, D. N., Thomas, E., Gibbs, S. J., Sluijs, A., Zeebe, R., Kump, L., Martindale, R. C., Greene, S. E., Kiessling, W., Ries, J., Zachos, J. C.,

- Royer, D. L., Barker, S., Marchitto, T. M., Moyer, R., Pelejero, C., Ziveri, P., ... Williams, B. (2012). The Geological Record of Ocean Acidification. *Science*, 335(6072), 1058–1063. <https://doi.org/10.1126/science.1208277>
- Instituto Nacional de Estatística. (2020). *Estatísticas da Pesca - 2020*. Estatísticas Da Pesca. <https://www.ine.pt/xurl/pub/280980980>
- International Agency for Research on Cancer. (2010). *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2019, October). Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate.
- Jesus, F., Pereira, J. L., Campos, I., Santos, M., Ré, A., Keizer, J., Nogueira, A., Gonçalves, F. J. M., Abrantes, N., & Serpa, D. (2022). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in freshwater ecosystems and their toxicity to benthic fauna. *Science of The Total Environment*, 820, 153282. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153282>
- Katsoyiannis, A., Sweetman, A. J., & Jones, K. C. (2011). PAH Molecular Diagnostic Ratios Applied to Atmospheric Sources: A Critical Evaluation Using Two Decades of Source Inventory and Air Concentration Data from the UK. *Environmental Science & Technology*, 45(20), 8897–8906. <https://doi.org/10.1021/es202277u>
- Keeling, R. F., Körtzinger, A., & Gruber, N. (2010). Ocean Deoxygenation in a Warming World. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 199–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163855>
- Kim, G., Maruya, K., Lee, R., Lee, J.-H., Koh, C.-H., & Tanabe, S. (1999). Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Kyeonggi Bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 38(1), 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00077-0)
- Kou, D., & Mitra, S. (2003). Extraction of Semivolatile Organic Compounds from Solid Matrices. In *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (pp. 139–182). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471457817.ch3>
- Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), Baldé, A. B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J. I., Breyse, P. N., Chiles, T., Mahidol, C., Coll-Seck, A. M., Cropper, M. L., Fobil, J., Fuster, V., Greenstone, M., Haines, A.,

- ... Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391(10119), 462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- López Abbate, M. C., Molinero, J. C., Guinder, V. A., Dutto, M. S., Barría de Cao, M. S., Ruiz Etcheverry, L. A., Pettigrosso, R. E., Carcedo, M. C., & Hoffmeyer, M. S. (2015). Microplankton dynamics under heavy anthropogenic pressure. The case of the Bahía Blanca Estuary, southwestern Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 95(1), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.026>
- Lubecki, L., & Kowalewska, G. (2010). Distribution and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in recent sediments from the gulf of gdańsk (SE Baltic). *Oceanologia*, 52(4), 669–703. <https://doi.org/10.5697/OC.52-4.669>
- Ma, Y., Halsall, C. J., Crosse, J. D., Graf, C., Cai, M., He, J., Gao, G., & Jones, K. (2015). Persistent organic pollutants in ocean sediments from the North Pacific to the Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(4), 2723–2735. <https://doi.org/10.1002/2014JC010651>
- Macdonald, R. W., Harner, T., & Fyfe, J. (2005). Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Science of the Total Environment*, 342(1–3), 5–86. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2004.12.059>
- Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110(3), 375–391. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00162-7)
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (Eds.). (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (p. 70). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Mai, B.-X., Fu, J.-M., Sheng, G.-Y., Kang, Y.-H., Lin, Z., Zhang, G., Min, Y.-S., & Zeng, E. Y. (2002). Chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine and estuarine sediments from Pearl River Delta, China. *Environmental Pollution*, 117(3), 457–474. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00193-2)
- Mathis, J. T., Cooley, S. R., Lucey, N., Colt, S., Ekstrom, J., Hurst, T., Hauri, C., Evans, W., Cross, J. N., & Feely, R. A. (2015). Ocean acidification risk assessment for Alaska's fishery sector. *Progress in Oceanography*, 136, 71–91. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.07.001>

- Meador, J. P., Stein, J. E., Reichert, W. L., & Varanasi, U. (1995). *Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Marine Organisms* (pp. 79–165). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2542-3_4
- Medeiros, P. M., Bicego, M. C., Castelao, R. M., del Rosso, C., Fillmann, G., & Zamboni, A. J. (2005). Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environment International*, 31(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.07.001>
- Mestre, P. M. G. (2008). *Elaboração de um projecto de uma unidade de piscicultura* [Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária., Universidade Técnica de Lisboa]. <http://hdl.handle.net/10400.5/954>
- Montagner, C. C., Vidal, C., Vizioli, B. D. C., & Gomes, L. E. T. (2021). Aspectos analíticos para a determinação de contaminantes ambientais no contexto da ecotoxicologia. In *RECURSO ÁGUA - Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos* (pp. 381–414). Editora Cubo. <https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-12>
- Montuori, P., de Rosa, E., di Duca, F., de Simone, B., Scippa, S., Russo, I., Sarnacchiaro, P., & Triassi, M. (2022). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Dissolved Phase, Particulate Matter, and Sediment of the Sele River, Southern Italy: A Focus on Distribution, Risk Assessment, and Sources. *Toxics*, 10(7), 401. <https://doi.org/10.3390/toxics10070401>
- OCDE. (2022). *Aquaculture production | Fisheries | OECD iLibrary*. https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/aquaculture-production/indicator/english_d00923d8-en
- Oil in the Sea III*. (2003). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10388>
- Oliveira, M., de Gasperi Portella, C., Ramalhosa, M. J., Delerue-Matos, C., Sant'Ana, L. S., & Morais, S. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and farmed whitemouth croaker and meagre from different Atlantic Ocean fishing areas: Concentrations and human health risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111–797. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111797>
- Pauly, D., & Zeller, D. (2016). Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature Communications*, 7(1), 10244. <https://doi.org/10.1038/ncomms10244>
- Pazi, I., Tolga Gonul, L., & Kucuksezgin, F. (2021). Sources and Characterization of Polycyclic Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons in Sediments Collected near Aquaculture Sites from Eastern Aegean Coast. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 41(5), 1042–1056. <https://doi.org/10.1080/10406638.2019.1645708>

- Pérez-Fernández, B., Viñas, L., Franco, M. Á., & Bargiela, J. (2015). PAHs in the Ría de Arousa (NW Spain): A consideration of PAHs sources and abundance. *Marine Pollution Bulletin*, *95*(1), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.028>
- Perugini, M., Visciano, P., Giammarino, A., Manera, M., di Nardo, W., & Amorena, M. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere*, *66*(10), 1904–1910. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.079>
- Priority Pollutant List*. (2014).
- Qiao, F., Yang, Y., Lü, X., Xia, C., Chen, X., Wang, B., & Yuan, Y. (2006). Coastal upwelling in the East China Sea in winter. *Journal of Geophysical Research*, *111*(C11), C11S06. <https://doi.org/10.1029/2005JC003264>
- Qin, N., He, W., Liu, W., Kong, X., Xu, F., & Giesy, J. P. (2020). Tissue distribution, bioaccumulation, and carcinogenic risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms from Lake Chaohu, China. *Science of The Total Environment*, *749*, 141–577. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141577>
- Quigg, A., Parsons, M., Bargu, S., Ozhan, K., Daly, K. L., Chakraborty, S., Kamalanathan, M., Erdner, D., Cosgrove, S., & Buskey, E. J. (2021). Marine phytoplankton responses to oil and dispersant exposures: Knowledge gained since the Deepwater Horizon oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, *164*, 112074. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112074>
- Review Meeting of MED POL-Phase III Monitoring Activities Palermo (Sicily), Italy 12-15 December, 2005 Methods for sediment sampling and analysis UNEP/MAP. (2006, December 12). *United Nations Environment Programme - Mediterranean Action Plan*.
- Rocha, A. C., & Palma, C. (2019). Source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil sediments: Application of different methods. *Science of The Total Environment*, *652*, 1077–1089. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.014>
- Rocha, C. P., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. M. (2022). A Global Overview of Aquaculture Food Production with a Focus on the Activity's Development in Transitional Systems—The Case Study of a South European Country (Portugal). *Journal of Marine Science and Engineering*, *10*(3), 417. <https://doi.org/10.3390/jmse10030417>
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F. S., Lambin, E. F., Lenton, T. M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H. J., Nykvist, B., de Wit, C. A., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P. K., Costanza, R., Svedin, U., ... Foley, J. A. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, *461*(7263), 472–475. <https://doi.org/10.1038/461472a>

- Sampaio, G. R., Guizzellini, G. M., da Silva, S. A., de Almeida, A. P., Pinaffi-Langley, A. C. C., Rogero, M. M., de Camargo, A. C., & Torres, E. A. F. S. (2021). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Biological Effects, Legislation, Occurrence, Analytical Methods, and Strategies to Reduce Their Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6010. <https://doi.org/10.3390/ijms22116010>
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Pereira, C., Cravo, A., Fonseca, V. F., França, S., Bebianno, M. J., & Cabral, H. N. (2013). Evaluation of sediment toxicity in different Portuguese estuaries: Ecological impact of metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.04.018>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). Fundamentals of analytical chemistry / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch. In *Analytical chemistry* (Ninth edition.). Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Stogiannidis, E., & Laane, R. (2015). Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (Vol. 234, pp. 49–133). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10638-0_2
- Tala, W., & Chantara, S. (2019). Use of spent coffee ground biochar as ambient PAHs sorbent and novel extraction method for GC-MS analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13), 13025–13040. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04473-y>
- Temerdashev, Z. A., Musorina, T. N., & Chervonnaya, T. A. (2020). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil and Bottom Sediments by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(8), 1000–1010. <https://doi.org/10.1134/S1061934820080158>
- The Sustainable Development Goals report.* (2018).
- Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution*, 162, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.025>
- Tuvikene, A. (1995). RESPONSES OF FISH TO POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHS). *Annales Zoologici Fennici*, 32, 295–309.
- Ukalska-Jaruga, A., & Smreczak, B. (2020). The Impact of Organic Matter on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Availability and Persistence in Soils. *Molecules*, 25(11), 2470. <https://doi.org/10.3390/molecules25112470>

- Vasconcelos, R. P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Maia, A., Ruano, M., França, S., Vinagre, C., Costa, M. J., & Cabral, H. (2007a). Assessing anthropogenic pressures on estuarine fish nurseries along the Portuguese coast: A multi-metric index and conceptual approach. *Science of The Total Environment*, 374(2–3), 199–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.048>
- Vasconcelos, R. P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Maia, A., Ruano, M., França, S., Vinagre, C., Costa, M. J., & Cabral, H. (2007b). Assessing anthropogenic pressures on estuarine fish nurseries along the Portuguese coast: A multi-metric index and conceptual approach. *Science of The Total Environment*, 374(2–3), 199–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.048>
- Viñas, L., Franco, M. A., & González, J. J. (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Composition of Sediments in the Ría de Vigo (NW Spain). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(1), 42–49. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9230-6>
- Vlachodimitropoulos, D. (2008). *European Union Risk Assessment Report ANTHRACENE RISK ASSESSMENT*. <http://europa.eu.int>
- Wan, Y., Jin, X., Hu, J., & Jin, F. (2007). Trophic Dilution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in a Marine Food Web from Bohai Bay, North China. *Environmental Science & Technology*, 41(9), 3109–3114. <https://doi.org/10.1021/es062594x>
- Warner, K., Hamza, M., Oliver-Smith, A., Renaud, F., & Julca, A. (2010). Climate change, environmental degradation and migration. *Natural Hazards*, 55(3), 689–715. <https://doi.org/10.1007/s11069-009-9419-7>
- Wei, C. K., & Chee, L. M. (2017). Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Using Programmable Temperature Vaporization Inlet Couple with Gas Chromatography Mass Spectrometry (PTV-GC-MS). *Eurasian J. Anal. Chem*, 12(6), 923–938. <https://doi.org/10.12973/EJAC.2017.00222A>
- Whitmee, S., Haines, A., Beyrer, C., Boltz, F., Capon, A. G., de Souza Dias, B. F., Ezeh, A., Frumkin, H., Gong, P., Head, P., Horton, R., Mace, G. M., Marten, R., Myers, S. S., Nishtar, S., Osofsky, S. A., Pattanayak, S. K., Pongsiri, M. J., Romanelli, C., ... Yach, D. (2015). Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation–Lancet Commission on planetary health. *The Lancet*, 386(10007), 1973–2028. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60901-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60901-1)
- Wijsman, J. W. M., Troost, K., Fang, J., & Roncarati, A. (2019). Global Production of Marine Bivalves. Trends and Challenges. In *Goods and Services of Marine Bivalves* (pp. 7–26). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2

- World Health Organization. Water, S. and H. T. (2004). *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 1, *Recommendations*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42852>
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., & Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33(4), 489–515. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)
- Zhang, X. L., Tao, S., Liu, W. X., Yang, Y., Zuo, Q., & Liu, S. Z. (2005). Source Diagnostics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Based on Species Ratios: A Multimedia Approach. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9109–9114. <https://doi.org/10.1021/es0513741>

ANEXOS

ANEXO A - COORDENADAS DAS ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM

As áreas cobertas para recolha de amostras de sedimentos superficial oceânico, ou seja, as amostras analisadas segundo metodologia descrita no presente trabalho são:

Tabela A.1 - Nomenclatura e coordenadas geográficas das amostras oceânicas analisadas.

Região	Estação	Longitude	Latitude	ID da amostra	Ano de recolha
Viana do Castelo/Porto	A038	-8.77268590	41.19569167	201800951	2018
	A052	-8.75711057	41.11031134	201800959	2018
Aveiro e a Figueira da Foz	B016	-8.85081485	40.64322322	201900325	2019
				202001127	2020
	B067	-8.96557645	40.12240385	201900296	2019
	B027	-9.13124997	40.55469108	201900306	2019
				202001136	2020
	B001	-8.79963313	40.81897913	201900310	2019
				202001115	2020
	B011	-9.18014070	40.73068838	201900316	2019
				202001122	2020
	B031	-8.87784307	40.46504765	201900332	2019
				202001140	2020
	B050	-9.03256457	40.28788811	201900341	2019
202001155				2020	
B049	-8.94045103	40.28945658	201900342	2019	
			202001154	2020	
Peniche	C001	-9.42617000	39.32466667	201901710	2019
	C013	-9.38788333	39.23299722	201901711	2019
				201900349	2019
C014	-9.41716944	39.14399722	201900354	2019	
Setúbal/ Sines	D001	-8.88651527	38.40491408	201800913	2018
				201901701	2019
	D012	-8.81682465	38.21870907	201800921	2018
				201901698	2019
	D020	-8.87291402	38.03345242	201800925	2018
				201901691	2019
	D002	-8.96435833	38.40505556	201800914	2018
				201901702	2019
D003	-9.04592222	38.40474444	201901703	2019	
D005	-9.20648333	38.40485833	201800928	2018	
			201901704	2019	
Sagres/ Tavira	E026	-7.95541598	36.92800481	201800790	2018
	E015	-7.78117175	36.98329144	201800793	2018
	E001	-7.55482240	37.07396323	201800797	2018
	E120	-8.95016671	36.97949997	201800828	2018
	E089	-8.65133330	37.06850000	201800834	2018
	E030	-8.06000000	36.84000000	201800896	2018
	E043	-8.16959709	37.01159831	201800901	2018
	E068	-8.44740611	36.93378656	201800908	2018
	E076	-8.50040697	37.06376792	201800781	2018
	E055	-8.33394939	37.00950096	201800784	2018
	E033	-8.05955115	36.97769913	201800788	2018
	E021	-7.89386401	36.93974638	201800791	2018
	E020	-7.83550015	36.96233254	201800792	2018
	E009	-7.67301010	37.02314763	201800795	2018
	E110	-8.85166666	37.02799997	201800830	2018
E099	-8.71400005	37.06033331	201800833	2018	

Foi também realizado um tratamento de dados às seguintes amostras, previamente analisadas, de sedimento de áreas estuarinas:

Tabela A.2 - Nomenclatura e limites das coordenadas geográficas das amostras estuarinas.

Região	Estação	Longitude	Latitude	ID da amostra	Ano de Recolha
Ria Formosa	RF30	-7.84080556	37.02213889	201900174	2019
	RF29	-7.87227778	37.00922222	201900175	2019
	RF32	-7.94427778	37.01652778	201900179	2019
	RF9	-7.62930556	37.11669444	201900180	2019
Rio Mira	MI03	-8.75080000	37.71400000	201900187	2019
	MI05	-8.73260000	37.68569444	201900189	2019
Estuário do Sado	SA4	-8.73336111	38.43327778	201901422	2019
	SA6	-8.79388889	38.47086111	201901424	2019
	SA3	-8.50716667	38.37005556	201800498	2018
	SA5	-8.74827778	38.50002778	201800500	2018
	SA7	-8.89250000	38.51933333	201800501	2018
Ria de Aveiro	RA6	-8.68938889	40.63622222	201900125	2019
	RA8	-8.72616667	40.66463889	201900128	2019
	RA7	-8.70869444	40.65747222	201900127	2019
	RA2	-8.64663889	40.72827778	201900122	2019
	RA4A	-8.71955556	40.68905556	201900124	2019
	RA12	-8.68569444	40.58822222	201900132	2019
	RA4	-8.69833333	40.71980556	201900123	2019
	RA6A	-8.66430556	40.64933333	201900126	2019
	RA9	-8.73175000	40.64197222	201900129	2019
	RA11	-8.56055556	40.67319444	201900131	2019

ANEXO B - MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NA DETERMINAÇÃO DE PAHs

Este método baseia-se na identificação e quantificação dos PAHs por Cromatografia Gasosa em coluna capilar, acoplada a Detetor de Espectrometria de Massa, após extração dos compostos de interesse da amostra de sedimento, utilizando uma mistura de solventes orgânicos, e posterior purificação do extrato. Esta é uma das técnicas utilizadas para a determinação de PAH em amostras de sedimentos tendo em consideração a baixa concentração destes compostos nessas amostras e a complexidade das matrizes onde estão presentes (Temerdashev et al., 2020).

É também de grande importância a escolha adequada da técnica de extração de PAHs na matriz sedimento. De seguida irá ser referida a preparação que amostras de sedimentos marinhos são sujeitas, a técnica de extração de PAHs e as técnicas de análise utilizadas no presente estudo.

B.1 Preparação das amostras de sedimento

As amostras devem de ser sujeitas a um pré-tratamento de modo que as amostras fiquem na forma mais apropriada para os seguintes passos e que sejam conservadas as propriedades e características dos sedimentos. Este pré-tratamento envolve então a peneiração, liofilização e moagem dessas amostras de sedimento. Para que os resultados sejam reportados em base seca procede-se à determinação do peso seco das amostras após liofilização das mesmas.

B.2 Técnica de extração

Previamente à análise instrumental, os PAHs são extraídos da amostra por aplicação da técnica de Extração Acelerada por Solvente (ASE). Esta técnica de extração baseia-se na utilização de um solvente ou de uma combinação de dois ou mais solventes que, em condições de elevada pressão e temperatura, para que haja maior eficiência no processo de extração. Esta técnica tem vindo a substituir técnicas de extração convencionais, por ser uma técnica automatizada e que permite uma rápida extração (Kou e Mitra, 2003).

Face às características hidrofóbicas dos PAHs e, conseqüentemente, à sua baixa solubilidade na água, a sua extração é efetuada empregando solventes orgânicos apolares (Tala e Chantara, 2019).

A reduzida seletividade desta técnica faz com que muitos outros componentes químicos indesejados sejam extraídos podendo estes interferir mais tarde na quantificação tornando-se, deste modo, necessária uma purificação dos extratos obtidos.

B.3 Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas permitem preparar analitos bem como interferentes que existam nas amostras, sendo técnicas largamente utilizadas e designadas de acordo com o tipo de fase móvel e fase estacionária que utilizam.

A cromatografia de adsorção em coluna de Sílica Gel e Alumina para a remoção de componentes lipídicos e pigmentos e a dessulfurização com cobre ativado são os procedimentos habituais para melhorar o processo de identificação e de quantificação, principalmente quando são empregues métodos cromatográficos na determinação de níveis vestigiais de contaminantes.

B.4 Cromatografia em fase gasosa

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica capaz de preparar os diferentes componentes químicos de uma mistura que se encontra no estado gasoso. O extrato orgânico a analisar é injetado no injetor do cromatógrafo sendo, por ação do gás de arrasto, forçado a entrar na coluna cromatográfica que se encontra no interior de um forno cujas temperaturas são programáveis.

A preparação dos diversos componentes da mistura é conseguida em função de um programa de temperaturas pré-definido a que o forno fica sujeito e através da afinidade que cada componente tem com um filme que se encontra a revestir internamente a coluna cromatográfica instalada no interior do forno. Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são o sistema de injeção, um forno onde se encontra a coluna cromatográfica, o detetor e o sistema de aquisição de dados (Montagner et al., 2021) (Coskun, 2016).

O gás de arraste é a fase móvel utilizada nesta técnica, devendo ser puro e inerte. Podem ser utilizados vários gases, contudo o mais utilizado é o hélio, uma vez que permite melhor resolução de picos face ao azoto (Harris, 2007).

B.5 Espectrometria de massa

Nesta técnica as espécies gasosas desadsorvidas das fases condensadas são ionizadas, sendo os iões acelerados através de um campo elétrico e preparados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). O espectrómetro de massa é constituído por um sistema de introdução da amostra, uma fonte iónica, um analisador de massa, um detetor e um sistema de aquisição de dados.

Dois modos de análise distintos podem ser utilizados nesta técnica, o modo de varrimento contínuo (full-scan) e o modo monitorização de iões selecionados (SIM). Muitas vezes o modo selecionado em análises é o modo SIM, uma vez que permite preparar compostos de estruturas similares e minimizar efeitos de matriz, no entanto o modo de varrimento contínuo é também utilizado, especialmente se se pretender ter um espectro de massa completo (Temerdashev et al., 2020).

B.6 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

Existem várias técnicas hífenadas, sendo a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) uma das mais utilizadas. Como os PAH presentes nos sedimentos estão quase sempre em quantidades vestigiais, a GC-MS é muito utilizada, pois permite a detecção e identificação dos analitos, obtidos no GC, e das razões m/z , obtidas no MS, bem como análises mais rápidas e com menor quantidade de amostra.

ANEXO C - CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE

O controlo da qualidade é essencial para salvaguardar a qualidade dos ensaios realizados em laboratório, devendo ser realizados controlo de brancos, amostras fortificadas, amostras replicadas, linearidade e veracidade da medição.

Controlo de brancos

O controlo de qualidade de brancos é efetuado com o intuito de apurar se existem ou não contaminações no lote de amostras a analisar. Este controlo é feito através da análise de um branco de procedimento (BP), em que não existe nenhum dos analitos. A análise do branco deve ser realizada em cada conjunto de amostras analisado, sendo o controlo realizado consoante o LD definido para cada analito (Kruve et al., 2015).

Controlo de amostras replicadas

Através da determinação do limite de repetibilidade é possível estabelecer critérios para controlo de amostras replicadas. O critério de aceitação (CA) é calculado para cada analito utilizando o desvio padrão de repetibilidade (C. Augusto et al., 2000)

Na ocorrência de a diferença das amostras replicadas estar contida no CA, então as amostras são aceites, caso contrário a análise deve ser repetida.

Controlo de amostras fortificadas

O controlo de amostras fortificadas é feito a partir de um intervalo utilizando o quociente entre o desvio padrão da recuperação média, a recuperação de diversas amostras fortificadas e a raiz quadrada de n.

Controlo da linearidade

O controlo da linearidade é assegurado, através da avaliação do coeficiente de determinação (r^2) obtido da construção das curvas de calibração dos padrões analisados em cada lote de amostras. A linearidade é cumprida se o $r^2 \geq 0,99$ (Skoog et al., 2014).

Controlo da veracidade da medição

O controlo da veracidade da medição deve ser feito com a análise de padrões de controlo (PC) a meio da gama de trabalho e com teores iguais aos do LQ (Kruve et al., 2015). O CA deve ser ajustado para ambos, com os resultados da análise dos respetivos PC sendo os CA calculados com o desvio padrão da análise dos diferentes PC e o valor de *t-student*.



2022

Raquel Gaspar

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS ATRAVÉS DE GC-MSD
EM SEDIMENTOS ESTUARINOS E OCEÂNICOS