



**HAL**  
open science

# Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos através da análise de sedimentos

Carla Pereira de Morais

► **To cite this version:**

Carla Pereira de Morais. Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos através da análise de sedimentos. Chemical Sciences. Université de Toulon; Universidade de São Paulo (Brésil), 2021. Portuguese. NNT : 2021TOUL0004 . tel-04637062

**HAL Id: tel-04637062**

**<https://theses.hal.science/tel-04637062>**

Submitted on 5 Jul 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



CARLA PEREIRA DE MORAIS

**Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas  
aquáticos através da análise de sedimentos**

São Carlos / La Garde

2021

CARLA PEREIRA DE MORAIS

**Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas  
aquáticos através da análise de sedimentos**

Trabalho apresentado para obtenção do título (dupla  
titulação), no âmbito do Convênio Acadêmico  
Internacional para Coorientação de Tese de Doutorado  
celebrado pelo Instituto de Química de São Carlos,  
Universidade de São Paulo, Brasil e a Université de  
Toulon, França.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador no Brasil: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Orientador na França: Dr. Stéphane Mounier

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos / La Garde

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Assinatura:**

**Data:**

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Morais, Carla Pereira de

Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos através da análise de sedimentos / Carla Pereira de Moraes. — São Carlos, 2021.

166 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Coorientadora: Profa. Dra. Stéphane Mounier

1. Espectroscopia óptica. 2. Sedimento fluvial. 3. Matéria orgânica. 4. Eutrofização. 5. Contaminação. I. Título.



*À minha mãe e ao meu pai (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Divino Pai Eterno...

...por ter chegado até aqui e ter conhecido pessoas tão maravilhosa, que fazem a vida ser mais leve e os dias mais felizes. Obrigada pelos anjos que o Senhor colocou em minha vida.

Agradeço a minha mãe...

...por todas as orações, conversas, amor e carinho. Ser mãe não é uma tarefa fácil, mas a senhora sempre tenta ser a melhor e nunca mede esforços por mim. Te amo!

Agradeço ao meu pai (*in memoriam*)...

...pelo amor incondicional. Sempre que fecho meus olhos me lembro de você sorrindo. Te amo!

Agradeço ao Rodrigo (PC)...

...por sempre estar ao meu lado me incentivando e ajudando em tudo. Você é meu grande orgulho como pessoa. Te amo!

Agradeço a minha família, em especial a minha irmã Sarah, sobrinha Maria Clara e padrasto Claudinei...

... por me ensinarem todos os dias o verdadeiro significado da palavra família. Amo vocês!

Agradeço as minhas amigas da faculdade para a vida, a Jéssica, Lívia e Mariana...

...por me ajudarem em todos os momentos, pelas conversas, conselhos e amizade. Obrigada por mesmo estando longe cuidarem tão bem de mim. Amo vocês!

Agradeço ao meus orientadores...

...por todo ensinamento. Eu sou realmente feliz e agradecida por ter vocês dois como orientadores, duas pessoas incríveis. Débora, muito obrigada por ser esta pessoa tão generosa e uma excelente profissional, você é inspiração. Stéphane, muito obrigada por não medir esforços para me ajudar, você é exemplo de ser humano, principalmente por tratar todo mundo igual, ser mais como você é minha meta de vida.

Agradeço a todos os membro do grupo de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação e a todos os funcionários da Embrapa Instrumentação. Em especial, agradeço...

...a Amanda e Anielle pela amizade e ajuda durante todo esse tempo. Só desejo que nossa amizade seja eterna. Amo vocês!

...ao Lucas por toda colaboração nos trabalhos, discussões e amizade. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar.

...ao Diego, Gustavo, Kleydson, Ladislau, Milene e Vinícius por toda colaboração nos trabalhos, conversas, ensinamentos e amizade.

Agradeço aos amigos que fiz durante este tempo...

...em especial ao Alex, Alfredo (Gutto), Claire, Graziene, João Vitor, Bruno Ricardo, Lili, Rodrigo (Gaúcho) e Vitor.

Agradeço à Embrapa Instrumentação...

...pela excelente infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Química de São Carlos...

...pelo suporte financeiro e intelectual. Em especial quero agradecer a Andreia, Danielle e Gislei por sempre estarem dispostas a me ajudar em toda parte burocrática.

Agradeço a Université de Toulon...

...pela infraestrutura e oportunidade única para desenvolver parte deste trabalho. Em especial agradeço a Amonda por ter me recebido tão bem na França e ter me ajudado em tudo que precisei.

Agradeço ao Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) da Universidade de São Paulo, em especial agradeço ao professor Frederico, Mariana Abibi e Miro...

...por me ajudarem a coletar as amostras usadas neste trabalho.

Agradeço a Sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS)...

...pelos prêmios Training Awards 2019 e Support Awards 2020.

Agradeço a Capes...

...pela bolsa concedida (88882.331025/2019-01).

Agradeço ao CNPq e a Fapesp (2013/07276-1)...

...por financiar parte desta pesquisa.

*“Eu sou aquela mulher  
a quem o tempo muito ensinou.  
Ensinou a amar a vida  
e não desistir da luta,  
recomeçar na derrota,  
renunciar a palavras  
e pensamentos negativos.  
Acreditar nos valores humanos  
e ser otimista.”*

**Cora Coralina**



## RESUMO

MORAIS, C. P. **Métodos fotônicos inovadores para avaliação da contaminação de ecossistemas aquático através da análise de sedimentos**. 2021. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil e Université de Toulon, La Garde, França, 2021.

Os contaminantes presentes nas águas podem ser adsorvidos por materiais em suspensão e acumulados em sedimentos. O monitoramento de elementos potencialmente tóxicos (PTEs) e do fósforo (P) em sedimentos permite avaliar respectivamente o nível de contaminação e o grau de eutrofização de rios. As técnicas comumente utilizadas para a determinação elementar em sedimentos exigem o preparo das amostras gerando quantidades consideráveis de resíduos químicos e gasto de tempo. A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) é uma alternativa para contornar as desvantagens associadas ao preparo da amostra, entre outros. A baixa sensibilidade da LIBS com pulso único (SP) pode ser aumentada empregando a LIBS com pulso duplo (DP). Considerando a complexidade química dos sedimentos, a matéria orgânica (MO) é um dos parâmetros que deve ser avaliado. A fluorescência no modo matriz excitação-emissão (EEM) combinada com a análise de fatores paralelos (PARAFAC) pode ser empregada para acessar informações sobre a composição e origem da MO extraída. Enquanto a supressão de fluorescência permite compreender a capacidade da MO extraída em complexar ou liberar PTEs. O conteúdo de clorofila a (Chl-a) em sedimentos também reflete a eutrofização dos rios. Sua determinação é feita por meio de técnicas que exigem sua extração com solventes orgânicos. Assim, a avaliação direta da Chl-a nos sedimentos é ideal para avaliar o grau de eutrofização de rios. Algumas técnicas inovadoras baseadas em fluorescência, como a microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e a espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) permitem a análise direta das amostras e se destacam como uma vantagem para os inconvenientes relacionados às extrações químicas. Frente ao exposto, este estudo relata o desenvolvimento de instrumentação e métodos utilizando a LIBS para quantificar P, Cr, Cu e Ni em sedimentos, o emprego da EEM e da supressão de fluorescência para avaliar as propriedades ópticas e a interação da MO extraída com o Cu(II), respectivamente, e o desenvolvimento de métodos utilizando CLSM e LIFS para medir Chl-a em sedimentos a fim de avaliar a contaminação de ecossistemas aquático. Os resultados mostraram que as técnicas SP e DP LIBS tem grande potencial para determinação de P em sedimentos, porém para determinação de Cr, Cu e Ni é necessário empregar DP LIBS devido à sua maior sensibilidade. De acordo com a EEM e a supressão de fluorescência, a MO extraída dos sedimentos com NaOH (EOMSed) do Rio Piracicaba é de origem autóctone e alóctone derivada da MO do solo e interage mais com Cu(II) do a EOMSed do Rio Tietê que é predominantemente antropogênica. A CLSM permitiu verificar que a Chl-a tem maior afinidade e é menos oxidada na fração mineral do sedimento. E a LIFS combinada com a primeira derivada dos espectros mostrou ser capaz de semiquantificar a Chl-a em sedimentos. A combinação dos métodos desenvolvidos baseados em técnicas fotônicas é uma maneira eficiente para o monitoramento de ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Espectroscopia óptica. Sedimento fluvial. Matéria orgânica. Eutrofização. Contaminação.

## RÉSUMÉ

MORAIS, C. P. **Méthodes photoniques innovantes pour l'évaluation de la contamination des écosystèmes aquatiques à travers l'analyse des sédiments.** 2021. Thèse (Doctorat en Chimie Analytique) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brésil et Université de Toulon, La Garde, France, 2021.

Les contaminants présents dans les eaux de rivière peuvent être adsorbés par les matières en suspension et s'accumuler dans les sédiments. Le suivi des éléments potentiellement toxiques (PTEs) et du phosphore (P) dans les sédiments permet d'évaluer respectivement le niveau de contamination et le degré d'eutrophisation des rivières. Les techniques couramment utilisées pour la détermination des éléments dans les sédiments nécessitent la préparation d'échantillons générant des quantités considérables de résidus chimiques, de la main-d'œuvre et du temps. La spectrométrie d'émission optique à plasma induit par laser (LIBS) est une alternative pour contourner les inconvénients liés entre autre à la préparation des échantillons. La faible sensibilité de la LIBS à impulsion unique (SP) peut être augmentée en utilisant la LIBS à double impulsion (DP). Compte tenu de la complexité chimique des sédiments, la matière organique (MO) est l'un des paramètres qui doit être évalué. Le mode de mesure par matrice d'excitation-émission de fluorescence (EEM) combiné à une analyse factorielle parallèle (PARAFAC) peut être utilisé pour accéder aux informations sur la composition et l'origine de la MO extraite. Quant au quenching de fluorescence, cette technique permet de mesurer la capacité de la MO extraite à complexer ou à libérer les PTEs. La teneur en chlorophylle-a (Chl-a) dans les sédiments reflète également l'eutrophisation des rivières. Sa détermination se fait par des techniques qui nécessitent son extraction avec des solvants organiques. Ainsi, l'évaluation directe de la Chl-a dans les sédiments est idéale pour évaluer le degré d'eutrophisation des rivières. Certaines techniques innovantes basées sur la fluorescence, telles que la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) et la spectroscopie de fluorescence induite par laser (LIFS), permettent l'analyse directe des échantillons et constituent un avantage par rapport aux extractions chimiques. Compte tenu de ce qui précède, cette étude présente le développement d'instruments et de méthodes utilisant la LIBS pour quantifier P, Cr, Cu et Ni dans les sédiments, l'utilisation des EEMs et du quenching de fluorescence pour évaluer les propriétés optiques et l'affinité vis à vis des métaux de la MO extraite des sédiments, respectivement. Les résultats sur le développement de méthodes utilisant le CLSM et la LIFS pour mesurer le Chl-a dans les sédiments afin d'évaluer la contamination des écosystèmes aquatiques sont également présentés. Les résultats ont montré que les techniques SP et DP LIBS ont un grand potentiel pour la détermination du P dans les sédiments, mais pour la détermination du Cr, Cu et Ni, il est nécessaire d'utiliser la DP LIBS en raison de sa plus grande sensibilité. Selon le quenching de fluorescence et de la fluorescence EEMs, la MO extraite des sédiments avec NaOH (EOMSed) de la rivière Piracicaba est d'origine autochtone et allochtone dérivant de la MO du sol et interagit davantage avec le Cu(II) que l'EOMSed de la rivière Tietê dont l'origine est principalement anthropique. La CLSM a permis de vérifier que le Chl-a a une plus grande affinité et est moins oxydée dans la fraction minérale du sédiment. Le LIFS combiné à la dérivée première des spectres s'est avéré capable de semi-quantifier la Chl-a dans les sédiments. La combinaison des méthodes développées basées sur les techniques photoniques s'avère efficace pour la surveillance des écosystèmes aquatiques.

Mots-clés: Spectroscopie optique. Sédiment de rivière. Matière organique. Eutrophisation. Contamination.

## ABSTRACT

MORAIS, C. P. **Innovative photonic methods for assessing the contamination of aquatic ecosystems through sediment analysis**. 2021. Thesis (PhD in Analytical Chemistry) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil and University of Toulon, La Garde, France, 2021.

Contaminants present in water can be adsorbed by suspended materials and accumulate in sediment. The monitoring of potentially toxic elements (PTEs) and phosphorus (P) in sediments allows evaluating the contamination level and the degree of eutrophication of rivers, respectively. The techniques commonly used for the elemental determination in sediments require samples preparation generating considerable amounts of chemical residues and waste of time. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is an alternative to overcome the disadvantages associated with sample preparation. The low sensitivity of single pulse (SP) LIBS can be increased by employing double pulse (DP) LIBS. Considering the chemical complexity of the sediments, the organic matter (OM) is one of the parameters that must be evaluated. Fluorescence excitation-emission matrix (EEM) combined with parallel factor analysis (PARAFAC) can be used to access information about the composition and origin of the extracted OM. Fluorescence quenching allows to understand the ability of extracted OM to complex or release PTEs. The chlorophyll a (Chl-a) content in sediments also reflects the eutrophication of rivers and its determination is made through techniques that require its extraction with organic solvents. Thus, direct assessment of Chl-a in sediments is ideal to assess the degree of eutrophication of rivers. Some innovative fluorescence-based techniques such as confocal laser scanning microscopy (CLSM) and laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) allow direct analysis of samples and stand out as an advantage for the inconveniences related to chemical extractions. Based on that, this study reports the instrumentation and method development using LIBS to quantify P, Cr, Cu, and Ni in sediments, the use of EEMs and fluorescence quenching to assess the optical properties and interaction of the extracted OM with Cu(II), respectively, and the method development using CLSM and LIFS to measure Chl-a in sediments in order to assess the contamination of aquatic ecosystems. The results showed that the SP and DP LIBS techniques have great potential for determining P in sediments, but for the determination of Cr, Cu, and Ni it is necessary to use DP LIBS due to its greater sensitivity. According to EEMs and fluorescence quenching, the OM extracted from sediments with NaOH (EOMSed) from the Piracicaba River is of autochthonous and allochthonous origin, derived from the OM of the soil and interacts more with Cu(II) than the EOMSed from the Rio Tietê, which is predominantly anthropogenic. CLSM showed that Chl-a has greater affinity and is less oxidized in the mineral fraction of the sediment. LIFS combined with the first derivative of the spectra was shown to be able to semi-quantify Chl-a in sediments. The combination of methods developed based on photonic techniques proved to be efficient for monitoring aquatic ecosystems.

Keywords: Optical spectroscopy. River sediment. Organic matter. Eutrophication. Contamination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do reservatório de Barra Bonita (ponto branco) e estações de coleta das amostras de sedimentos (pontos vermelhos).....	30
Figura 2 – Testemunho de sedimentos coletado utilizando um coletor de testemunho por gravidade. ....	32
Figura 3 – Esquema geral de um sistema LIBS.....	34
Figura 4 – Esquema temporal da evolução de um plasma induzido por laser. ....	36
Figura 5 – Esquema temporal da evolução de um plasma LIBS quando dois pulsos de laser são usados. ....	38
Figura 6 – Configurações geométricas mais comuns usadas para DP LIBS: colinear (a), feixes cruzados (b), ortogonal com reaquecimento (c) e ortogonal com pré-ablação (d).....	39
Figura 7 – Comparação da regressão direta (a) e inversa (b) no mesmo conjunto de dados de calibração.....	43
Figura 8 – Diagrama de blocos do sistema LIBS desenvolvido.....	44
Figura 9 – Sistema LIBS montado na mesa óptica. (1) laser emitindo em 1064 nm; (2) laser emitindo em 532 nm; (3) gerador de atraso de pulso.....	45
Figura 10 – Focalização dos lasers no sistema LIBS. (1) e (2) espelhos laser linha em 1064 nm; (3) lente N-BK7 plano-convexa com revestimento antirreflexo; (4) prisma reto; (5) espelho laser linha em 532 nm; (6) lente N-BK7 plano-convexa sem revestimento antirreflexo. ....	46
Figura 11 – Coleta da radiação emitida pelas espécies excitadas no plasma. (1) e (2) lentes de sílica fundida plano-convexas sem revestimento antirreflexo, (3) cabo de fibra óptica, (4) mesa de coordenadas XYZ e (5) espectrômetro echelle. ....	47
Figura 12 – Câmara de ablação do sistema LIBS. (1) câmara de ablação e (2) porta amostra.....	48
Figura 13 – Média das razões S/N fora do IC de 95% para cada analito como função do número de espectros para cada medida.....	50
Figura 14 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para SP LIBS com o laser de 1064 nm.....	60
Figura 15 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para SP LIBS com o laser de 532 nm.....	62
Figura 16 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para DP LIBS.....	68
Figura 17 – Espectro de emissão de uma amostra de sedimento, de 175 a 341 nm, obtido com os sistemas SP LIBS com laser 1064 nm (a) e DP LIBS com a sequência de lasers de 532-1064 nm (b).....	69

Figura 18 – Gráficos de correlação linear para P usando (a) SP e (b) DP LIBS de 214,4 nm a 215,16 nm.....	70
Figura 19 – Curvas analíticas de calibração para a determinação de P total em sedimentos por (a) SP LIBS e (b) DP LIBS e curvas de validação para os métodos (c) SP LIBS e (d) DP LIBS. ....	71
Figura 20 – Distribuição de P total dentro dos testemunhos de sedimentos nas estações de coleta. ....	73
Figura 21 – Erro quadrático médio de validação (RMSEV) para Cr, Cu e Ni, empregando os tratamentos espectrais propostos e a recuperação (%) para Cr, Cu e Ni em amostras de sedimentos determinadas por LIBS usando modelos de calibrações com a CM e a PI.....	76
Figura 22 – Boxplot de CF, Igeo e EF no sedimento. As caixas (box) representam os percentis 25, 50 (mediana) e 75, enquanto as hastes (bigodes ou whiskers) indicam os valores mínimo e máximo. Valores médios (●).....	81
Figura 23 – Intervalos dos valores dos índices combinados (PLI, mC <sub>d</sub> , IPITh, PERI, TRI e m-PEL-q) em cada ponto de amostragem. ....	83
Figura 24 – Diagrama de Jablonski. ....	90
Figura 25 – Esquema geral da configuração de um fluorímetro. ....	91
Figura 26 – Conjunto de dados EEM decompostos em três componentes fluorescentes usando PARAFAC.....	93
Figura 27 – Esquema geral de um sistema LIFS. ....	96
Figura 28 – Distribuição de TC dentro dos testemunhos de sedimentos nas estações de coleta. ....	102
Figura 29 – Relação entre absorvância ultravioleta específica a 254 nm (SUVA <sub>254</sub> ) e razão molar carbono orgânico não-purgável (NPOC) e nitrogênio orgânico total (TON) da matéria orgânica extraída de sedimentos.....	105
Figura 30 - Gráficos de contorno EEM das três componentes do modelo PARAFAC (esquerda) e seus espectros de excitação e emissão (direita). ....	107
Figura 31 – Intensidade de fluorescência dos componentes (C1, C2 e C3) retirados da matéria orgânica extraída dos sedimentos ao longo dos testemunhos de sedimentos identificadas por PARAFAC.....	110
Figura 32 – Intensidade de fluorescência dos componentes (C1, C2 e C3) retirados da matéria orgânica extraída com água dos sedimentos ao longo dos testemunhos de sedimentos identificadas por PARAFAC.....	111
Figura 33 – Gráficos de contorno EEM das três componentes do modelo PARAFAC. ....	114

Figura 34 – Gráfico da supressão da fluorescência dos componentes 1 e 2 e da constante fluorescência da componente 3 com adição de Cu(II).....	115
Figura 35 – Avaliação das constantes de estabilidade condicional (K) para as interações de Cu(II) com a EOM Sed, utilizando o modelo de equilíbrio 1:1 proposto por Ryan e Weber com os componentes 1 e 2 obtidos pelo PARAFAC.....	117
Figura 36 – Distribuição da capacidade de complexação (CC) ao longo dos testemunhos de sedimento das estações de coleta. ....	119
Figura 37 – Espectros UV-Vis das amostras de sedimentos extraídas com acetona do Rio Piracicaba (estação 2) (a) e do Rio Tietê (estação 5) (b) em três diferentes profundidades. .	123
Figura 38 – Imagens de fluorescência com alta resolução espacial obtidas com CLSM das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) (a) e do Rio Tietê (estação 5) (b) e os respectivos espectros de emissão de fluorescência com excitação 2P à 800 nm para cada região de interesse (ROI). ....	124
Figura 39 – Imagens confocais e espectros de emissão obtidos no modo canal para a amostra de sedimento do Rio Tietê coletada na estação 5 a uma profundidade de 27,5 cm. Espectros de emissão e ajustes gaussianos da MO, Chl-b e Chl-a (a) e imagem de fluorescência excitada em 800 nm obtida no modo canal (b). Imagens de fluorescência excitadas em 405 nm obtidas no canal verde (c), canal vermelho (d), a luz transmitida (e), e o gráfico da intensidade em relação à distância da reta 1 (f). ....	126
Figura 40 – Espectros LIFS das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) (a), Rio Tietê (estação 5) (b), e os respectivos gráficos da primeira derivada do espectro de 450 a 893 nm (c e d).....	128
Figura 41 – Distribuição da taxa de variação máxima da primeira derivada da banda de clorofila a em 678 nm ( $\delta\text{Chl-a}_{678}$ ) ao longo dos testemunhos de sedimento das estações de coleta. .	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas geográficas de cada estação de coleta.....	31
Tabela 2 – Profundidade de cada camada do testemunhos de sedimento.....	32
Tabela 3 – Linhas espectroscópicas de emissão atômica (I) e iônica (II) avaliadas.....	49
Tabela 4 – Condições operacionais para a determinação por ICP OES. ....	55
Tabela 5 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e importância relativa (RI) para os efeitos linear e quadrático nos modelos finais de DCC para SP LIBS com os lasers de 1064 e 532 nm.....	59
Tabela 6 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e importância relativa (RI) para efeitos lineares nos modelos finais de planejamento fatorial fracionados para DP LIBS. ....	65
Tabela 7 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e importância relativa (RI) para os efeitos linear e quadrático nos modelos finais de DCC para DP LIBS...	67
Tabela 8 – Parâmetros de desempenho analítico.....	79
Tabela 9 – Concentração média de carbono orgânico não-purgável (NPOC) e nitrogênio orgânico total (TON), rendimento de extração alcalina, razão molar NPOC/TON e absorvância ultravioleta específica a 254 nm (SUVA <sub>254</sub> ) da matéria orgânica extraída de sedimentos nas estações de coleta.....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2P	Dois fótons
AP	Pulsos acumulados
C	Carbono
C1	Componente 1
C2	Componente 2
C3	Componente 3
CC	Capacidade de complexação
CCME	Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (do inglês <i>Canadian Council of Ministers of the Environment</i> )
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CF	Fator de contaminação (do inglês <i>contamination factor</i> )
Chl-a	Clorofila a
Chl-b	Clorofila b
CL	Concentração total de sítios ligantes
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser (do inglês <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
CM	Compatibilização de matriz
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CORCONDIA	Diagnóstico de consistência de núcleo (do inglês <i>core consistency diagnostic</i> )
Cr	Cromo
CRMs	Materiais de referência certificados
Cu	Cobre
CV	Coefficiente de variação
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DCC	Delineamento composto central
DOE	Planejamento de experimentos (do inglês <i>design of experiments</i> )
DP	Pulso duplo (do inglês <i>double pulse</i> )
DT	Tempo de atraso (do inglês <i>delay time</i> )
EEM	Fluorescência no modo matriz excitação-emissão (do inglês <i>fluorescence excitation-emission matrix</i> )
EF	Fator de enriquecimento (do inglês <i>enrichment factor</i> )
EOMSed	Matéria orgânica extraída dos sedimentos



GW	Janela de integração (do inglês <i>gate width</i> )
IC	Intervalo de confiança
ICCD	Dispositivo de carga acoplado intensificado (do inglês <i>intensified charge-coupled device</i> )
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma emission spectrometry</i> )
ID	Tempo de atraso entre os pulsos (do inglês <i>inter-pulse delay</i> )
IF	Fluorescência emitida
I <sub>geo</sub>	Índice de geoacumulação (do inglês <i>geoaccumulation index</i> )
IPI <sub>Th</sub>	Índice de poluição de limiar integrado (do inglês <i>integrated threshold pollution index</i> )
K <sub>ML</sub>	Constante de estabilidade condicional
LE	Energia do laser
LIBS	Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (do inglês <i>laser-induced breakdown spectroscopy</i> )
LIFS	Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (do inglês <i>laser-induced fluorescence spectroscopy</i> )
LOD	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of detection</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i> )
mC <sub>d</sub>	Grau modificado de contaminação (do inglês <i>modified degree of contamination</i> )
MLR	Regressão linear múltipla (do inglês <i>multiple linear regression</i> )
MO	Matéria orgânica
m-PEL-q	Quociente de nível de efeito provável médio (, do inglês <i>mean probable effect level quotient</i> )
N	Nitrogênio
Ni	Níquel
NPOC	Carbono orgânico não-purgável (do inglês <i>non-purgeable organic carbon</i> )
OC	Carbono orgânico (do inglês <i>organic carbon</i> )
P	Fósforo
PARAFAC	Análise de fatores paralelos (do inglês <i>parallel factor analysis</i> )
PCR	Regressão por componentes principais (do inglês <i>principal component regression</i> )

PEL	Nível de Efeito Provável (do inglês <i>Probable Effect Level</i> )
PERI	Índice de risco ecológico potencial (do inglês <i>potential ecological risk index</i> )
PFA	Perfluoroalcoxi alcanos
PI	Padronização interna
PLI	Índice de carga de poluição (do inglês <i>pollution load index</i> )
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês <i>partial least squares</i> )
PTEs	Elementos potencialmente tóxicos (do inglês <i>potentially toxic elements</i> )
R <sup>2</sup>	Coefficientes de determinação
RMSEC	Erro quadrático médio da calibração
RMSEV	Erro quadrático médio da validação
ROI	Região de interesse (do inglês <i>region of interest</i> )
S/B	Sinal-fundo (do inglês <i>signal-to-background</i> )
S/N	Sinal-ruído (do inglês <i>signal-to-noise</i> )
SP	Pulso único (do inglês <i>single pulse</i> )
SQGs	Diretrizes de Qualidade de Sedimentos
SUVA <sub>254</sub>	Absorbância ultravioleta específica a 254 nm (do inglês <i>specific ultraviolet absorbance at 254 nm</i> )
TC	Carbono total (do inglês <i>total carbon</i> )
TEL	Nível de Efeito Limiar (do inglês <i>Threshold Effect Level</i> )
TON	Nitrogênio orgânico total (do inglês <i>total organic nitrogen</i> )
TP	Fósforo total (do inglês <i>total phosphorus</i> )
TRI	Índice de risco tóxico (do inglês <i>the toxic risk index</i> )
UGRHI	Unidade Hidrográfica de Gerenciamento de Recursos Hídricos
WEOM <sub>Sed</sub>	Matéria orgânica extraída com água dos sedimentos
δChl-a <sub>678</sub>	Taxa de variação máxima da primeira derivada da banda de clorofila a em 678 nm

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....	22
1.1 Contextualização do problema.....	22
1.2 Hipóteses.....	27
1.3 Objetivos.....	27
1.3.1 Objetivo geral .....	27
1.3.2 Objetivos específicos.....	28
CAPÍTULO 2 – DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DOS SEDIMENTOS.....	29
2.1 Área de estudo.....	29
2.2 Amostragem dos sedimentos.....	30
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE ELEMENTAR DE SEDIMENTOS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER .....	33
3.1 Revisão bibliográfica.....	33
3.1.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser.....	33
3.1.1.1 Instrumentação LIBS .....	34
3.1.1.2 Ablação a laser, formação e evolução do plasma .....	35
3.1.1.3 LIBS com pulso duplo .....	37
3.1.1.4 Planejamento de experimentos .....	39
3.1.1.5 Calibração em LIBS.....	40
3.2 Procedimento experimental.....	44
3.2.1 Instrumentação LIBS.....	44
3.2.2 Otimização de parâmetros .....	48
3.2.2.1 Amostra.....	48
3.2.2.2 Reprodutibilidade espectral.....	48
3.2.2.3 Planejamento de experimentos .....	51
3.2.2.3.1 Delineamento composto central para SP LIBS.....	51
3.2.2.3.2 Otimização de fatores para DP LIBS .....	52
3.2.2.3.3 Análise dos dados obtidos com DOE.....	53
3.2.3 Determinação de fósforo total e elementos potencialmente tóxicos.....	53
3.2.3.1 Análises por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	53
3.2.3.2 Desenvolvimento dos métodos de calibração por LIBS .....	55
3.2.3.2.1 Análise de dados para quantificação de TP .....	55

3.2.3.2.2	Análise de dados para a quantificação de Cr, Cu e Ni .....	56
3.2.3.2.2.1	Metodologia para avaliação de risco ecológico e qualidade de sedimentos .....	57
3.3	Resultados e discussão .....	58
3.3.1	Otimização dos parâmetros LIBS a partir de DOE .....	58
3.3.1.1	Delineamento composto central para SP LIBS com lasers de 1064 e 532 nm .	58
3.3.1.2	Otimização de fatores para DP LIBS .....	63
3.3.2	Determinação de TP por LIBS .....	69
3.3.2.1	LIBS .....	69
3.3.2.2	Distribuição de TP dentro dos núcleos de sedimentos .....	72
3.3.3	Determinação de Cr, Cu e Ni por LIBS .....	75
3.3.3.1	Métodos de calibração .....	75
3.3.3.2	Avaliação de risco ecológico e nível de poluição de sedimentos .....	80
3.3.3.2.1	Concentração de elementos potencialmente tóxicos em sedimentos .....	80
3.3.3.2.2	Índices simples .....	80
3.3.3.2.3	Índices combinados .....	82
3.4	Considerações parcial .....	84
<b>CAPÍTULO 4 – ANÁLISE MOLECULAR DA MATÉRIA ORGÂNICA E DA CLOROFILA A DOS SEDIMENTOS POR TÉCNICAS BASEADAS EM FLUORESCÊNCIA .....</b>		
4.1	Revisão bibliográfica .....	87
4.1.1	Matéria orgânica em sedimentos .....	87
4.1.2	Clorofila a como indicador de eutrofização .....	88
4.1.3	Luminescência .....	89
4.1.4	Espectroscopia de fluorescência convencional .....	90
4.1.4.1	Fluorescência no modo matriz excitação-emissão .....	92
4.1.4.2	Supressão de fluorescência .....	94
4.1.5	Espectroscopia de fluorescência induzida por laser .....	95
4.1.6	Microscopia confocal de varredura a laser .....	96
4.2	Avaliação da matéria orgânica por EEM e supressão de fluorescência .....	97
4.2.1	Procedimento experimental .....	97
4.2.1.1	Análise Elementar .....	97
4.2.1.2	Caracterização da matéria orgânica extraída das amostras de sedimentos .....	97
4.2.1.2.1	Extração .....	97

4.2.1.2.2 Determinação de carbono orgânico não-purgável e nitrogênio orgânico total .....	98
4.2.1.2.3 Espectroscopia UV–Vis.....	98
4.2.1.2.4 Análise estatística .....	98
4.2.1.2.5 EEM.....	99
4.2.1.2.5.1 Preparo e análise das amostras por EEM .....	99
4.2.1.2.5.2 Análise dos dados EEM .....	99
4.2.1.2.6 Supressão de fluorescência .....	100
4.2.1.2.6.1 Preparo e análise das amostras por supressão de fluorescência .....	100
4.2.1.2.6.2 Análise dos dados de supressão de fluorescência .....	100
4.2.2 Resultados e discussão .....	100
4.2.2.1 Características do carbono total nos sedimentos inteiros.....	100
4.2.2.2 Características da matéria orgânica extraída com NaOH dos sedimentos .....	103
4.2.2.3 Espectros EEM da matéria orgânica.....	106
4.2.2.4 Características da composição da matéria orgânica extraída de sedimentos dos Rios Piracicaba e Tietê .....	112
4.2.2.5 Avaliação da reatividade da matéria orgânica na presença de Cu(II) por supressão de fluorescência.....	113
4.2.2.5.1 Componentes fluorescentes .....	113
4.2.2.5.2 Constantes de estabilidade e capacidades de complexação .....	114
4.2.3 Considerações parcial.....	120
4.3 Avaliação da clorofila a nos sedimentos por LIFS e CLSM.....	120
4.3.1 Procedimento experimental .....	120
4.3.1.1 Espectroscopia UV-Vis.....	120
4.3.1.2 Microscopia confocal de varredura a laser.....	121
4.3.1.3 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser .....	121
4.3.2 Resultados e discussão .....	122
4.3.2.1 Confirmação de clorofila em sedimentos.....	122
4.3.2.2 Caracterização da clorofila a em sedimentos por CLSM.....	123
4.3.2.3 Avaliação semiquantitativa da clorofila a por LIFS .....	127
4.3.2.4 Implicações Ambientais .....	131
4.3.3 Considerações parcial.....	132
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO .....	133

REFERÊNCIAS .....	135
APÊNDICE .....	156
APÊNDICE A – Avaliações de risco ecológico .....	156
APÊNDICE B – Índices ecológicos e avaliação da poluição usando SQGs .....	157
APÊNDICE C – Classificação de riscos ecológicos e poluição ambiental .....	158
APÊNDICE D – Qualidade do sedimento de acordo com SQGs .....	159
APÊNDICE E – Valores de índices combinados em cada ponto de amostragem .....	160
APÊNDICE F – Características da matéria orgânica extraída dos sedimentos .....	161
APÊNDICE G – Distribuição das constantes de estabilidade condicional para as interações de Cu(II) com a EOMSed .....	163
ANEXO .....	164
Anexo A – Artigo publicado no periódico <i>Analytical Methods</i> .....	164
Anexo B – Artigo publicado no periódico <i>Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy</i> . .....	165
Anexo C – Artigo publicado no periódico <i>Applied Spectroscopy</i> . .....	166

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 Contextualização do problema

Nos últimos 30 anos o Brasil perdeu 15,7% de todos os seus recursos hídricos superficiais. Isto representa 3,1 milhões de hectares e se nenhuma medida for tomada, essa redução poderá ser de 25% antes de 2050 (PROJETO MapBiomias, 2021). Os principais fatores que explicam esta redução da superfície de água no Brasil e que tem causado impactos negativos na produção de alimentos e de energia elétrica são as mudanças climáticas; o crescimento populacional; o desmatamento para implantação da agropecuária, o qual interfere no aumento da temperatura local, altera nascentes de rios e leva ao assoreamento de rios e lagos; a construção de pequenas represas para irrigação de fazendas e de grandes represas para produção de energia, levando a diminuição do fluxo hídrico e perda de água para a atmosfera por processos de evaporação, respectivamente; e as queimadas (BHERING *et al.*, 2021; PROJETO MapBiomias, 2021).

Ademais, o Estado de São Paulo que é o mais populoso e com maior PIB do Brasil enfrenta diversos problemas quanto à poluição de seus rios. Em áreas com alta densidade populacional, as principais fontes de contaminação dos corpos d'água são despejo de esgoto doméstico, efluente industrial e água drenada de áreas agrícolas (KUBO; KANDA, 2020). Os contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes nas águas podem ser adsorvidos por materiais em suspensão e então acumulados em sedimentos (CHOI *et al.*, 2021). Além do transporte de sedimentos, o aumento da vazão dos rios, das chuvas e das atividades antropogênicas que afetam o leito do rio, como construção de pilares de sustentação de pontes, dragagens, passagem de dutos, entre outras, podem provocar o revolvimento dos sedimentos e a transferência dos contaminantes para a coluna de água (SAHU; PRUSTY; GODGUL, 1994). Desta forma, o monitoramento da poluição se faz necessário visando a tomada de medidas apropriadas para a recuperação e preservação da qualidade das águas. Para avaliar a qualidade dos ecossistemas aquáticos, a análise de testemunhos de sedimentos é preferida por mostrar a distribuição dos elementos em profundidade e correlacionar o perfil obtido com o histórico de uso e ocupação do solo e, conseqüentemente, com potenciais contribuições antrópicas, que nem sempre são detectáveis pelo uso da qualidade da água (CETESB, 2018). Este conhecimento ajuda também a avaliar o risco potencial de contaminação da coluna de água pelos sedimentos.

Dentre os contaminantes presentes nos corpos aquáticos, os elementos potencialmente tóxicos (PTEs, do inglês *potentially toxic elements*) (DUFFUS, 2002; POURRET; HURSTHOUSE, 2019) presentes em sedimentos são considerados uma grande ameaça para os organismos aquáticos, uma vez que não são biodegradáveis e podem ser propagados facilmente

na cadeia alimentar (CHEN *et al.*, 2016). O monitoramento de PTEs em ambientes aquáticos é de grande importância porque enquanto alguns elementos como cromo (Cr) e o níquel (Ni) são extremamente tóxicos a todos os organismos, o cobre (Cu) é um metal essencial no ciclo de vida de todas as plantas e animais aquáticos, no entanto em determinadas quantidades pode se tornar tóxico (DEBNATH; SINGH; SHARMA, 2021). Os sedimentos atuam como o principal sumidouro de PTEs em ecossistemas aquáticos e são um indicador eficaz de contaminação por metais (BING *et al.*, 2016). No entanto, se ocorrer alterações nas condições do rio, os sedimentos podem também atuar como potenciais fontes de poluentes secundários no ambiente aquático (CHEN *et al.*, 2016).

De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), a qualidade dos sedimentos é avaliada considerando três linhas de evidências: contaminação química, comunidade bentônica e toxicidade. Para avaliar a contaminação química, as substâncias químicas são classificadas de acordo com sua concentração nos sedimentos. O CONAMA e a CETESB segue os valores de classificação estabelecidos pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (CCME, do inglês *Canadian Council of Ministers of the Environment*) (CETESB, 2018; BRASIL, 2012). Os limites desses valores são baseados na probabilidade de ocorrência de efeitos adversos à biota aquática, sendo que o menor limite é o Nível de Efeito Limiar (TEL, do inglês *Threshold Effect Level*), cuja concentração está abaixo da qual raramente são esperados efeitos biológicos adversos e o maior limite é o Nível de Efeito Provável (PEL, do inglês *Probable Effect Level*), cuja concentração está acima da qual frequentemente são esperados efeitos biológicos adversos.

A avaliação da qualidade dos sedimentos por meio da linha de evidência contaminação química é complementada pela análise de fósforo total (TP, do inglês *total phosphorus*), que é uma variável química importante no estudo da qualidade do sedimento, pois permite avaliar a carga de nutrientes e a extensão do grau de eutrofização dos corpos d'água. A origem do fósforo (P) nos sedimentos pode ser natural, vinda de fora do sistema aquático (alóctone), de dentro do sistema (autóctone) ou antropogênica (THOMAZ; PEREIRA; PAGIORO, 2001). Dependendo da concentração, o P pode ser prejudicial ao sistema aquático, acelerando o processo de eutrofização dos rios (EBADI; HISORIEV, 2018; REYNOLDS; DAVIES, 2001). A consequência ambiental mais severa é a diminuição do oxigênio dissolvido na água, causando a morte de espécies vegetais e animais. Além disso, altera o sabor e o cheiro da água (MŁYNARCZYK *et al.*, 2013).

O método oficial para determinação elementar em sedimentos é o método USEPA 6010C. Este método utiliza a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente



acoplado (ICP OES, do inglês *inductively coupled plasma emission spectrometry*) para a determinação elementar (USEPA, 2000). Essa técnica exige o preparo das amostras de sedimentos para compatibilizá-las com seu sistema de introdução de amostras. A conversão de amostras sólidas em soluções é, na maioria das vezes, feita por procedimentos de digestão via úmida empregando altos volumes de misturas oxidantes (MŁYNARCZYK *et al.*, 2013; PEREIRA, T. de S. *et al.*, 2015; ROSOLEN *et al.*, 2015). Assim, quantidades consideráveis de resíduos químicos são gerados, discordando dos princípios da química verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010; ANASTAS, 1999).

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS, do inglês *laser-induced breakdown spectroscopy*) é uma técnica alternativa para contornar as desvantagens associadas ao preparo da amostra, pois possibilita a análise direta de amostras sólidas, eliminando ou reduzindo o uso de reagentes químicos. Além disso, a técnica LIBS apresenta outras vantagens, como custo de análise relativamente baixo quando comparado aos métodos analíticos convencionais e análise rápida em tempo real. A LIBS é uma técnica de espectroscopia de emissão óptica que usa um plasma gerado por um laser pulsado para vaporizar, atomizar e excitar os analitos presentes em uma amostra. Quando as espécies excitadas retornam a um estado de menor energia, elas emitem linhas de emissão discretas que são características de cada elemento (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013). Este espectro de emissão contém informações qualitativas e quantitativas sobre a composição da amostra (SENESI *et al.*, 2018). No entanto, as limitações da LIBS, em comparação com as técnicas analíticas clássicas, são a menor sensibilidade e precisão, devido aos efeitos de matriz, o que dificulta a construção de modelos de calibração para análise quantitativa (FERREIRA *et al.*, 2011). Trabalhos na literatura científica têm mostrado que a sensibilidade do sistema LIBS com pulso único (SP, do inglês *single pulse*) pode ser aumentada significativamente empregando a abordagem LIBS com pulso duplo (DP, do inglês *double pulse*) (MENEGATTI *et al.*, 2017; NICOLODELLI *et al.*, 2015, 2017). No entanto, é de extrema importância otimizar os parâmetros instrumentais que influenciam na obtenção dos espectros LIBS. Para isso, o planejamento de experimentos (DOE, do inglês *design of experiments*) pode ser utilizado para definir os parâmetros analíticos mais apropriados para a análise multielementar de sedimento de rio (YU *et al.*, 2019). Como o desenvolvimento de métodos quantitativos em LIBS para análise de amostras complexas, como sedimentos, é um grande desafio devido aos efeitos de matriz que são muito acentuados nessa técnica, é necessário investigar diferentes tratamentos espectrais e estratégias de calibração do método a fim de obter modelos de calibração que

permitem determinações com exatidão e precisão satisfatórias (CASTRO; PEREIRA-FILHO, 2016; DE MORAIS *et al.*, 2017).

Considerando a complexidade química dos sedimentos, a matéria orgânica (MO) deve ser caracterizada. Visto que a atividade microbiana degrada a MO em compostos menores, reduzindo seu potencial redutor, mudando a química dos PETs e interferindo nos processos de formação do plasma LIBS. O lançamento de esgotos domésticos sem tratamento é uma das principais causas do aumento da concentração da MO nos rios e a sua decomposição pelos microrganismos reduz os níveis de oxigênio dissolvido no meio aquático, podendo o rio se tornar um ambiente anóxico. Na presença de oxigênio, a decomposição da MO carbonácea e nitrogenada libera P e nitrogênio (N) e torna o meio redutor no caso dos sedimentos (ZANG *et al.*, 2000). Dessa forma, tanto a entrada desses nutrientes nos corpos aquáticos como as suas liberações devido a decomposição da MO são preocupantes, pois em excesso, esses nutrientes provocam a ocorrência do fenômeno denominado de eutrofização, elevando as taxas de produção primária e o crescimento excessivo de algas e macrófitas aquáticas (ANDERSON; GLIBERT; BURKHOLDER, 2002). Na ausência de oxigênio, a decomposição da MO causa a liberação de subprodutos voláteis odoríferos dos corpos d'água, causando incômodos à população e danos aos materiais e à flora (HULTHE; HULTH; HALL, 1998).

Como a MO representa uma mistura complexa de moléculas que variam de tamanho e complexidade de monômeros simples a restos mais ou menos intactos de organismos, algumas técnicas analíticas não permitem a sua avaliação direta e total, por isso, a extração baseada na solubilidade pode ser empregado (FUNKEY; CONLEY; STEDMON, 2019). A caracterização da MO extraída de sedimentos por meio das suas propriedades ópticas tem mostrado ser uma maneira rápida e eficiente para avaliar a qualidade dos recursos hídricos e obter informações sobre as atividades antrópicas (DU, Y. X. *et al.*, 2021). A fluorescência no modo matriz excitação-emissão (EEM, do inglês *fluorescence excitation-emission matrix*) tem sido amplamente empregada para a caracterização da MO porque ela tem o potencial de acessar informações importantes sobre processos bioquímicos por meio da fluorescência (MARKECHOVÁ; TOMKOVÁ; SÁDECKÁ, 2013; MCKNIGHT *et al.*, 2001; PITTA; ZERI, 2021). Devido à complexidade dos dados EEM, a decomposição matemática utilizando a análise de fatores paralelos (PARAFAC, do inglês *parallel factor analysis*) tem sido empregada no tratamento desses dados com intuito de reduzi-los, facilitando a sua interpretação (MURPHY *et al.*, 2013).

Os sedimentos funcionam como sumidouro de PTEs em parte devido à capacidade da MO em interagir com os PTEs presentes no ambiente formando complexos metal-ligante

orgânico (BING *et al.*, 2016; BOYD *et al.*, 2005). Para avaliar e entender o papel da MO na captura dos metais nos sedimentos, é necessário compreender a capacidade da MO em complexar ou liberar esses contaminantes metálicos. Dessa forma, a supressão de fluorescência tem sido empregada para determinar as propriedades químicas da MO e investigar suas habilidades de ligação com íons metálicos porque a formação de complexos metal-ligante orgânico diminui a fluorescência da MO (OSBURN; DEL VECCHIO; BOYD, 2014).

Um corpo aquático eutrofizado é caracterizado por alta produção primária, aumento da taxa de sedimentação e anoxia em sedimentos. Além da concentração de TP nos sedimentos, o aumento da síntese de MO e consequente eutrofização dos rios pode ser monitorada pela medida direta da clorofila a (Chl-a) em sedimentos (CHEN, N.; BIANCHI; BLAND, 2003). Essa variável permite monitorar o processo de eutrofização por estar relacionado ao nível de crescimento de algas (KOWALEWSKA, 2005). Geralmente, a concentração de Chl-a em amostras de sedimentos é determinada por espectrofotometria UV-Vis usando acetona como solventes para sua extração (SANCHINI; GROSJEAN, 2020). Algumas técnicas baseadas em fluorescência permitem a análise direta das amostras e se destacam como uma vantagem para os inconvenientes relacionados às extrações químicas com solventes orgânicos. Essas técnicas permitem um estudo seletivo de moléculas que apresentam fluorescência nas amostras em comprimentos de onda específicos (LAKOWICZ, 2013). A microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, do inglês *confocal laser scanning microscopy*) pode fornecer informações relevantes sobre a concentração e a distribuição espacial do fluoróforo em uma amostra (COLETTA *et al.*, 2013). A CLSM é uma técnica que tem sido aplicada nos últimos anos para obter imagens de fluorescência de amostras com alta resolução espacial e espectro de emissão de fluorescência para cada pixel da imagem (LORÉN; LANGTON; HERMANSSON, 2007). A CLSM é um microscópio convencional com lentes convergentes, iluminação monocromática apropriada para excitar os fluoróforos na amostra e um *pinhole* posicionado antes do detector para passar somente a luz provinda do ponto focal das lentes. Este tipo de microscópio utiliza filtros ópticos para adquirir apenas a luz emitida pela espécie para formar a imagem de fluorescência da amostra (HACKLEY *et al.*, 2020).

Outra interessante possibilidade é a espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS, do inglês *laser-induced fluorescence spectroscopy*) que tem sido usada para avaliar a qualidade da MO do solo por meio do espectro de emissão, o qual tem mostrado relação direta com a aromaticidade da MO (MILORI *et al.*, 2006; TADINI *et al.*, 2018, 2021). A LIFS usa um laser de diodo contínuo na região do azul para excitar os fluoróforos presentes nas amostras e a intensidade do espectro está relacionada ao número de espécies excitadas (MILORI *et al.*,

2006; TIVET *et al.*, 2013). O fenômeno de fluorescência ocorre em sistemas que permitem a transição de  $n$  ou  $\pi$  elétrons para orbitais  $\pi^*$ , como os sistemas aromáticos (SENESI, *et al.*, 1991).

Frente ao exposto, este estudo relata o desenvolvimento de instrumentação e métodos quantitativos utilizando a LIBS, a caracterização elementar e molecular da MO extraída e suas propriedades químicas e o desenvolvimento de métodos utilizando CLSM e LIFS para medidas de Chl-a, a fim de avaliar a qualidade de sedimentos fluviais de diferentes bacias hidrográficas que recebem diferentes cargas de efluentes e assim, permitindo o monitoramento de rios em relação a contaminação de PTEs e o grau de eutrofização.

## 1.2 Hipóteses

Este trabalho foi realizado para verificar três hipóteses: (i) a técnica LIBS tem sido muito estudada principalmente por permitir análises de baixo custo, por isso, pressupõe que a LIBS pode quantificar P, Cr, Cu e Ni em sedimentos de forma simultânea com precisão e sensibilidade adequada para realizar o monitoramento ambiental de acordo com as legislações vigentes; (ii) a qualidade dos corpos aquáticos também pode ser avaliada através das propriedades ópticas e estabilidade da MO extraída de sedimentos, sendo assim, acredita-se que o emprego da EEM e da supressão de fluorescência possibilita obter informações sobre origem e capacidade da MO em complexar ou liberar esse PTEs, respectivamente; (iii) além disso, foi hipotetizado que a Chl-a pode ser excitada diretamente no sedimento, e sua fluorescência pode ser usada como um indicador para avaliar o grau de eutrofização em um rio. Considera-se que a CLSM é uma ferramenta capaz de avaliar se a Chl-a permaneceu oxidada no sedimento e como ela interage com partículas minerais. E que o uso da LIFS permite a análise semiquantitativa em grande escala de Chl-a no sedimento.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo geral

Tendo sido definidas as hipóteses sobre as quais este estudo está fundamentado e sendo de grande importância a avaliação da qualidade dos recursos hídricos no atual cenário de escassez de água, com este trabalho pretendeu-se desenvolver métodos baseados em técnicas fotônicas para o monitoramento de ecossistemas aquáticos por meio da análise elementar e molecular de testemunhos de sedimentos.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Cada etapa deste estudo contou com diferentes objetivos que foram essenciais para a tomada de decisão das etapas seguintes e conclusão do trabalho. Dessa forma, os objetivos específicos foram:

- Desenvolver um sistema LIBS que opera no modo SP LIBS com lasers de diferentes comprimentos de onda e DP LIBS com feixe cruzado;
- Otimizar os principais parâmetros que influenciam a aquisição de espectros LIBS para análise qualitativa multielementar de sedimentos de rios por meio de diferentes DOE;
- Avaliar diferentes tratamentos espectrais e estratégias de calibração de método na construção de modelos de calibração univariados para P, Cr, Cu e Ni;
- Avaliar o risco ecológico e o nível de poluição dos sedimentos estudados;
- Caracterizar a MO mais reativa e a mais disponível extraída de sedimentos;
- Determinar as propriedades físico-químicas da MO mais reativa extraída de sedimentos e investigar sua habilidade de ligação com íons Cu(II);
- Avaliar a interação organomineral da Chl-a e da MO com a fração mineral dos sedimentos;
- Desenvolver um método semiquantitativo de Chl-a em sedimentos.

## CAPÍTULO 2 – DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM DOS SEDIMENTOS

### 2.1 Área de estudo

A área de estudo abrange os Rios Tietê e Piracicaba a montante do reservatório de Barra Bonita, no Estado de São Paulo, Brasil. O reservatório de Barra Bonita, localizado entre os municípios de Barra Bonita e Igarapu do Tietê, foi criado a partir do alagamento e represamento dos Rios Tietê e Piracicaba (BERNARDO *et al.*, 2016). Esses rios passam por grandes centros urbanos até sua confluência. Embora ambos recebam uma grande carga de poluentes orgânicos e inorgânicos, que chegam ao reservatório, a carga de poluentes despejados no Rio Tietê é maior que no Rio Piracicaba (SMITH; ESPÍNDOLA; ROCHA, 2014). A área de estudo foi escolhida devido aos diferentes usos e ocupações do solo nesta região, caracterizada por problemas de poluição e múltiplos usos da água. Além disso, esta região tem sofrido muitas ações antropogênicas, principalmente devido ao desmatamento e inundações para a construção de seis reservatórios sucessivos na Bacia do Médio Tietê, sendo o reservatório de Barra Bonita o primeiro deles (RODRIGUES *et al.*, 2020).

As Bacias do Tietê e Piracicaba fazem parte de diferentes Unidades Hidrográficas de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) e possuem diferentes estratégias de gestão dos recursos hídricos, com diferentes tipos de uso e ocupação do solo (CRUZ *et al.*, 2017). A Bacia do Médio Tietê faz parte da UGRHI-10, que é denominada Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba e Médio Tietê. A área do Médio Tietê abrange o trecho do Rio Tietê desde a saída do Reservatório de Pirapora até a barragem de Barra Bonita, com extensão de 367 km e área de drenagem de, aproximadamente, 11.829 km<sup>2</sup>. Os seus principais afluentes são os rios da UGRHI-5 que é composta pelos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. Dentre esses rios, o Rio Piracicaba, o qual nasce da junção dos Rios Atibaia e Jaguari, se destaca por ser o maior afluente em volume do Rio Tietê. A UGRHI-5 possui uma área de drenagem de, aproximadamente, 14.178 km<sup>2</sup>.

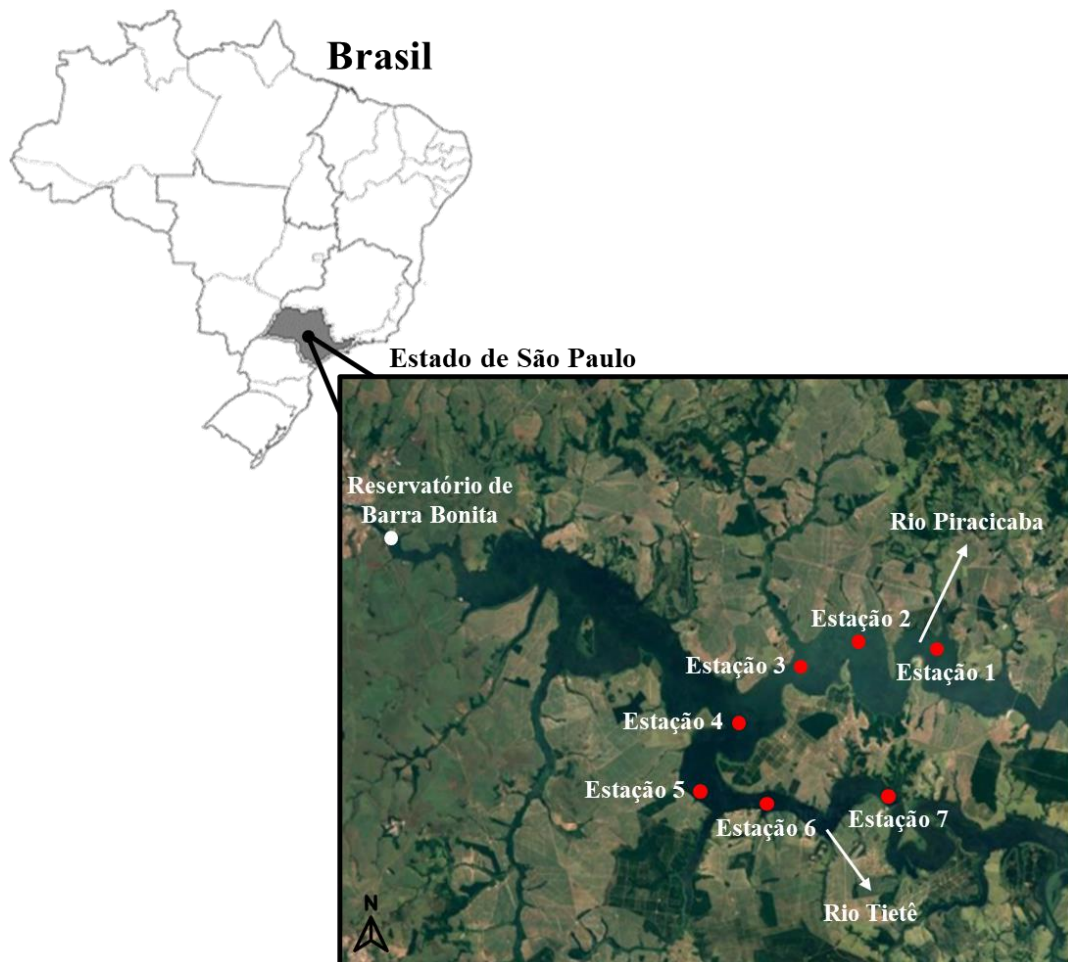
Ambos os rios recebem alto grau de compostos orgânicos, porém o Rio Tietê é mais eutrofizado do que o Rio Piracicaba, porque ele recebe uma maior carga de resíduos domésticos e industriais (DE MORAIS *et al.*, 2021a, 2021b; DOS SANTOS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2020). Em 2017, o ano da coleta das amostras estudadas, o Médio Tietê teve uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 33.636 t dia<sup>-1</sup> (CETESB, 2018). Antes de chegar ao reservatório, o Rio Tietê atravessa a região metropolitana de São Paulo (Bacia do Alto Tietê), que possui uma alta densidade populacional e apresentou DBO de 612.069 t dia<sup>-1</sup>. Isso representa 57% da DBO do Rio Tietê. Em comparação, a Bacia do Piracicaba teve um DBO de

94.818 t dia<sup>-1</sup> (CETESB, 2018). Segundo a CETESB, os cursos de ambos os corpos aquáticos estão situados em áreas industriais marcadas por alta densidade demográfica e intenso uso do solo (CETESB, 2018). Porém, em relação ao curso do Médio Tietê, o seu descumprimento dos padrões de qualidade da água gira em torno de 100% devido ao lançamento de esgoto não tratado neste trecho do Rio Tietê (CETESB, 2018).

## 2.2 Amostragem dos sedimentos

Os testemunhos de sedimentos foram coletados em sete pontos (Figura 1): três no Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3), um na região de confluência (estação 4) e três no Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) (DE MORAIS *et al.*, 2021b). Os pontos de coleta foram georreferenciados utilizando uma unidade GPS Trimble Navigation e as coordenadas geográficas são mostradas na Tabela 1; a amostragem ocorreu em 25 de julho de 2017 (inverno austral).

Figura 1 – Localização do reservatório de Barra Bonita (ponto branco) e estações de coleta das amostras de sedimentos (pontos vermelhos).



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas de cada estação de coleta.

<b>Pontos de coleta</b>	<b>Tributário</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	
Estação 1	Rio Piracicaba	22°35'55.5"S	48°13'02.8"W
Estação 2	Rio Piracicaba	22°35'36.9"S	48°16'00.0"W
Estação 3	Rio Piracicaba	22°36'01.8"S	48°17'53.5"W
Estação 4	Região de confluência	22°37'51.6"S	48°20'29.2"W
Estação 5	Rio Tietê	22°39'58.2"S	48°21'49.4"W
Estação 6	Rio Tietê	22°40'11.0"S	48°19'26.4"W
Estação 7	Rio Tietê	22°40'24.7"S	48°15'05.3"W

Fonte: Autoria própria.

As amostras de sedimento foram coletadas com o auxílio de um coletor de testemunho por gravidade (Figura 2), o qual possibilita manter a disposição original das camadas sedimentares. O fatiamento horizontal foi realizado no mesmo momento da coleta das amostras, em diferentes tamanhos (Tabela 2) sob atmosfera normal ao longo dos núcleos do sedimento sem retirar a água intersticial, totalizando 69 camadas de amostra. As amostras de sedimento foram imediatamente acondicionadas em frascos de polipropileno e mantidas em caixa térmica durante o transporte para o laboratório para reduzir ao máximo a evolução química e biológica das amostras. As amostras de sedimentos foram congeladas, liofilizadas (L101, Liotop), trituradas em moinho automático de almofariz (RM 200, Retsch) e peneiradas à 100-mesh.



Figura 2 – Testemunho de sedimentos coletado utilizando um coletor de testemunho por gravidade.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Profundidade de cada camada do testemunhos de sedimento.

Profundidade (cm)						
Estação 1	Estação 2	Estação 3	Estação 4	Estação 5	Estação 6	Estação 7
0 - 10	0 - 5	0 - 10	0 - 10	0 - 10	0 - 10	0 - 10
10 - 20	5 - 10	10 - 15	20 - 20	10 - 20	10 - 20	10 - 20
20 - 25	10 - 15	15 - 20	20 - 30	20 - 25	20 - 22	20 - 30
25 - 30	15 - 20	20 - 25	30 - 35	25 - 30	22 - 24	30 - 35
30 - 35	20 - 25	25 - 30	35 - 40	30 - 35	24 - 26	35 - 40
35 - 40	25 - 27	30 - 32	40 - 45	35 - 40	26 - 28	40 - 45
40 - 42	27 - 29	32 - 34	45 - 50	40 - 42	28 - 30	45 - 50
42 - 44	29 - 31	34 - 36	50 - 55	42 - 44	32 - 32	50 - 52
44 - 46	31 - 33	36 - 38	55 - 60	44 - 46	32 - 34	52 - 54
46 - 48	33 - 35	-	60 - 62	46 - 48	-	54 - 59
-	-	-	62 - 67	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

## **CAPÍTULO 3 – ANÁLISE ELEMENTAR DE SEDIMENTOS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER**

### **3.1 Revisão bibliográfica**

#### **3.1.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser**

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) é uma técnica espectroanalítica que permite análise direta, rápida, simultânea, multielementar, de baixo custo analítico e ambientalmente limpa, que requer pouco ou nenhum uso de reagentes para o preparo da amostra; e devido essas vantagens vêm conquistando cada vez mais espaço, principalmente nas duas últimas décadas (PASQUINI *et al.*, 2007). O desenvolvimento da técnica LIBS está intimamente relacionado com a evolução das fontes de laser de alta intensidade (RADZIEMSKI, L.; CREMERS, 2013; RADZIEMSKI, 2002), uma vez que a LIBS é uma técnica de espectroscopia de emissão óptica que usa um plasma gerado por laser para vaporizar, atomizar e excitar os analitos.

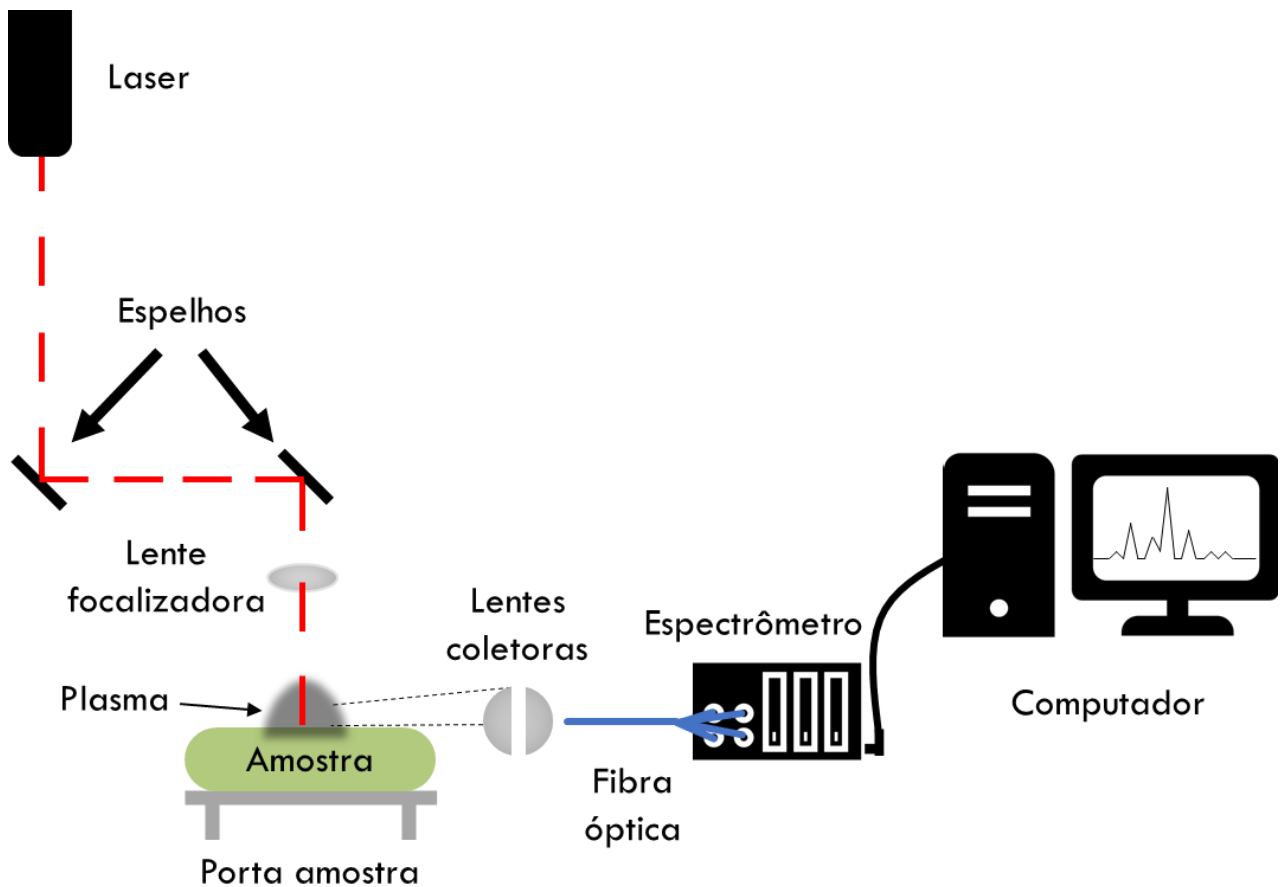
O laser é constituído basicamente por três partes: (i) o meio ativo, o qual pode ser sólido, líquido ou gasoso e contém átomos ou moléculas que possuem elétrons que por meio dos saltos de níveis de energia emitem fótons que constituem a luz laser; (ii) a fonte externa, cuja função é produzir estados excitados no meio ativo; e (iii) a cavidade óptica, cuja função é fazer com que os fótons que surgem do sistema voltem para ele, produzindo mais emissão estimulada. A luz do laser decorre da emissão estimulada da radiação, processo pelo qual um elétron presente no meio ativo ao ser excitado por ação de um fóton externo, retorna ao estado de menor energia, emitindo um fóton idêntico ao que desencadeou a emissão. Esses dois fótons idênticos perturbam outros átomos com elétrons em seus estados excitados, fazendo com que haja a emissão de mais fótons que se juntam aos iniciais. Os fótons que surgiram do sistema são amplificados por meio do uso de espelhos, que são colocados em cada extremidade da cavidade óptica, produzindo mais emissão estimulada, e conseqüentemente aumentando a quantidade de luz que sairá do laser (BAGNATO, 2001).

Os lasers de estado sólido, em particular, lasers pulsados Nd:YAG com flashlamp, Q-Switched e larguras de pulso na faixa de 6 a 15 ns são normalmente usados para medidas LIBS (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). O Q-switched concentra a liberação da luz em um curto espaço de tempo, conferindo maior energia aos lasers pulsados. O laser Q-switched tem a capacidade de produzir altas densidades de potência focalizada a partir de um único pulso de curta duração (micro, nano ou femtossegundos) para iniciar a quebra e produzir um plasma de laser analiticamente útil (MUSAZZI; PERINI, 2014).

### 3.1.1.1 Instrumentação LIBS

Um sistema LIBS é constituído basicamente por um laser pulsado de alta energia, que tem o feixe direcionado e focalizado na superfície da amostra por meio de espelhos e lentes, respectivamente. Quando o laser interage com a superfície da amostra parte da amostra é ablacionada, vaporizada e um plasma de alta temperatura é gerado. No plasma as espécies elementares (atômicas ou iônicas) e moleculares são excitadas e à medida que o plasma resfria as espécies excitadas ao retornarem para o estado de menor energia emitem radiação eletromagnética que é característica de cada elemento, íons e moléculas ali presentes. Esta luz é coletada por lentes e direcionada por meio de fibras ópticas a um espectrômetro para ser detectada em seguida. De acordo com os limites de detecção da técnica LIBS, as linhas de emissão dos componentes elementares da amostra são registradas em um espectro após um único pulso do laser (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). Para exemplificar, na Figura 3 é mostrado um esquema da configuração de um sistema LIBS.

Figura 3 – Esquema geral de um sistema LIBS.



Fonte: Adaptado de Miziolek, Palleschi e Schechter (2006).

### 3.1.1.2 Ablação a laser, formação e evolução do plasma

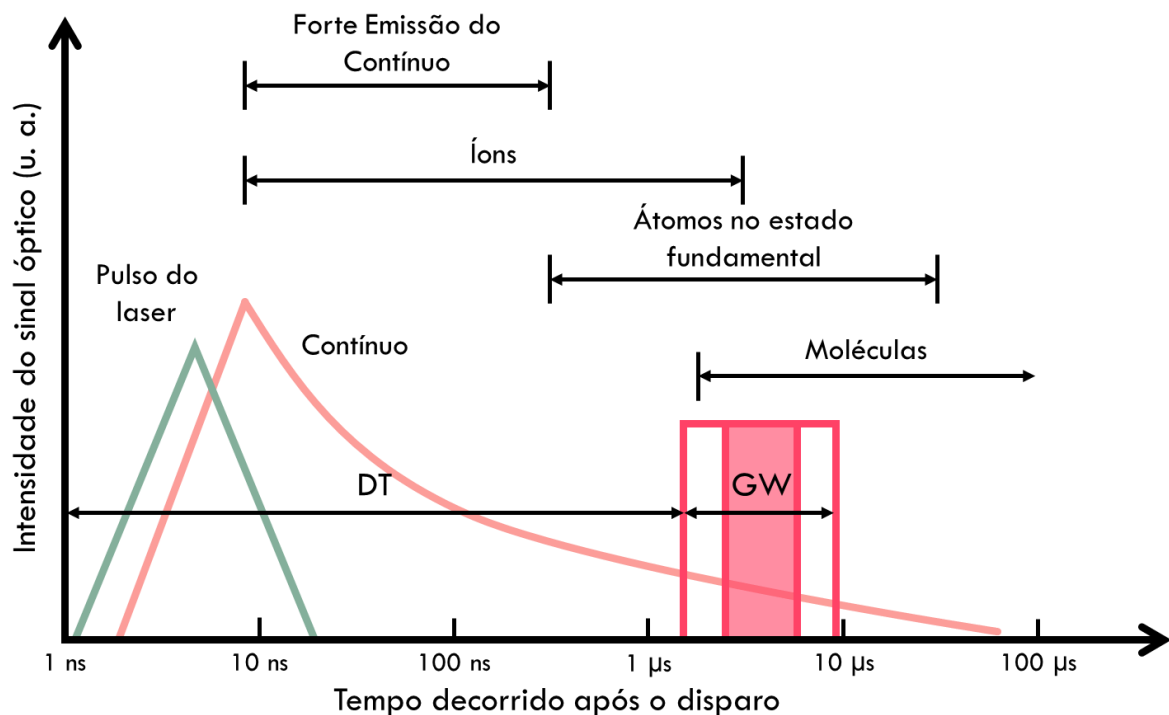
O processo de amostragem da técnica LIBS quando aplicada a amostras sólidas ou líquidas é denominado ablação. Esse fenômeno ocorre quando um pulso de laser de alta potência interage com a superfície da amostra e a irradiação no ponto focal remove parte do material (HAHN; OMENETTO, 2010; PASQUINI *et al.*, 2007). O material ablado comprime a atmosfera circundante e leva à formação de uma onda de choque. Durante este processo, muitos fenômenos ocorrem, como o aquecimento local rápido, derretimento e evaporação intensa. Antes da formação do plasma, ocorre a ruptura dielétrica das ligações moleculares do material, este fenômeno é chamado *breakdown* e envolve propriedades intrínsecas da amostra, tais como elasticidade e compressibilidade. Em seguida, o material evaporado expande-se sob a forma de uma pluma acima da superfície da amostra e devido à elevada temperatura no foco do laser e na superfície da amostra, um plasma de temperatura maior que  $10^4$  K é formado (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013).

A geração e o aumento de elétrons antes da formação do plasma se dão principalmente por dois mecanismos: o *bremsstrahlung* inverso e a ionização por multifótons, sendo um ou outro favorecido dependendo das condições em que as análises acontecem. O *bremsstrahlung* inverso envolve a absorção de fótons do laser incidente pelos elétrons livres presentes no vapor quente de maneira contínua durante o pulso de laser. Os elétrons ganham energia suficiente, podendo ionizar átomos ou moléculas adicionais presentes no vapor da amostra por colisão. Os novos elétrons por sua vez absorvem mais fótons durante o pulso, de modo que a concentração de elétrons aumentará exponencialmente com o tempo devido a avalanche eletrônica (MOLL *et al.*, 2012). A ionização por multifótons envolve a absorção simultânea de um número suficiente de fótons por um átomo ou molécula para causar sua ionização (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). O crescimento em cascata da densidade de elétrons (*bremsstrahlung* inverso) é mais favorável para lasers de comprimento de onda maiores (CABALIN; LASERNA, 1998), enquanto a ionização por multifótons desempenha um papel importante para lasers de comprimento de onda menores (SINGH; THANKUR, 2007). Tanto o *bremsstrahlung* inverso quanto a ionização por multifótons requerem altas irradiâncias do laser, na faixa típica de  $10^6$  a  $10^9$  W cm<sup>-2</sup> e esse limite depende do material analisado. Então, ocorre a formação do plasma quando a intensidade do laser excede esse valor, que é facilmente atingido pela focalização adequada do feixe de laser (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006). No plasma formado contém elétrons, íons, moléculas diatômicas e espécies neutras, bem como espécies excitadas da matéria ablacionada, cuja emissão de luz

constitui o sinal analítico medido pela LIBS. E por fim, ocorre o resfriamento da pluma e a extinção do plasma.

Em LIBS, a emissão proveniente do plasma evolui rapidamente com o tempo, como mostrada na Figura 4. Onde, DT (do inglês *delay time*) é o tempo de atraso desde a iniciação do laser até a abertura da janela de integração (GW do inglês *gate width*), que é o intervalo de tempo que o sinal é coletado. Nos primeiros momentos a ionização é alta, e o espectro é caracterizado pela intensa emissão de radiação do contínuo e de espécies iônicas excitadas, neste momento não é possível obter informações sobre os elementos presentes na amostra. O contínuo é a “luz branca” emitida pelo plasma e ocorre devido aos eventos de *bremsstrahlung* e recombinação. No processo de *bremsstrahlung* os fótons são emitidos por elétrons acelerados em colisões ou desacelerados, os quais perdem energia cinética convertendo-a em radiação eletromagnética. À medida que a recombinação de elétrons-íons prossegue, formam-se átomos neutros e, em seguida, moléculas. O plasma resfria, resultando no decaimento do contínuo e o aparecimento de linhas espectrais, que são caracterizadas pela radiação emitida por átomos neutros e moléculas simples, que possibilita extrair informações qualitativas e quantitativas a respeito da amostra (CREMERS; RADZIEMSKI, 2013; MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006).

Figura 4 – Esquema temporal da evolução de um plasma induzido por laser.



Fonte: Adaptado de Miziolek, Palleschi e Schechter (2006).

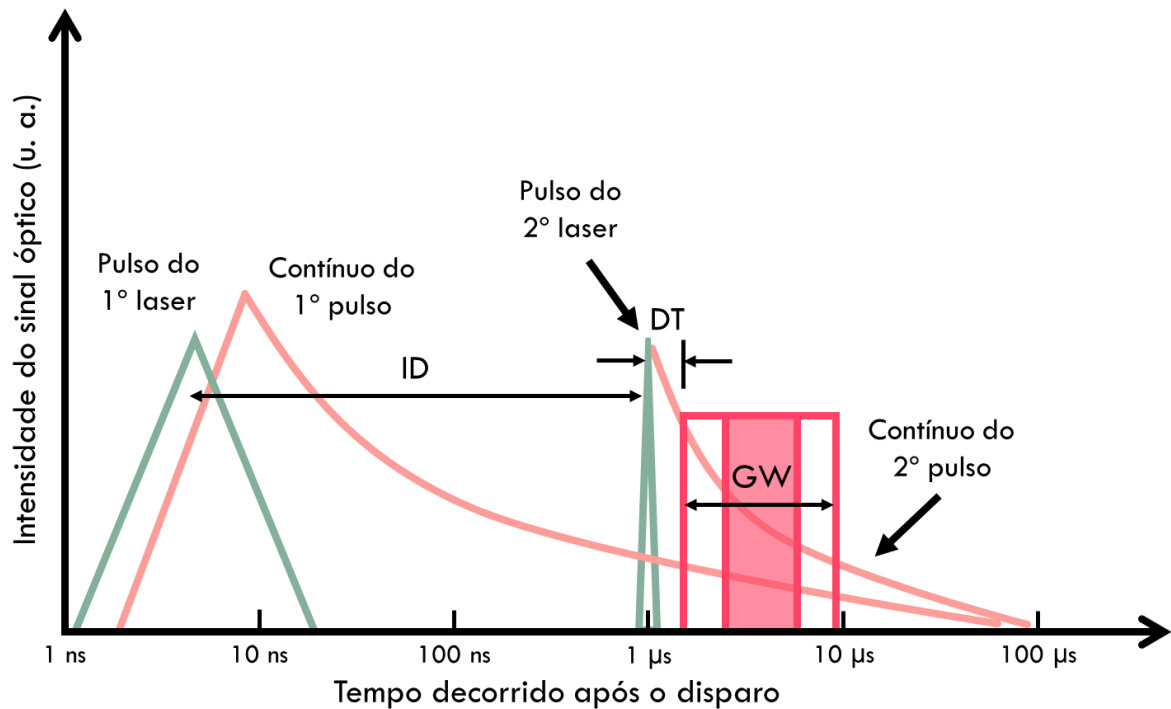
### 3.1.1.3 LIBS com pulso duplo

As flutuações no plasma quando acentuadas pelo efeito de matriz dificultam a obtenção de padrões adequados para a construção de uma curva de calibração, além disso provocam baixa precisão e conseqüentemente altos limites de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), quando comparados aos obtidos por técnicas espectrométricas clássicas (SINGH; THANKUR, 2007). A sensibilidade da SP LIBS pode ser aumentada usando diferentes tipos de configurações experimentais, como DP LIBS (NICOLODELLI *et al.*, 2015, 2017), LIBS com aprimoramento ressonante (GOUEGUEL *et al.*, 2010; NICOLODELLI *et al.*, 2018), LIBS com aprimoramento micro-ondas (LIU, Y.; BAUDELET; RICHARDSON, 2010), LIBS com descarga elétrica (VIEIRA *et al.*, 2018; NASSEF; ELSAYED-ALI, 2005), confinamento espacial do plasma induzido por laser (POPOV; COLAO; FANTONI, 2010) e o uso de micro tocha (LIU, *et al.*, 2015). Além de técnicas instrumentais para melhorar a sensibilidade da LIBS, estratégias envolvendo o pré-tratamento de amostras têm sido utilizadas, como a deposição de nanopartículas sobre as amostras (DE GIACOMO *et al.*, 2013) e a adição de um sal contendo elementos facilmente ionizáveis (DE MORAIS *et al.*, 2018).

Dentre as configurações experimentais utilizadas para diminuir o valor do LOD, DP LIBS provou ser muito eficaz na melhoria do desempenho da LIBS, oferecendo uma alta flexibilidade na escolha do comprimento de onda, largura de pulso e sequência de pulso. Alguns trabalhos (BELDJILALI *et al.*, 2011; SCAFFIDI; ANGEL; CREMERS, 2006) associam o aumento do sinal ao aumento significativo nos valores de temperatura e densidade eletrônica do plasma comparando a DP LIBS com a SP LIBS. Outros trabalhos (DIWAKAR *et al.*, 2013; NICOLODELLI *et al.*, 2016) associam o aumento na sensibilidade com a maior ablação da amostra, o que aumenta o número de partículas no plasma aumentando o seu volume. Já alguns trabalhos (CORSI *et al.*, 2006; NICOLODELLI *et al.*, 2015; SENESI *et al.*, 2009) associam o aumento da sensibilidade a maior ablação e ao aquecimento da pluma. Devido às diferentes condições experimentais é provável que a melhoria na sensibilidade seja resultado da combinação desses fatores e não devido a uma única causa.

Na DP LIBS, o segundo pulso de laser re-excita a região onde o plasma foi gerado pelo primeiro pulso de laser e o tempo de atraso entre os pulsos (ID, do inglês *inter-pulse delay*) pode variar de algumas centenas de nanossegundos a microssegundos (DIWAKAR *et al.*, 2013). O tempo entre dois pulsos é mostrado na Figura 5, onde ID é a diferença temporal entre a chegada dos dois pulsos na amostra, DT é o tempo de atraso do segundo pulso de laser até a abertura da janela de integração e GW é o intervalo de tempo que o sinal será coletado (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006).

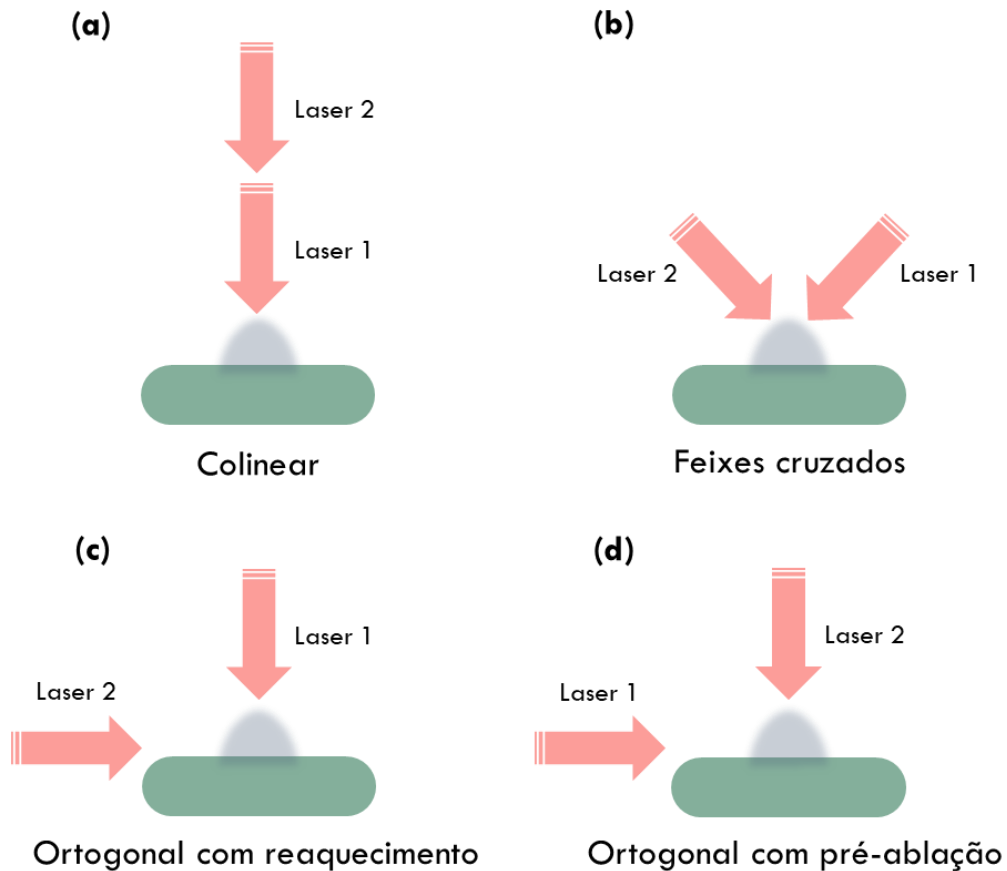
Figura 5 – Esquema temporal da evolução de um plasma LIBS quando dois pulsos de laser são usados.



Fonte: Adaptado de Miziolek, Palleschi e Schechter (2006).

A Figura 6 mostra os quatro arranjos geométricos mais comuns da irradiação de pulso duplo: (i) colinear: ambos os feixes de laser se propagam ao longo do mesmo eixo, ortogonal à amostra; (ii) feixes cruzados: dois feixes de laser coincidem na superfície da amostra fazendo um determinado ângulo entre si; (iii) ortogonal com reaquecimento: o primeiro pulso de laser incide perpendicular à superfície da amostra, e o segundo pulso de laser incide paralelo à superfície da amostra para reaquecer o plasma produzido pelo primeiro laser; (iv) ortogonal de pré-ablação: o primeiro pulso de laser incide paralelo à superfície da amostra para promover a quebras eletrônicas no ar gerando um plasma e não interagindo diretamente com a amostra, e o segundo pulso de laser incide perpendicular à superfície da amostra para ablação;

Figura 6 – Configurações geométricas mais comuns usadas para DP LIBS: colinear (a), feixes cruzados (b), ortogonal com reaquecimento (c) e ortogonal com pré-ablação (d).



Fonte: Adaptado de Rashid *et al.* (2011).

#### 3.1.1.4 Planejamento de experimentos

Na LIBS, a precisão das medidas é afetada pelos efeitos da matriz (SINGH; THANKUR, 2007), pela intensidade de emissão do laser de nanossegundos e pela interação não linear entre o laser de nanossegundos e a matriz da amostra (NOLL, 2012). Uma das formas de contornar essa limitação é obter dezenas ou centenas de espectros distribuídos em diferentes regiões da amostra, para obter uma análise representativa, diminuir os efeitos da matriz e aumentar a precisão das medidas (MUSAZZI; PERINI, 2014). Alguns parâmetros instrumentais que afetam o plasma, como pulsos acumulados (CASTLE *et al.*, 1998; GONDAL *et al.*, 2007), o comprimento de onda (HAHN; OMENETTO, 2010) e energia dos lasers de nanossegundos (SINGH; THANKUR, 2007; VADILLO *et al.*, 1999), e os parâmetros temporais, como DT e GW (CIUCCI *et al.*, 1996) são importantes variáveis na otimização da relação sinal-ruído (S/N, do inglês *signal-to-noise*) da linha de emissão, com seus valores ideais variando de acordo com a composição da amostra. Na DP LIBS, o ID é um fator particularmente



importante a ser considerado para melhorar a emissão do plasma formado (NAKAMURA *et al.*, 1996).

O DOE é uma metodologia baseada na teoria matemática e estatística que é utilizada para planejar e conduzir experimentos por meio da análise e interpretação dos dados obtidos nos experimentos. O DOE permite que variáveis de entrada sejam manipuladas para investigar seus efeitos na variável de resposta medida (DURAKOVIC, 2017). Quando há muitos fatores a serem otimizados, é necessário selecionar as variáveis que têm os maiores efeitos.

Os planejamentos fatoriais fracionados podem ser usados para realizar a triagem de fatores (ATKINSON; DONEV; TOBIAS, 2007), mas como eles permitem apenas o ajuste de modelos de primeira ordem, outro DOE é necessário para detectar a curvatura. Um DOE de três níveis (planejamento fatorial de  $3^k$ ) é frequentemente executado para se ajustar a um modelo de segunda ordem, mas conforme o número de fatores aumenta, ele se torna ineficiente e impraticável, portanto, um delineamento composto central (DCC) pode ser usado em seu lugar. O DCC é uma fração do planejamento fatorial de  $3^k$ , mas não usa graus de liberdade desnecessários, o que aumentaria o custo do experimento (MASON; GUNST; HESS, 2003). A principal vantagem de adotar uma estratégia DOE, ao invés de testar todas as diferentes combinações de parâmetros experimentais, consiste em evidenciar efeitos interativos entre múltiplos parâmetros, reduzindo tempo e custos de análise (YU *et al.*, 2019).

A abordagem DOE tem sido combinada com LIBS para definir os parâmetros analíticos mais apropriados. Por exemplo, um planejamento fatorial foi usado com sucesso para otimizar os parâmetros instrumentais de análise de amostras de cana-de-açúcar (ROMERA; BARSANELLI; PEREIRA, 2016) e farinha de mandioca (COSTA *et al.*, 2018), planejamento fatorial fracionado para amostras de fertilizantes (ANDRADE; PEREIRA-FILHO, 2016) e DCC para solos (COSTA *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2019). No entanto, nenhum estudo utilizou o DOE para otimizar os parâmetros instrumentais em LIBS considerando a SP LIBS com diferentes lasers e a configuração DP LIBS para amostras complexas como sedimentos, cujos efeitos de matriz são aumentados pelo fato de apresentarem características diferentes em termos de textura, granulometria (teores de areia, silte e argila) e composição química (HAN *et al.*, 2018). Desse modo, a LIBS combinado com DOE tem grande potencial para aplicações envolvendo sedimentos.

### **3.1.1.5 Calibração em LIBS**

A técnica LIBS foi aplicada para investigar as composições elementares de sedimentos marinhos (BARBINI *et al.*, 2002; LAZIC *et al.*, 2001, 2007), de rios (AUSTRIA *et al.*, 2017)

e de mineração (AUSTRIA; NUESCA; LAMORENA, 2018). No entanto esse tipo de análise não é comum e requer um esforço considerável frente às dificuldades para preparação e obtenção de padrões de calibração sólidos com propriedades certificadas para massas de amostra da ordem de  $\mu\text{g}$  (COSTA *et al.*, 2019). Além disso, a principal dificuldade em análises quantitativas de sedimentos empregando a LIBS derivam dos severos efeitos de matriz, dificultando o seu uso em análises de rotina (HAN *et al.*, 2018).

Foram reportadas na literatura científica algumas possibilidades que podem minimizar eventuais efeitos de matriz em análises quantitativas por LIBS (ANDRADE; PEREIRA-FILHO; AMARASIRIWARDENA, 2021; MACHADO *et al.*, 2020). Dentre essas possibilidades, destaca-se o uso de diferentes tratamentos espectrais (CASTRO; PEREIRA-FILHO, 2016), o uso de padrão interno e primeira derivada (DE MORAIS *et al.*, 2017).

O uso de diferentes estratégias de calibração também é utilizado para contornar os efeitos de matrizes. As principais estratégias de calibração empregadas em LIBS são: (i) calibração univariada: compatibilização de matriz (CM), padronização interna (PI), calibração livre e a adição de padrão; (iii) calibração multivariada: redes neurais artificiais, regressão por componentes principais (PCR), regressão linear múltipla (MLR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (COSTA *et al.*, 2020). Todas as estratégias de calibração apresentam vantagens e limitações e a escolha da melhor estratégia está diretamente relacionada com a capacidade do modelo de calibração de superar e/ou minimizar os efeitos da matriz para cada analito. Contudo, o uso da calibração univariada linear é preferida devido a sua simplicidade na proposição dos modelos.

A CM é a estratégia de calibração univariada mais empregada em LIBS. Os padrões de calibração podem ser obtidos através de um conjunto de materiais de referência certificados (CRMs) (FANTONI *et al.*, 2008), da diluição da amostra com concentrações conhecidas do analito (DE MORAIS *et al.*, 2017, 2018) e de conjunto de amostras com concentrações variadas do analito determinadas por um método de referência (DE MORAIS *et al.*, 2021b). Devido à semelhança entre as propriedades físico-químicas dos padrões de calibração e amostras, a CM minimiza os efeitos de matriz (BABOS *et al.*, 2019). Essa estratégia de calibração apresenta como limitações: (i) dificuldade de obtenção de CRMs com diferentes concentrações do analito e elevado custo dos CRMs; (ii) é necessário um grande conjunto de amostras para dividir em conjunto de calibração e validação; e (iii) algumas amostras sólidas são de difíceis preparo e análise pelas técnicas de referências (BABOS *et al.*, 2018, 2019).

A PI tem sido empregada para viabilizar a calibração univariada em LIBS, visto que essa estratégia minimiza os efeitos de matriz e corrige as flutuações do plasma e instrumentais

durante a aquisição dos espectros (DE MORAIS *et al.*, 2017). A curva de calibração é obtida através da razão do sinal do analito e o sinal do padrão interno. A escolha do padrão interno exige propriedades físico-químicas semelhantes entre o analito e concentração constante nas amostras e nos padrões de calibração (BABOS *et al.*, 2019). Em amostras sólidas, é difícil garantir que o padrão interno esteja homogeneamente distribuído nas amostras, e para tentar contornar esse inconveniente é necessário homogeneizar efetivamente a amostra sólida e obter uma quantidade apropriada de espectros por amostra.

Geralmente os modelos de calibração univariados empregados em LIBS, utilizam a regressão linear simples para estimar a relação entre uma variável independente e uma variável dependente, que normalmente correspondem à concentração e ao sinal analítico (intensidade de emissão), respectivamente. A escolha das variáveis independentes e dependentes é importante porque tem consequências estatísticas nos resultados de predição quando se utiliza uma regressão linear simples (DUPONCHEL *et al.*, 2020).

Em estatística, a calibração univariada relaciona duas variáveis  $x$  e  $y$  através de um modelo para prever uma variável da outra em uma segunda etapa. Esse tipo de calibração tem sido amplamente utilizada para a construção de modelos quantitativos para prever massa ou concentração absoluta a partir de uma medida instrumental que empregam técnicas espectroscópicas fotônicas. De acordo com a lei de Beer-Lambert, pode-se considerar uma relação linear entre  $x$  e  $y$  (Equação 1) (KRUTCHKOFF, 1967):

$$y = \beta_0 + x\beta_i + \varepsilon \quad (1)$$

Este modelo geralmente é usado em LIBS e é chamado de modelo direto (Figura 7a). Nesse modelo,  $x$  (a concentração do analito na amostra) é a variável independente, com  $i = 1$  até  $n$ ; e  $y$  (a intensidade da linha de emissão do analito em um determinado comprimento de onda) é a variável dependente, com  $i = 1$  até  $n$ .  $\beta_0$  e  $\beta_1$  são os parâmetros estimados do modelo, no qual a interseção  $\beta_0$  é o deslocamento da linha de base (coeficiente linear) e  $\beta_1$  é a absorvidade (coeficiente angular); e  $\varepsilon_i$  é o erro associado a  $i$ -ésima observação, cuja distribuição é  $N(0, \sigma^2)$ , ou seja, assume-se que  $\varepsilon$  sempre terá distribuição normal com média 0 e variância  $\sigma^2$ . Na regressão linear direta de  $y$  versus  $x$ , assume-se que as medidas de  $x$  são isentas de erros.

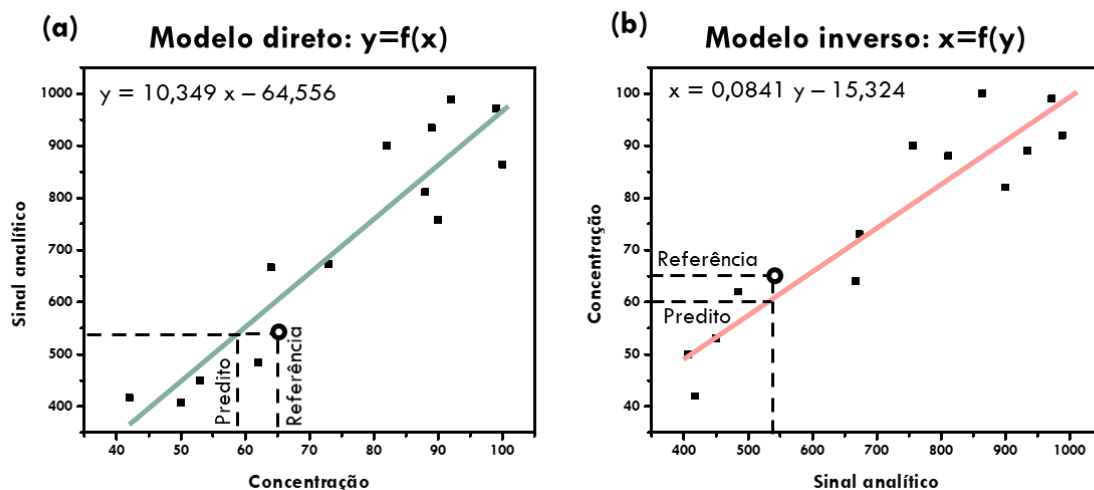
No modelo inverso (Figura 7b),  $x$  (a concentração do analito na amostra) é a variável dependente, com  $i = 1$  até  $n$  e  $y$  (a intensidade da linha de emissão do analito em um determinado comprimento de onda) é a variável independente, com  $i = 1$  até  $n$  (Equação 2). Na regressão

linear inversa de  $x$  sobre  $y$ , assume-se que as medidas de  $y$  são isentas de erros (Equação 2) (KRUTCHKOFF, 1967).

$$x = \beta'_0 + y\beta'_i + \varepsilon \quad (2)$$

No caso do modelo direto,  $x$  (concentração) é variável independente e  $y$  (sinal analítico) é a variável dependente (Figura 7a). Enquanto no modelo inverso,  $x$  (concentração) é variável dependente e  $y$  (sinal analítico) é a variável independente (Figura 7b). Notem que as equações da reta são diferentes e quando uma amostra teste é analisada as concentrações previstas são diferentes, isso mostra que a previsão da concentração do analito depende do modelo escolhido (DUPONCHEL *et al.*, 2020).

Figura 7 – Comparação da regressão direta (a) e inversa (b) no mesmo conjunto de dados de calibração.



Fonte: Adaptado de Duponchel *et al.* (2020).

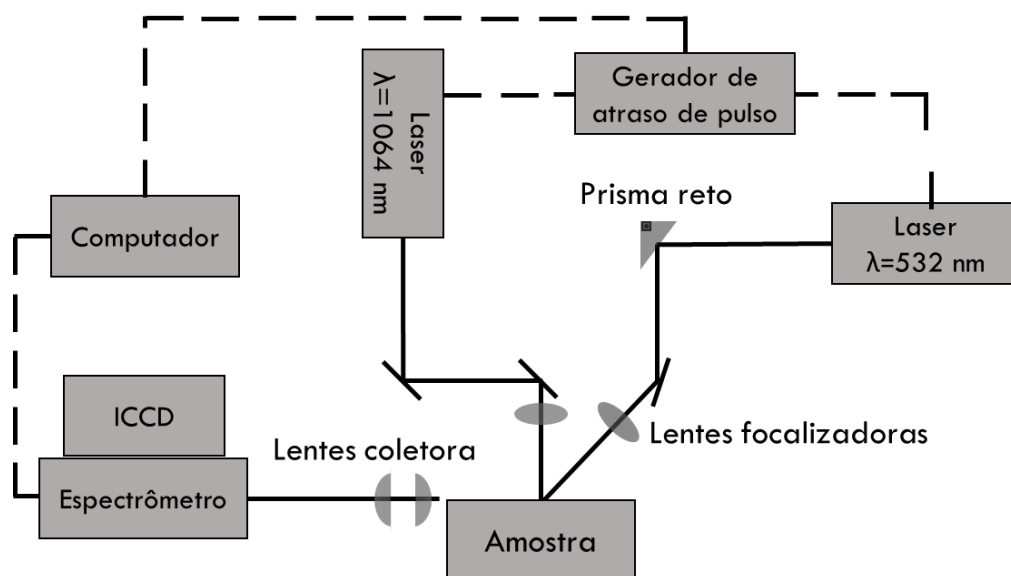
O método dos mínimos quadrados estima o valor dos parâmetros do modelo de forma a minimizar a soma de quadrados das  $n$  diferenças entre o valor da variável dependente e seu valor estimado. Assim, a minimização dos erros do modelo ocorrerá em função da variável que for especificada como dependente. Portanto, é interessante comparar a regressão direta e a inversa a fim de obter a estratégia de calibração mais precisa para o conjunto de dados considerado.

### 3.2 Procedimento experimental

#### 3.2.1 Instrumentação LIBS

O sistema LIBS utilizado neste trabalho foi montado em uma mesa óptica no laboratório de Óptica e Fotônica da Embrapa Instrumentação, São Carlos, Brasil. A Figura 8 mostra um diagrama de blocos do sistema, o qual é composto por dois lasers pulsados Nd:YAG (íons de  $\text{Nd}^{3+}$  em um cristal de YAG (granada de alumínio e ítrio)), e pode operar em dois modos diferentes: (i) SP LIBS com um laser emitindo em 1064 nm (Ultra, Quantel) atingindo a amostra em um ângulo de  $90^\circ$  ou com um laser emitindo em 532 nm (Brilliant, Quantel) atingindo a amostra em um ângulo de  $45^\circ$  e (ii) DP LIBS na geometria feixe cruzado, combinando os dois lasers de comprimento de onda diferente, com o primeiro pulso com o laser de 1064 nm e o segundo pulso com o laser de 532 nm, ou com o primeiro pulso com o laser de 532 nm e o segundo pulso com o laser de 1064 nm.

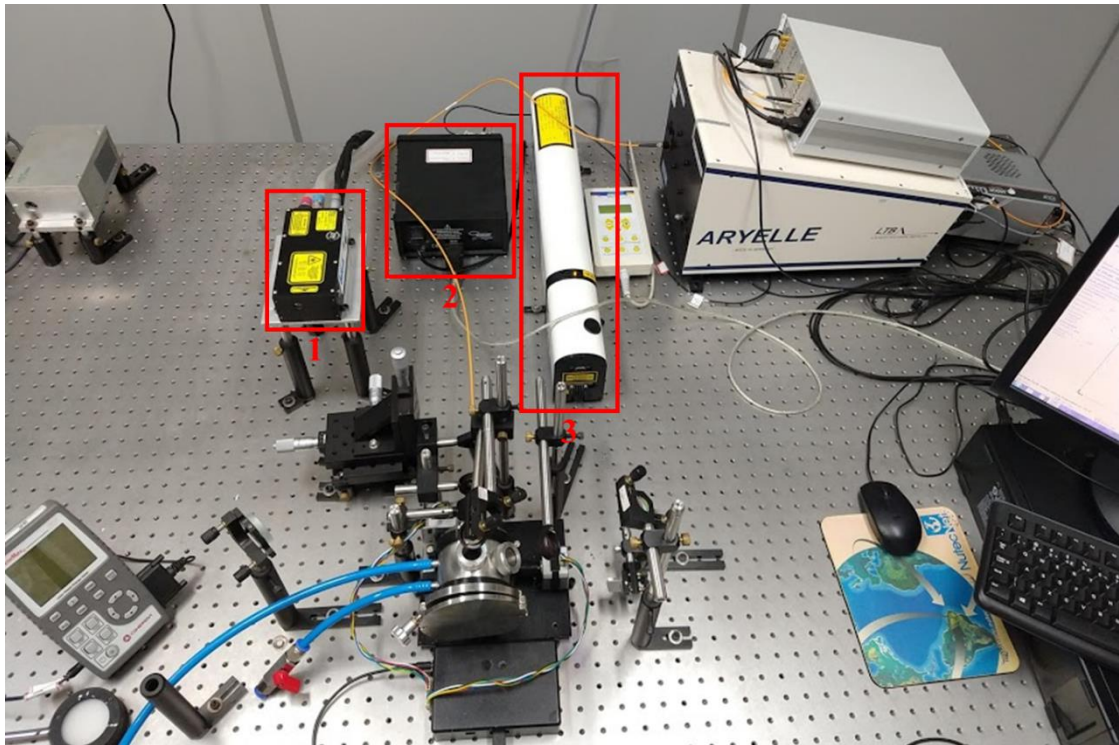
Figura 8 – Diagrama de blocos do sistema LIBS desenvolvido.



Fonte: Autoria própria.

O pulso de laser de 1064 nm tem energia máxima de 50 mJ, largura de 8 ns e taxa de repetição de 20 Hz, enquanto o pulso de laser de 532 nm tem energia máxima de 180 mJ, largura de 4 ns e taxa de repetição de 10 Hz, acoplado a um módulo gerador de segundo harmônico. No caso da SP LIBS, um gerador de atraso de pulso (modelo 9618, Quantum Composers) foi usado para o controle temporal do laser e do sistema de aquisição de dados, enquanto para DP LIBS, ele foi usado para o controle temporal dos dois lasers e o sistema de aquisição de dados (Figura 9).

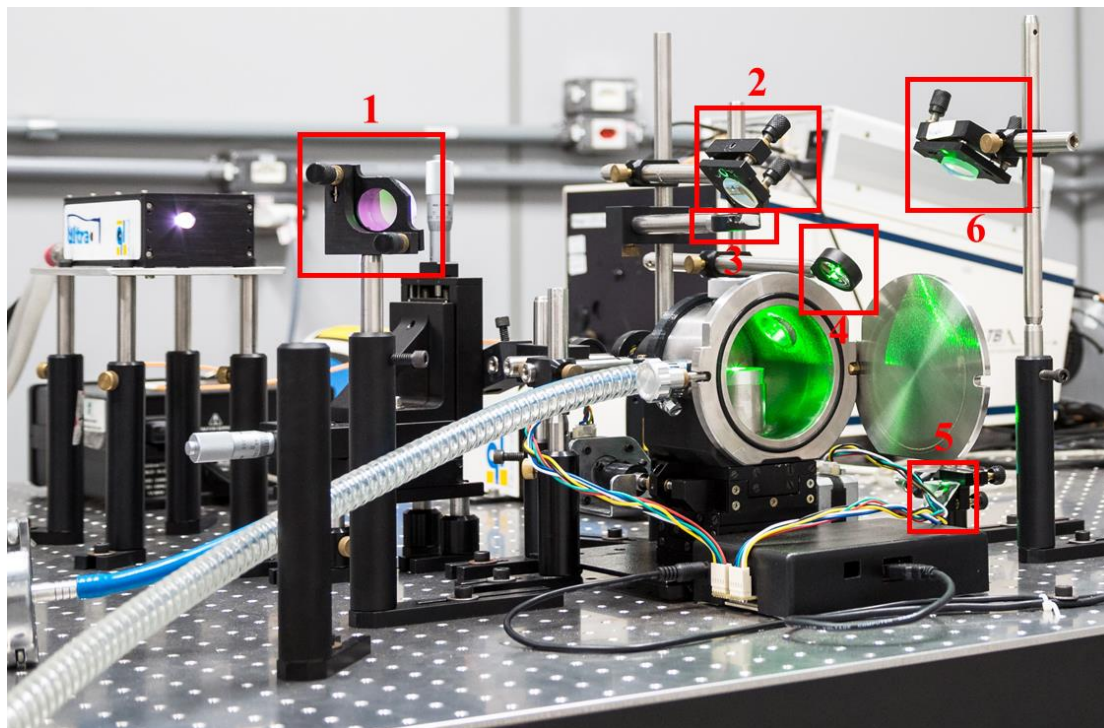
Figura 9 – Sistema LIBS montado na mesa óptica. (1) laser emitindo em 1064 nm; (2) laser emitindo em 532 nm; (3) gerador de atraso de pulso.



Fonte: Autoria própria.

Os feixes de laser foram direcionados para a superfície da amostra usando um número mínimo de componentes ópticos para evitar a perda da potência dos lasers. O feixe do laser emitindo em 1064 nm foi direcionado à amostra por meio de dois espelhos em comprimentos de onda apropriados (1064 nm) com diâmetro de 37,8 mm e 25,4 mm, respectivamente, e focalizado na superfície da amostra através de uma lente esférica N-BK7 plano-convexa com uma distância focal de 100 mm, diâmetro de 25,4 mm e revestimento antirreflexo. O feixe do laser emitindo em 532 nm foi direcionado à amostra por meio de um prisma reto e de um espelho em comprimento de onda apropriado (532 nm) com diâmetro de 25,4 mm e focalizado na superfície da amostra através de uma lente esférica N-BK7 plano-convexa com distância focal de 100 mm, diâmetro de 25,4 mm e sem revestimento antirreflexo (Figura 10).

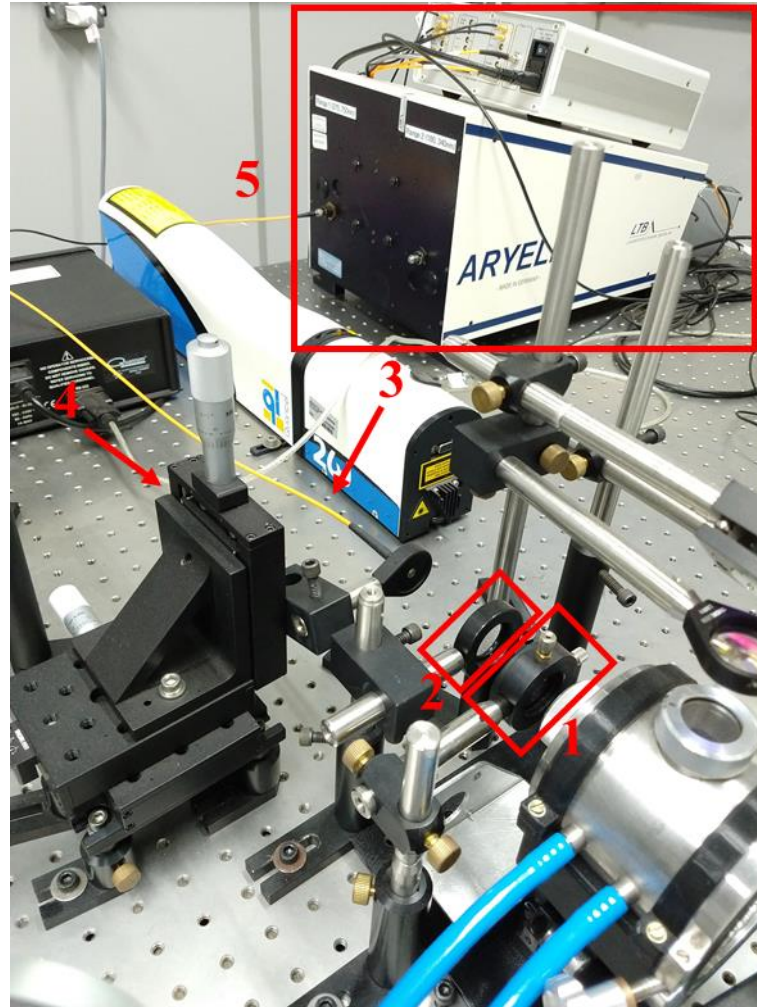
Figura 10 – Focalização dos lasers no sistema LIBS. (1) e (2) espelhos laser linha em 1064 nm; (3) lente N-BK7 plano-convexa com revestimento antirreflexo; (4) prisma reto; (5) espelho laser linha em 532 nm; (6) lente N-BK7 plano-convexa sem revestimento antirreflexo.



Fonte: Autoria própria.

A radiação emitida pelas espécies excitadas presentes no plasma foi coletada em ângulo raso por meio de um sistema telescópico composto por duas lentes esféricas de sílica fundida plano-convexas de diâmetro de 25,4 mm, sem revestimento antirreflexo e com distância focal de 70 mm e 50 mm, respectivamente. Um cabo de fibra óptica foi colocado logo antes do ponto focal do telescópio para garantir a máxima eficiência da luz coletada. Para o alinhamento óptico, a fibra óptica foi colocada em uma mesa de coordenadas XYZ, permitindo um ajuste com precisão de 1  $\mu\text{m}$ . Um espectrômetro echelle (Aryelle Butterfly 400, LTB) foi usado para detectar e selecionar os comprimentos de onda. O espectrômetro de alta resolução é equipado com um dispositivo de carga acoplado intensificado (ICCD, do inglês *intensified charge-coupled device*) com  $1024 \times 1024$  pixels, operado em duas bandas espectrais (175 a 330 e 275 a 750 nm, com resolução de 13 a 24 e 29 a 80 pm, respectivamente) (Figura 11).

Figura 11 – Coleta da radiação emitida pelas espécies excitadas no plasma. (1) e (2) lentes de sílica fundida plano-convexas sem revestimento antirreflexo, (3) cabo de fibra óptica, (4) mesa de coordenadas XYZ e (5) espectrômetro echelle.

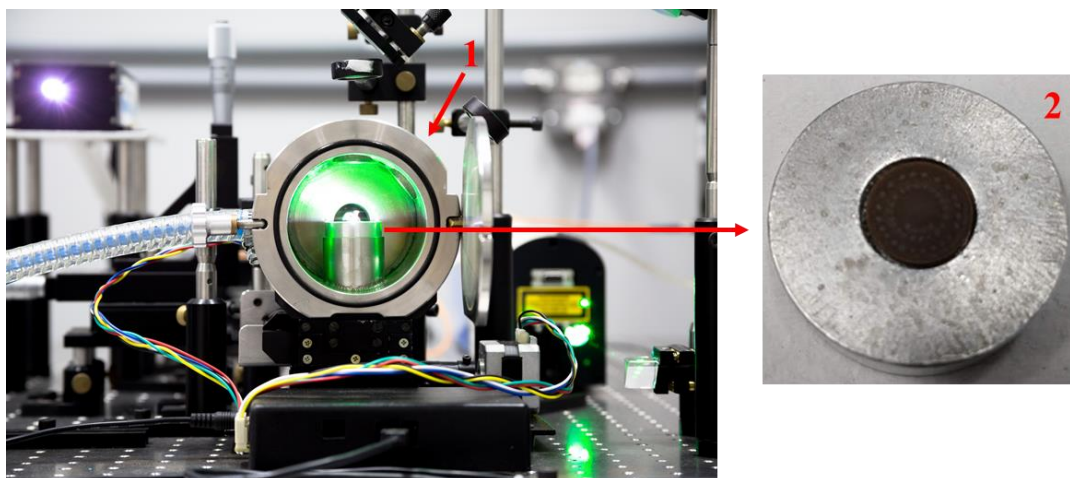


Fonte: Autoria própria.

Para as análises, as amostras foram colocadas em um porta-amostra, que por sua vez foi levado à uma câmara de ablação totalmente vedada com três acessos ópticos (janelas de sílica fundida). As análises foram conduzidas em atmosfera ambiente (Figura 12).



Figura 12 – Câmara de ablação do sistema LIBS. (1) câmara de ablação e (2) porta amostra.



Fonte: Autoria própria.

### 3.2.2 Otimização de parâmetros

#### 3.2.2.1 Amostra

Para a otimização dos parâmetros instrumentais da LIBS foi empregada a amostra de sedimento do Rio Piracicaba coletada na estação 3 a uma profundidade de 15 cm na camada de sedimento. Uma massa de 500 mg da amostra previamente moída como descrito na seção 2.2 foi compactada usando uma pressão de 5 toneladas por 1 min para obtenção de pastilhas de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Somente uma amostra foi avaliada porque o intuito era analisar apenas o efeito das variáveis instrumentais na resposta (obtenção de espectro LIBS).

#### 3.2.2.2 Reprodutibilidade espectral

Foi realizado um estudo para avaliar como o número de espectros afeta a precisão da relação S/N média por meio do método de simulação, que consiste na reamostragem de subamostras (DA SILVA; DO RÊGO; CECON, 2011; LEITE *et al.*, 2009). A amostra de sedimento escolhida foi analisada por SP LIBS, e os parâmetros instrumentais foram escolhidos aleatoriamente das corridas experimentais do DCC para SP LIBS com o laser de 1064 nm. Portanto, a energia do laser (LE) de 1064 nm foi fixada em 46 mJ, o DT em 0,5  $\mu$ s e a GW em 5  $\mu$ s. Um total de 61 espectros foram adquiridos para diferentes regiões da pastilha, com o número de pulsos acumulados (AP) fixado em 9.

Os espectros foram processados em um programa desenvolvido na linguagem de programação Python. Após a exclusão dos outliers, utilizando o produto escalar entre a média e cada espectro medido, a correção da linha de base foi realizada próximo a cada linha monitorada (Tabela 3) (MARANGONI *et al.*, 2016). A relação S/N para cada analito foi

calculada dividindo a intensidade máxima de cada linha de emissão (altura do pico) pelo desvio padrão do ruído adjacente à linha (HAHN; OMENETTO, 2012), resultando em 61 relações S/N. O programa R (versão 3.6.0) foi usado para estimar o intervalo de confiança (IC) de 95% para a relação S/N média dos 61 espectros. Subconjuntos aleatórios dos 61 espectros foram simulados, com tamanhos variando de 2 a 60 espectros. Para cada tamanho de subconjunto, 1000 amostras aleatórias foram simuladas.

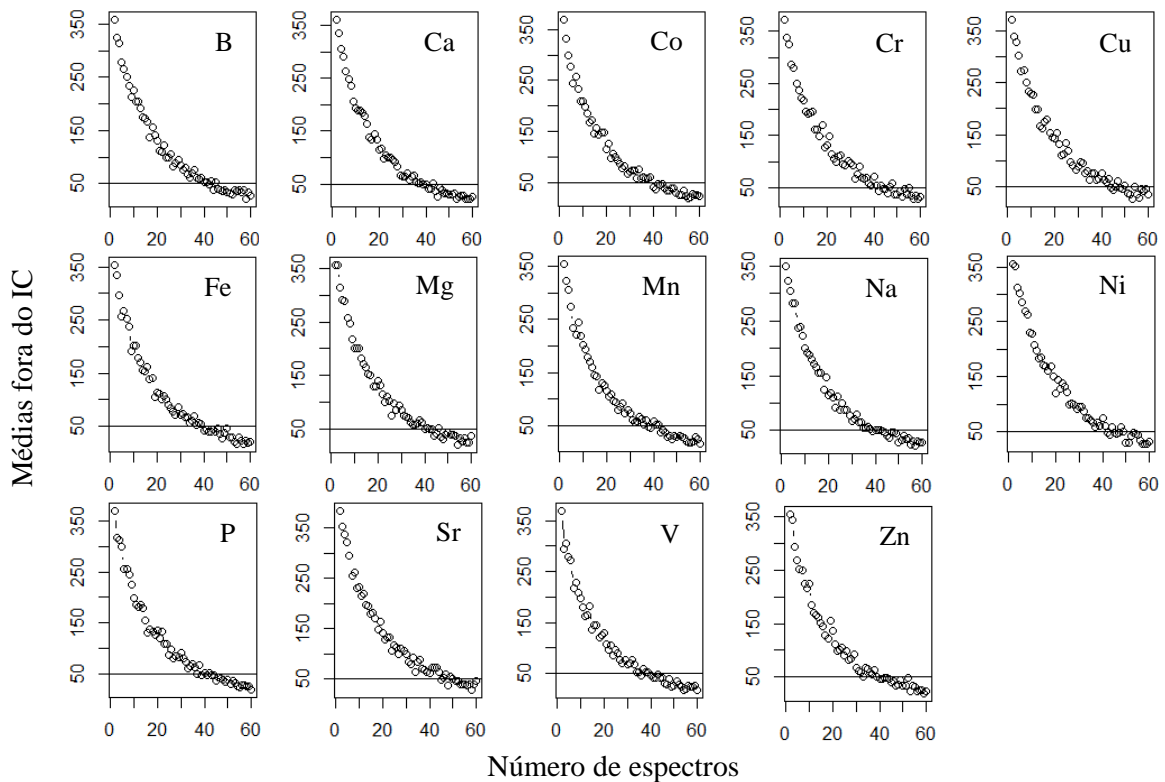
Tabela 3 – Linhas espectroscópicas de emissão atômica (I) e iônica (II) avaliadas.

<b>Elemento</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>
B I	249,77
Ca I	422,67
Co I	252,13
Cr I	359,35
Cu I	324,75
Fe I	259,93
Mg I	383,82
Mn I	403,44
Na I	588,99
Ni I	232,00
P I	214,91
Sr II	407,77
V I	437,92
Zn I	213,85

Fonte: Autoria própria.

Para cada analito, a média da relação S/N fora do IC de 95% em função do número de espectros para cada medida é mostrada na Figura 13. O aumento do número de espectros leva à média a variabilidade tiro a tiro dos dados LIBS, menos dados fora do IC de 95% (acima da linha horizontal), conseqüentemente, maior precisão da medida. De acordo com os resultados obtidos, são necessários de 40 a 45 espectros de cada amostra para garantir representatividade e aumentar a precisão das medidas, com o número de espectros variando de elemento a elemento.

Figura 13 – Média das razões S/N fora do IC de 95% para cada analito como função do número de espectros para cada medida.



Fonte: Autoria própria.

Quando o número de espectros por amostra aumenta, o tempo de análise também aumenta, por isso é essencial estabelecer uma quantidade de pulsos necessária para garantir a precisão desejada das medidas, sem perder a vantagem de análise rápida da técnica LIBS. O uso deste método permite a determinação do número de espectros necessários em cada medida, contornando os problemas de falta de homogeneidade de amostras sólidas e complexas, como sedimentos, e variáveis do plasma, que mudam de tiro a tiro, afetando a precisão da medida (MIZIOLEK; PALLESCHI; SCHECHTER, 2006; WACHTER; CREMERS, 1987). Com o objetivo de aumentar a precisão das medidas e superar os problemas de amostragem que afetam a reprodutibilidade espectral das análises LIBS, preservando as vantagens da técnica LIBS em permitir uma análise multielementar e rápida, o número de espectros foi fixado em 45 para a realização de todos os experimentos.

### 3.2.2.3 Planejamento de experimentos

#### 3.2.2.3.1 Delineamento composto central para SP LIBS

O DCC foi implementado para a otimização da relação S/N para todos os elementos avaliados (Tabela 3) na amostra de sedimento escolhida, com o objetivo de obter informações sobre os efeitos lineares, de interação e quadráticos, a fim de identificar uma condição adequada para a maioria dos elementos. Quatro fatores independentes que influenciam a análise LIBS foram selecionados para a otimização: (i) energia do laser (LE), (ii) tempo de atraso (DT), (iii) janela de integração (GW) e (iv) pulsos acumulados (AP). Esses fatores foram otimizados para o sistema SP LIBS operando com o laser de 1064 nm e com o laser de 532 nm.

O planejamento teve um total de  $N = k^2 + 2k + c_p$  corridas experimentais, onde  $k$  é o número de fatores e  $c_p$  é o número de repetições no ponto central. Neste trabalho, o número de corridas experimentais no ponto fatorial, axial e central foram 16, 8 e 2, respectivamente, então o  $N$  foi 26. O modelo DCC foi o seguinte (Equação 3) (MASON; GUNST; HESS, 2003):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

onde,  $y$  é a variável de resposta,  $\beta$  são os coeficientes de regressão do modelo,  $x$  é a variável independente e  $\varepsilon$  é o componente de erro aleatório. Os erros do modelo foram considerados uma variável aleatória, normal e independentemente distribuída, com média zero e variância constante  $\sigma^2$ .

Os limites superior e inferior dos fatores foram baseados em estudos anteriores (NICOLODELLI *et al.*, 2015, 2017). Como o modelo DCC usado era rotacional, a distância dos pontos axiais ao ponto central,  $\alpha$ , foi de  $\pm 2$ . Os valores dos fatores críticos foram calculados e estudados em cinco níveis ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ ). A escolha de  $\alpha$  depende de  $k$ , e pode ser calculada pela seguinte Equação 4 (MASON; GUNST; HESS, 2003):

$$\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}} \quad (4)$$

Para o sistema SP LIBS operando com o laser de 1064 nm, os níveis estudados para cada fator foram os seguintes: (i) LE (1064 nm) = 34, 37, 40, 43 e 46 mJ; (ii) DT = 0,2; 0,5; 0,9; 1,2 e 1,5  $\mu$ s; (iii) GW = 1, 5, 11, 16 e 20  $\mu$ s; e (iv) AP = 1, 3, 6, 8 e 10 pulsos. Os mesmos valores DT, GW e AP usados no experimento DCC para SP LIBS com o laser de 1064 nm foram usados para SP LIBS com o laser de 532 nm, com apenas os valores LE (532 nm) sendo

diferentes: 35, 47, 59, 71 e 83 mJ. Para cada corrida experimental, diferentes regiões da pastilha de amostra de sedimento foram utilizadas para adquirir o número mínimo de espectros que garantisse a representatividade da amostra.

### 3.2.2.3.2 Otimização de fatores para DP LIBS

A otimização da relação S/N para os mesmos analitos estudados usando SP LIBS (Tabela 3) foi realizada para a amostra de sedimento escolhida usando DP LIBS, combinando dois DOE, pois havia 6 fatores a serem otimizados. Primeiramente, dois planejamentos fatoriais fracionados  $2^{6-2}$  (fração de um quarto) foram implementados para DP LIBS na configuração de feixe cruzado, com diferentes sequências de laser (uma sequência foi de 1064 nm e depois de 532 nm, e a outra foi de 532 nm e depois de 1064 nm), para triagem a fim de descartar variáveis não significativas. Um DCC foi então executado para maximizar a resposta usando a melhor sequência de laser.

Os experimentos fatoriais fracionados  $2^{6-2}$  foram realizados para a triagem de seis fatores independentes que influenciam a análise usando DP LIBS: (i) LE (1064 nm), (ii) LE (532 nm), (iii) AP, (iv) GW, (v) atraso entre pulsos (ID) e (vi) DT. Este planejamento tem resolução IV, portanto, nenhum efeito principal são aliases com nenhum outro, mas as interações de 2 fatores são aliases com outras interações de 2 fatores. O número de corridas experimentais foi 16, mas duas corridas também foram realizadas no ponto central, a fim de estimar o erro experimental, então o número total de corridas foi 18. O modelo linear para os experimentos fatoriais fracionados foi o seguinte (Equação 5) (MASON; GUNST; HESS, 2003):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (5)$$

onde,  $y$  é a variável de resposta,  $\beta$  são os coeficientes de regressão do modelo,  $x$  é a variável independente e  $\varepsilon$  é o componente de erro aleatório. Os erros do modelo também foram considerados uma variável aleatória, normal e independentemente distribuída, com média zero e variância constante  $\sigma^2$ .

Estudos anteriores foram realizados para identificar os limites máximos e mínimos dos fatores (NICOLODELLI *et al.*, 2015, 2017). Os valores dos níveis inferior, intermediário e superior para os fatores foram os seguintes: (i) LE (1064 nm) = 34, 40 e 46 mJ; (ii) LE (532 nm) = 35, 47 e 59 mJ; (iii) AP = 5, 18 e 10 pulsos; (iv) GW = 5, 13 e 20  $\mu$ s; (v) ID = 0,2; 1,6 e

3,0  $\mu\text{s}$ ; e (vi) DT = 0,2; 0,7 e 1,2  $\mu\text{s}$ . Para cada corrida experimental, diferentes regiões da pastilha da amostra de sedimento foram utilizadas para adquirir o número mínimo de espectros que garantisse a representatividade.

O planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  realizado para o DP LIBS na configuração feixe cruzado com a melhor sequência de laser foi otimizado usando um DCC. Os três fatores independentes (GW, ID e DT) foram otimizados para obter informações sobre os efeitos linear, de interação e quadrático, identificando uma condição adequada para a maioria dos elementos. O número de corridas foi 17, incluindo 2 corridas no ponto central. De acordo com a Equação 4, a distância dos pontos axiais ao ponto central,  $\alpha$ , foi de 1,68. Os valores dos fatores críticos foram calculados e variaram entre os níveis superior e inferior, da seguinte forma: GW = 5, 8, 11, 17 e 20  $\mu\text{s}$ ; ID = 0,2; 0,8; 1,6; 2,4 e 3,0  $\mu\text{s}$ ; e DT = 0,2; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,2  $\mu\text{s}$ . Para cada corrida experimental, diferentes regiões da pastilha da amostra de sedimento foram utilizadas para adquirir o número mínimo de espectros que garantisse a representatividade da amostra.

### **3.2.2.3.3 Análise dos dados obtidos com DOE**

Os espectros foram analisados conforme descrito na seção 3.2.2.2. O coeficiente de variação (CV) de cada elemento foi calculado para todos os DOE realizados para avaliar a variabilidade dos dados e, assim, saber se a mudança nos valores dos fatores causa variação na resposta. Os modelos de regressão foram avaliados por análise de variância, utilizando o software R (versão 3.6.0). Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram calculados para os modelos e a importância relativa (RI, do inglês *relative importance*) para os componentes do modelo. O  $R^2$  é uma medida da qualidade de ajuste de um modelo, quando o valor de  $R^2$  é baixo, significa que pouca variação na resposta é atribuível à sua dependência dos fatores. Para modelos lineares, RI fornece uma decomposição da variação explicada do modelo em contribuições não negativas, calculadas com base na matriz de covariância (LINDEMAN; MERENDA; GOLD, 1980).

## **3.2.3 Determinação de fósforo total e elementos potencialmente tóxicos**

### **3.2.3.1 Análises por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada por meio da comparação dos teores de P, Cr, Cu e Ni determinados por LIBS com os teores determinados pelo método de referência. Para isso, foi feita a decomposição por via úmida das 69 amostras de sedimentos com aquecimento assistido por radiação micro-ondas e a determinação elementar por ICP OES.

Para a decomposição das amostras de sedimentos foi empregado o método EPA 3051A (USEPA, 2007). Neste procedimento massas de aproximadamente 200 mg das amostras previamente homogêneas como descrito na seção 2.2 foram pesadas com precisão, transferidas para os frascos fechados de decomposição de perfluoroalcoxi alcanos (PFA) e digeridas usando um forno de micro-ondas (Speedwave four, Berghof, Eningen, Alemanha) em triplicata, empregando 10,0 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (v/v) (Synth, Diadema, Brasil) destilados em um sistema de subdestilação Distillacid™ BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha) com aquecimento promovido por lâmpada infravermelho. O programa de aquecimento do forno micro-ondas utilizado consistiu em (i) 5 min para atingir 120 °C, (ii) permaneceu nessa temperatura por 5 min, (iii) 5 min para atingir 175 °C e (iv) permaneceu nessa temperatura por 10 min. A temperatura de cada frasco foi controlada por um sensor de temperatura desenvolvido e patenteado pela Berghof. A temperatura máxima dos frascos foi de, aproximadamente, 175 °C e o tempo para a digestão completa foi de 25 min. Após a finalização da etapa de aquecimento, foi conduzido o resfriamento até temperatura ambiente dos tubos em uma capela de exaustão de gases. Todos os procedimentos foram acompanhados de um branco analítico. Após a digestão e o resfriamento, as amostras e os brancos analíticos foram transferidos para frascos volumétricos de 50,0 mL, o volume foi completado com água deionizada e foram mantidos sob refrigeração até o momento da análise. Posteriormente, os digeridos foram diluídos 2,5 vezes com água deionizada para que a concentração do ácido ficasse dentro dos padrões do equipamento de análise (ICP OES).

A exatidão do método de referência foi avaliada utilizando os seguintes CRMs de solos: RTC-CRM 023-050, RTC-CRM 026-050, RTC-CRM 036-050, RTC-CRM 044-050, RTC-CRM 045-050, Montana II Soil - SRM 2711a e San Joaquin Soil - SRM 2709a, os quais foram preparados em triplicata pelo mesmo procedimento de decomposição descrito para as amostras de sedimentos.

As medidas de emissão atômica foram feitas utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado iCAP 6000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) com o plasma em visão axial, equipado com gerador de radiofrequência de 1,55 kW, policromador echelle com janela espectral na faixa de 166 nm a 847 nm e detector de estado sólido de alta performance CID86. O gás argônio (99,996%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado em todas as medidas. As condições de operação do plasma estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições operacionais para a determinação por ICP OES.

<b>Parâmetro instrumental</b>	<b>Condição de operação</b>
Tempo de integração (s)	15.0
Fluxo de introdução da amostra (mL min <sup>-1</sup> )	1.00
Tempo de estabilização da bomba (s)	5
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1.25
Fluxo do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0.5
Fluxo do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0.50
Fluxo de argônio (L min <sup>-1</sup> )	12
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Ciclônica
Linhas de emissão monitoradas (nm)	Cr 267,7; Cu 324,7; Ni 231,6; P 178,2;

Fonte: A autoria própria.

As soluções padrões utilizadas para calibração em ICP OES foram preparadas a partir da diluição de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cr, Cu, Ni e P. As concentrações das soluções utilizadas para obtenção das curvas analíticas de calibração foram de 0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 100,0 e 200 µg L<sup>-1</sup> para Cr e Ni, para Cu foi de 0; 0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100 mg L<sup>-1</sup> e P foi de 0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 100,0; 200; 500; 1000; 2000 e 3000 µg L<sup>-1</sup>. As soluções foram preparadas em meio de HNO<sub>3</sub> 0,7 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.2 Desenvolvimento dos métodos de calibração por LIBS

Para a análise utilizando a LIBS, alíquotas de 500 mg de cada amostra previamente moídas como descrito na seção 2.2 foram submetidas a uma pressão de 5 ton por 1 min em prensa hidráulica para obtenção de pastilhas de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. As 69 amostras de sedimentos foram analisadas em triplicado utilizando duas diferentes configurações do sistema LIBS, SP LIBS com o laser 1064 nm e DP LIBS com feixe cruzado com a sequência de laser 532-1064 nm. As análises foram feitas com os parâmetros instrumentais fixados em seus valores ótimos de acordo com os resultados dos DOE.

#### 3.2.3.2.1 Análise de dados para quantificação de TP

Para a determinação de P, os espectros obtidos com SP e DP LIBS foram processados em um software desenvolvido em linguagem de programação Python. Os *outliers* foram



excluídos usando o produto escalar entre a média e cada espectro medido. O coeficiente de correlação entre a intensidade em cada comprimento de onda do espectro e a concentração de P determinada por ICP OES foi calculado. Esta avaliação ajuda a identificar as melhores linhas para a modelagem. A curva de calibração analítica foi construída com 70% das amostras e a validação com os 30% restantes, empregando como estratégia de calibração a compatibilização de matriz. As amostras dos conjuntos de calibração e validação foram escolhidas aleatoriamente. Para a melhor linha de emissão de P obtida usando o gráfico de correlação foi feita a correção da linha de base (MARANGONI *et al.*, 2016) e a área foi integrado utilizando a função Lorentz. A área média foi calculada para cada amostra ( $n = 3$ ). O LOD foi calculado de acordo com Currie (CURRIE, 1999).

Três regressões lineares simples foram realizadas entre a concentração de P determinada por ICP OES, SP LIBS 1064 nm e DP LIBS e a profundidade dos testemunhos de sedimento em cada estação de coleta para avaliar a distribuição de P ao longo do núcleo de sedimento.

#### **3.2.3.2.2 Análise de dados para a quantificação de Cr, Cu e Ni**

Para a determinação de Cr, Cu e Ni nas amostras de sedimentos, foi desenvolvido um método de calibração para cada analito empregando somente a configuração DP LIBS com feixe cruzado com a sequência de laser 532-1064 nm. Não foi possível desenvolver modelos de calibração empregando a SP LIBS devido à baixa sensibilidade desta técnica para quantificar elementos em baixas concentrações.

Os espectros obtidos com DP LIBS foram processados no software Matlab versão 2017b (Matworks, Natick, MA, EUA) empregando duas rotinas. A primeira rotina, *libs\_treat*, foi aplicada para exclusão de *outlier* através do cálculo e avaliação do desvio padrão da área, do máximo e da norma euclidiana para cada amostra (linhas na matriz de dados) (BABOS *et al.*, 2019). A fim de minimizar as flutuações do sinal (área ou altura) e os efeitos de matriz durante a aquisição de dados, seis tratamentos espectrais foram avaliados: (i) média dos espectros, (ii) norma euclidiana individual do espectro e média, (iii) área individual do espectro e média, (iv) soma dos espectros, (v) norma euclidiana individual do espectro e soma e (vi) área individual do espectro e soma (BABOS *et al.*, 2019; CASTRO; PEREIRA-FILHO, 2016).

A segunda rotina, *libs\_par*, foi aplicada após o tratamento espectral. Essa rotina calcula a relação sinal-fundo (S/B, do inglês *signal-to-background*), a área do sinal e a altura de uma linha de emissão especificada. Para usar efetivamente *libs\_par*, é necessário estabelecer os intervalos das linhas de emissão que contêm sinais analíticos e de fundo (BABOS *et al.*, 2019).

As curvas de calibração analítica para cada elemento foram construídas com um conjunto de 54 amostras de sedimentos e o conjunto de validação com as 15 restantes. As amostras dos conjuntos de calibração e validação para cada elemento foram escolhidas aleatoriamente. Duas estratégias de calibração univariadas, CM e PI, foram avaliadas para a determinação de Cr, Cu e Ni nas amostras de sedimentos. Para cada estratégia de calibração foram avaliados dois modelos de regressão linear, direto e inverso com o método dos mínimos quadrados para as linhas de emissão atômica Cr I 357,87 nm, Cu I 324,75 nm e Ni I 232,00 nm. Os modelos que apresentaram menores erro quadrático médio da validação (RMSEV) foram avaliados empregando a ANOVA da regressão afim de verificar se eles poderiam ser usados para predição (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018).

### **3.2.3.2.2.1 Metodologia para avaliação de risco ecológico e qualidade de sedimentos**

A avaliação de risco ecológico foi realizada usando o software HERisk (NERIS *et al.*, 2021), uma versão aprimorada do código HHRISK (NERIS *et al.*, 2019). Esta nova versão permite o cálculo de índices simples como fator de contaminação (CF, do inglês *contamination factor*), fator de enriquecimento (EF, do inglês *enrichment factor*) e índice de geoacumulação ( $I_{geo}$ , do inglês *geoaccumulation index*), que foram usados para avaliar o nível de poluição relacionado a cada PTE separadamente (DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ *et al.*, 2019). A partir desses índices, o programa calcula os índices combinados, como grau modificado de contaminação ( $mC_d$ , do inglês *modified degree of contamination*), índice de poluição de limiar integrado ( $IPI_{Th}$ , do inglês *integrated threshold pollution index*), índice de carga de poluição (PLI, do inglês *pollution load index*), índice de risco ecológico potencial (PERI, do inglês *potential ecological risk index*), quociente de nível de efeito provável médio ( $m-PEL-q$ , do inglês *mean probable effect level quotient*) e o índice de risco tóxico (TRI, do inglês *the toxic risk index*), que avaliam a poluição total e os riscos ecológicos para a flora e a fauna considerando a presença de todos os PTEs quantificados nos sedimentos (EMENIKE *et al.*, 2020). As equações dos índices estão descritas na Tabela 1A na seção apêndice, uma vez que esses índices são bem conhecidos e amplamente utilizados na literatura. Neste estudo, quatro espécies químicas (Cr, Cu, Fe, Ni) foram consideradas nas avaliações de risco ecológico. As concentrações de Cr, Cu e Ni foram determinadas por DP LIBS e a concentração de Fe foi determinada por ICP OES.

Para o cálculo dos índices simples foi adicionado a concentrações de espécies definidas por BRAMORSKI (2004). Esta referência quantificou as concentrações de PTEs nos sedimentos em 2002 nas mesmas estações de coletas deste trabalho. Por outro lado, para o

cálculo do  $IPI_{Th}$ , foram utilizados os valores limites estipulados pela legislação brasileira por meio da Resolução CONAMA 454/2012 (BRASIL, 2012).

Além das análises de riscos ecológicos, também foi adotada as Diretrizes de Qualidade de Sedimentos (SQGs) para avaliar o potencial de impacto biológico das espécies químicas no sedimento e possibilitar a prevenção e mitigação do sistema aquático estudado. Os níveis de poluição foram avaliados usando os padrões de TEL e PEL de SQGs de água doce nacionais e internacionais fornecidos pelo CONAMA e NOAA (BUCHMAN, 2008; BRASIL, 2012).

Todos os valores dos parâmetros usados para a avaliação da qualidade do sedimento e os cálculos dos índices são apresentados na Tabela 2A na seção apêndice, enquanto as classificações de poluição ambiental e risco ecológico são apresentadas na Tabela 3A na seção apêndice.

### **3.3 Resultados e discussão**

#### **3.3.1 Otimização dos parâmetros LIBS a partir de DOE**

##### **3.3.1.1 Delineamento composto central para SP LIBS com lasers de 1064 e 532 nm**

Os resultados do DCC para o sistema SP LIBS operando com o laser de 1064 nm mostraram que os efeitos linear e quadrático da energia do laser (LE) explicaram no máximo 10% da variabilidade para V (Tabela 5), com os gráficos de contorno mostrando que sua influência foi muito pequena (Figura 14). Portanto, o menor valor de LE correspondeu ao valor otimizado. A variável DT influenciou as respostas para todos os elementos (Tabela 2), com exceção do Cu, sendo os elementos mais afetados B (RI = 70%), Co (RI = 75%) e Fe (RI = 39%). Para B e Co, o valor mínimo de DT maximizou a relação S/N, enquanto o efeito oposto foi observado para Fe (Figura 14). Os maiores CV foram encontrados para B e Co, portanto o DT otimizado correspondeu ao seu menor valor. A variável GW apresentou efeitos para 7 elementos (Ca, Cr, Mg, Mn, Na, Sr e V) (Tabela 5), com maiores valores de GW resultando na maximização da relação S/N (Figura 14). A variável AP apresentou efeito para todos os analitos, exceto Fe e Sr (Tabela 5). Nos casos em que o AP foi significativo, a maximização da relação S/N ocorreu no valor máximo do AP (Figura 14). A soma das interações entre os fatores representou menos de 10% para todos os elementos, exceto Fe, onde a interação LE\*GW representou 14%, e Zn, onde DT\*GW representou 21%. Portanto, os fatores otimizados para o sistema SP LIBS operando com o laser de 1064 nm foram LE = 34 mJ, DT = 0,2  $\mu$ s, GW = 20  $\mu$ s e AP = 10.

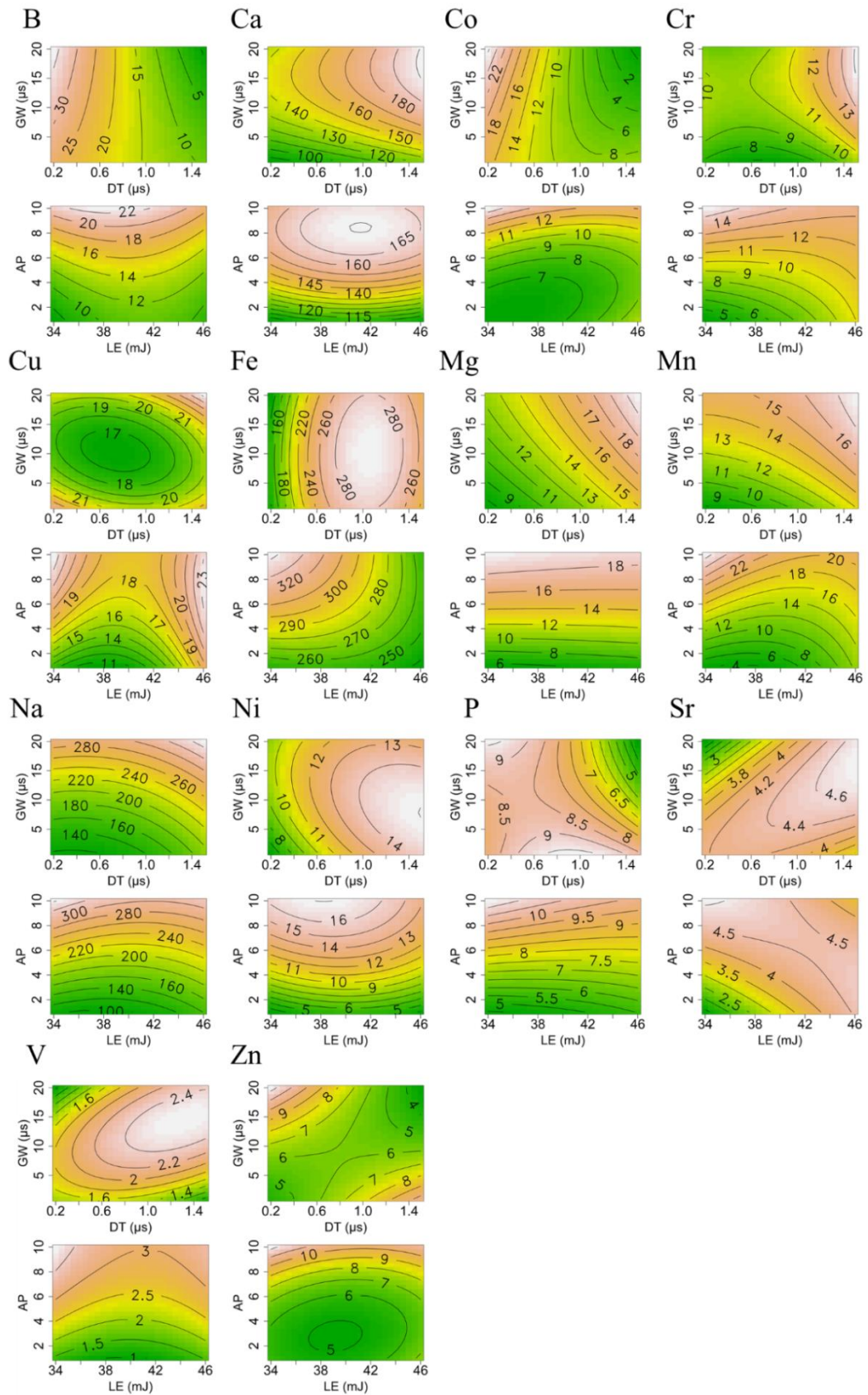
Tabela 5 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e importância relativa (RI) para os efeitos linear e quadrático nos modelos finais de DCC para SP LIBS com os lasers de 1064 e 532 nm.

Elementos	SP LIBS 1064 nm						SP LIBS 532 nm					
	CV (%)	R <sup>2</sup> (%)	RI (%) dos fatores*				CV (%)	R <sup>2</sup> (%)	RI (%) dos fatores*			
			LE	DT	GW	AP			LE	DT	GW	AP
<b>B</b>	51	94		70		17	25	92	10	4		70
<b>Ca</b>	21	90		21	40	29	29	83		15	54	14
<b>Co</b>	52	94		75		11	21	82	11	9	4	45
<b>Cr</b>	27	93	2	15	14	54	50	80		28	45	7
<b>Cu</b>	17	50				50	32	69	3	9	17	8
<b>Fe</b>	21	57	4	39			64	89	8	58	1	19
<b>Mg</b>	34	91		20	10	61	43	95		8	53	31
<b>Mn</b>	37	94	3	4	9	75	51	87		15	45	24
<b>Na</b>	35	93		5	36	52	53	86		14	51	16
<b>Ni</b>	32	90		16		74	45	88		46	10	32
<b>P</b>	27	66		13		53	28	72		49	6	17
<b>Sr</b>	22	45	5	11	20		9	62		10	32	20
<b>V</b>	33	95	10	5	7	69	50	88		16	60	12
<b>Zn</b>	30	63		4		38	29	86	13	14		59

\*Efeitos lineares e quadráticos.

Fonte: Autoria própria.

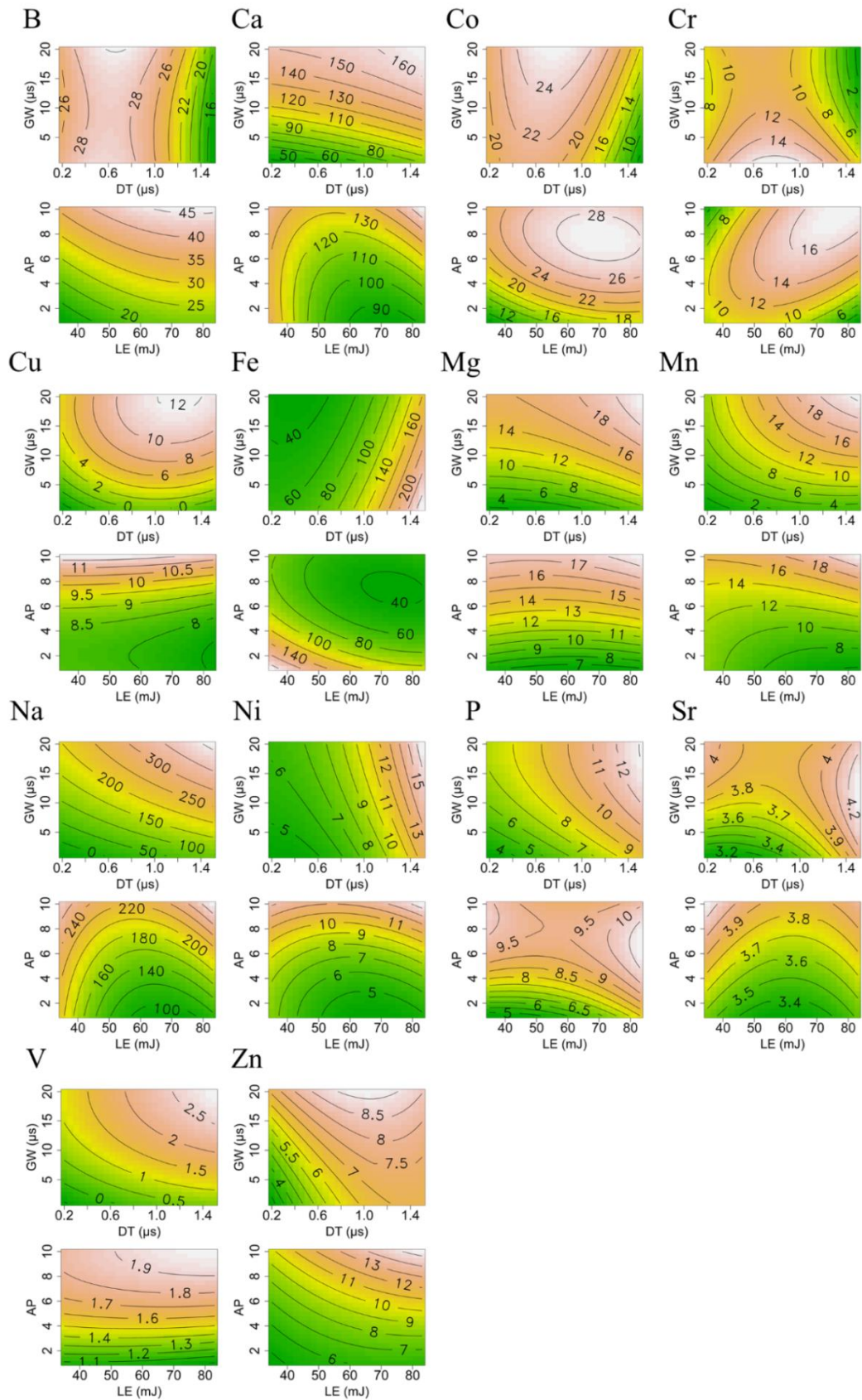
Figura 14 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para SP LIBS com o laser de 1064 nm.



Fonte: Autoria própria.

Para o sistema SP LIBS operando em 532 nm, os resultados do DCC mostraram que o LE afetou apenas as respostas para B, Fe, Co e Zn, com RI de 10%, 11%, 8% e 13%, respectivamente (Tabela 5). Dentre esses elementos, o Fe apresentou o maior CV de 64%, correspondendo ao maior efeito do LE. Como o menor valor de LE maximizou a relação S/N para o Fe (Figura 15), enquanto para os demais elementos LE teve pouco ou nenhum efeito, o menor valor de LE foi adotado como ótimo. Foi observado efeito do DT para todos os elementos (Tabela 5). Como o menor valor foi indicado apenas para B e Co (Figura 15), o maior valor de DT foi adotado como ótimo. Dentre os elementos cuja resposta foi afetada pelo GW (Tabela 5), todos apresentaram a maior resposta no valor máximo, com exceção do Cr (Figura 15). Todos os elementos apresentaram efeito de AP (Tabela 5), com maior resposta no valor máximo, com exceção do Fe (Figura 15). A soma das interações entre os fatores representou menos de 10% para todos os elementos, exceto para Co, onde as interações LE\*DT e GW\*AP representaram 6,5%, e para Cu, onde LE\*GW, LE\*AP, e as interações GW\*AP representaram 14%, 8% e 10%, respectivamente. Para o sistema SP LIBS operando em 532 nm (Tabela 5 e Figura 15), os fatores otimizados foram  $LE = 35 \text{ mJ}$ ,  $DT = 1,5 \text{ } \mu\text{s}$ ,  $GW = 20 \text{ } \mu\text{s}$  e  $AP = 10 \text{ pulsos}$ .

Figura 15 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para SP LIBS com o laser de 532 nm.



Fonte: Autoria própria.

A otimização dos fatores instrumentais que influenciaram a análise multielementar do sedimento por SP LIBS (lasers de 1064 e 532 nm) mostrou que nos casos em que o CV foi inferior a 10%, a variação da resposta em todas as corridas não teve efeito significativo, independentemente da combinação de valores estudados para cada fator. No LIBS, os eventos de *breakdown* mudam drasticamente as intensidades da linha espectral, consequentemente aumentando o CV das medidas. Para análises geoquímicas, valores de CV entre 5% e 20% são geralmente aceitáveis (MUSAZZI; PERINI, 2014). A RI dos fatores estudados para cada elemento ajudou a identificar as variáveis mais importantes a partir das contribuições percentuais.

Para ambos os sistemas SP LIBS, o menor valor de LE foi escolhido como ótimo, pois LE na faixa estudada teve pouca ou nenhuma influência na relação S/N dos elementos avaliados. Estudos têm mostrado que as intensidades das linhas de emissão do espectro LIBS aumentam com a energia do pulso do laser, sob irradiância constante (AGUILERA; ARAGÓN, 2008; DE CARVALHO *et al.*, 2012). Porém, aumentar a intensidade das linhas de emissão pode levar ao aumento do ruído, por isso é importante avaliar a relação S/N (HAHN; OMENETTO, 2012).

Para ambos os sistemas SP LIBS, os valores mais altos de GW e AP maximizam a relação S/N. No entanto, para o laser de 1064 nm, o menor valor DT maximizou a relação S/N para a maioria dos elementos, enquanto para o laser de 532 nm o valor mais alto desse fator maximizou a resposta para a maioria dos elementos. Esses resultados foram relacionados aos mecanismos de geração e formação do plasma. O crescimento em cascata da densidade de elétrons (*bremssstrahlung* inverso) é mais favorável para lasers de comprimento de onda maiores (CABALIN; LASERNA, 1998), enquanto a ionização por multifótons desempenha um papel importante para lasers de comprimento de onda menores (SINGH; THANKUR, 2007).

### **3.3.1.2 Otimização de fatores para DP LIBS**

Dois planejamentos fatoriais fracionados  $2^{6-2}$  foram implementados para DP LIBS com diferentes sequências de laser (uma sequência foi de 1064-532 nm e a outra foi de 532-1064 nm) para a escolha da melhor sequência de laser e triagem para descartar variáveis não significativas. O planejamento fatorial fracionário  $2^{6-2}$  com a sequência dos lasers de 1064-532 nm (Tabela 6) mostrou que o LE de 1064 nm não influenciou na relação S/N, para nenhum elemento, enquanto o LE de 532 nm explicou no máximo 10% da variabilidade (para Fe). Os outros fatores tiveram maiores efeitos na relação S/N, com efeitos  $\leq 43\%$  para AP (10 elementos: B, Ca, Co, Cr, Mg, Mn, Na, P, V e Zn),  $\leq 29\%$  para GW (4 elementos: Cr, Mg, Mn



e Na),  $\leq 66\%$  para atraso entre pulsos (ID) (6 elementos: B, Co, Mg, Ni, P e Zn) e  $\leq 58\%$  para DT (10 elementos: B, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Sr e Zn). O planejamento fatorial fracionário  $2^{6-2}$  com a sequência de laser 532-1064 nm (Tabela 6) mostrou novamente que o LE de 1064 nm não teve influência na relação S/N para nenhum elemento, enquanto o LE de 532 nm explicou no máximo 20% de a variabilidade (para Zn). Os demais fatores tiveram maior influência na relação S/N, com efeitos  $\leq 42\%$  para AP (11 elementos: B, Ca, Co, Cu, Cr, Mg, Mn, Ni, P, V e Zn),  $\leq 41\%$  para GW (4 elementos: Cr, Mg, Mn e Sr),  $\leq 85\%$  para ID (6 elementos: B, Ca, Co, Fe, Mg e Na) e  $\leq 43\%$  para DT (10 elementos: B, Ca, Co, Cr, Mg, Na, Ni, P, V e Zn).

Tabela 6 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) e importância relativa (RI) para efeitos lineares nos modelos finais de planejamento fatorial fracionados para DP LIBS.

Elementos	Planejamentos fatoriais fracionados 2 <sup>6-2</sup> com a sequência dos lasers 1064-532 nm								Planejamentos fatoriais fracionados 2 <sup>6-2</sup> com a sequência dos lasers 532-1064 nm							
	CV (%)	R <sup>2</sup> (%)	RI (%) dos fatores*						CV (%)	R <sup>2</sup> (%)	RI (%) dos fatores*					
			1064		532		AP	GW			ID	DT	1064		532	
			nm	nm	nm	nm							nm	nm		
<b>B</b>	52	85	5	7	16	57	59	76	15	18	43					
<b>Ca</b>	50	43		43			39	96	2	85	9					
<b>Co</b>	64	90	3	8	24	55	62	82	8	15	16	43				
<b>Cu</b>	27	42				42	28	28	28							
<b>Cr</b>	30	47		18	29		24	60	20	18	22					
<b>Fe</b>	47	66	10			56	48	32			32					
<b>Mg</b>	37	76		34	12	23	7	23	74	37	12	14	11			
<b>Mn</b>	40	58		26	19	13	26	58	42	16						
<b>Na</b>	65	68		43	25		29	51			29	22				
<b>Ni</b>	42	74				66	8	38	53	14	16				23	
<b>P</b>	43	74		8	47	19	47	35	19			16				
<b>Sr</b>	39	58				58	7	41			41					
<b>V</b>	27	18		18			10	41	15						26	
<b>Zn</b>	52	88	9	18	46	15	41	63	20	13					30	

\*Efeito linear.

Fonte: Autoria própria.

O planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  com a sequência dos lasers de 532-1064 nm apresentou melhor desempenho (relações S/N maiores), em comparação com a sequência dos lasers de 1064-532 nm. Isso era esperado, pois a emissão de fundo é maior quando o laser de 1064 nm é usado para a ablação da amostra (NICOLODELLI *et al.*, 2015). Portanto, o planejamento fatorial fracionário  $2^{6-2}$  com a sequência de laser de 532-1064 nm, onde o laser de 1064 nm foi usado para reaquecer o plasma, foi otimizado usando um DCC.

De acordo com os resultados obtidos pelo planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  com a sequência das lasers 532-1064 nm, foram escolhidos os valores dos fatores que foram fixados e, em seguida, os fatores que tiveram os maiores efeitos na relação S/N foram otimizados através do DCC. Os resultados mostraram que para o planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  com a sequência de laser 532-1064 nm, o LE para o laser de 1064 nm não influenciou a relação S/N para nenhum elemento, enquanto o LE para o pulso de 532 nm explicou muito pouco a variabilidade dos dados. Portanto, esses dois fatores foram fixados em seus valores mais baixos (34 e 35 mJ para os lasers de 1064 e 532 nm, respectivamente) para a implementação do DCC. Valores maiores de AP resultaram na maximização da relação S/N para todos os elementos influenciados por esse fator (com exceção do Ca, para o qual o valor de RI foi de apenas 2%). Além disso, observou-se que para o sistema SP LIBS operando com os lasers de 1064 e 532 nm, a maior relação S/N também ocorreu no valor máximo de AP. Portanto, este fator foi fixado em seu valor máximo (10 pulsos acumulados) para implementação do DCC. Uma vez que os fatores GW, ID e DT tiveram os maiores efeitos na relação S/N, eles foram selecionados para refinar as condições ótimas.

No experimento DCC, o Sr apresentou pouca variação da relação S/N, com CV de apenas 2% (Tabela 7). Consequentemente, nenhum fator afetou a resposta desse elemento. O GW afetou apenas a relação S/N para Cr e Zn (Tabela 7), ambos com IR de 9%, portanto o menor valor desse fator correspondeu ao seu valor otimizado. O ID influenciou 13 elementos (Tabela 7), a maioria dos quais apresentou resposta máxima no valor mínimo do ID, exceto Ca, Fe e Mg, para os quais o valor intermediário representou a melhor condição (Figura 16). O DT afetou 8 elementos (Tabela 7), dos quais 5 elementos (B, Co, Ni, P e Zn) apresentaram resposta máxima no valor mínimo de DT (Figura 16). Para Ca e Mg, a melhor condição foi no valor máximo de DT, enquanto para Fe foi em um valor intermediário. No entanto, os valores de CV para Ca e Fe ficaram abaixo de 15%. A soma das interações entre os fatores correspondeu a menos de 10% para a maioria dos elementos, exceto B e Fe, para os quais a interação ID\*DT correspondeu a 2 e 16%, respectivamente. Portanto, os fatores otimizados para DP LIBS na

configuração de feixe cruzado com a sequência de laser 532-1064 nm foram os seguintes: LE (1064 nm) = 34 mJ; LE (532 nm) = 35 mJ; AP = 10; GW = 5  $\mu$ s; ID = 0,2  $\mu$ s; e DT = 0,2  $\mu$ s.

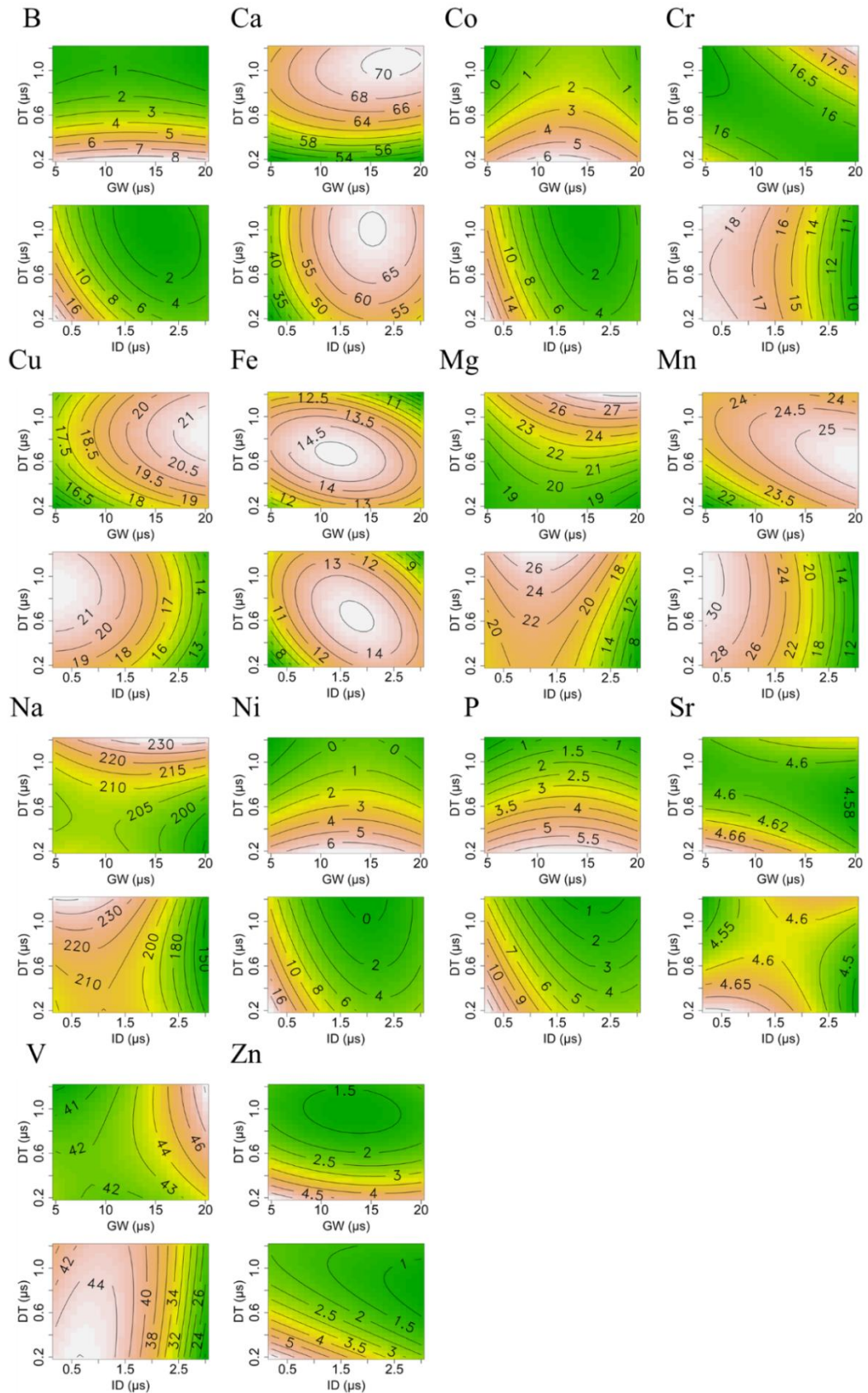
Tabela 7 – Coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e importância relativa (RI) para os efeitos linear e quadrático nos modelos finais de DCC para DP LIBS.

Elementos	CV (%)	$R^2$ (%)	RI (%) dos fatores*		
			GW	ID	DT
<b>B</b>	97	99		72	25
<b>Ca</b>	14	95		73	22
<b>Co</b>	113	92		81	11
<b>Cu</b>	16	67		67	
<b>Cr</b>	14	72	9	63	
<b>Fe</b>	14	72		42	14
<b>Mg</b>	22	83		54	29
<b>Mn</b>	23	80		80	
<b>Na</b>	13	42		42	
<b>Ni</b>	108	92		72	20
<b>P</b>	67	99		69	30
<b>Sr</b>	2				
<b>V</b>	16	83		83	
<b>Zn</b>	56	57	9	15	33

\*Efeitos lineares e quadráticos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Gráficos de contorno da relação S/N do modelo DCC para DP LIBS.



Fonte: Autoria própria.

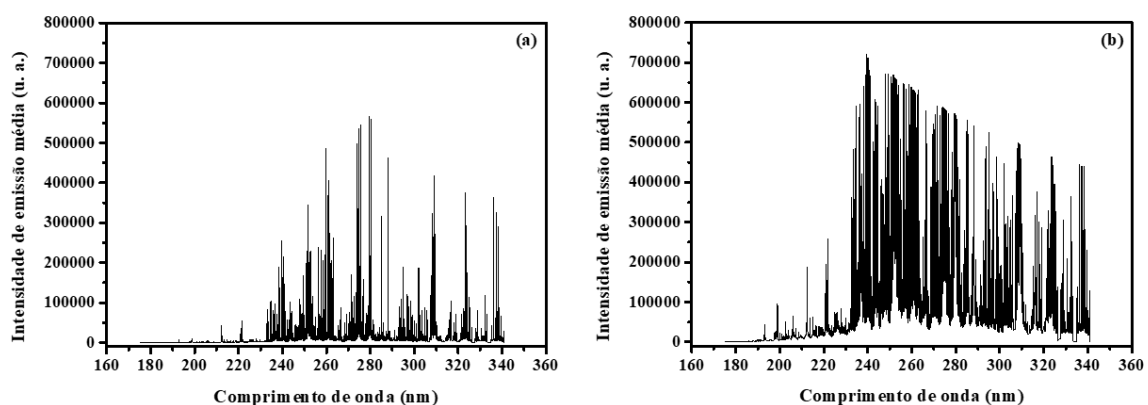
Assim como no caso do SP LIBS, a LE na faixa estudada teve pouca ou nenhuma influência na relação S/N dos elementos avaliados, enquanto o maior valor de AP maximizou a relação S/N. Diferente de SP LIBS, o menor valor GW maximiza a resposta. O DT otimizado para DP LIBS foi o mesmo para SP LIBS com o laser de 1064 nm (0,2  $\mu$ s). A maximização da relação S/N no menor valor de DT foi devido à maior temperatura de excitação e densidade de elétrons no início da formação do plasma (NICOLODELLI *et al.*, 2015). Para os elementos influenciados pelo ID, a maioria apresentou uma resposta máxima no ID de 0,2  $\mu$ s, pois o plasma absorveu a energia do laser de 1064 nm que reaqueceu o plasma (segundo pulso), consequentemente aumentando a temperatura do plasma formado pelo laser de 532 nm (GAUTIER *et al.*, 2005).

### 3.3.2 Determinação de TP por LIBS

#### 3.3.2.1 LIBS

A Figura 17 mostra dois espectros típicos de emissão de plasma de 175 a 341 nm para uma amostra de sedimento obtida com os sistemas SP LIBS com laser 1064 nm (Figura 17a) e DP LIBS com a sequência de lasers de 532-1064 nm (Figura 17b).

Figura 17 – Espectro de emissão de uma amostra de sedimento, de 175 a 341 nm, obtido com os sistemas SP LIBS com laser 1064 nm (a) e DP LIBS com a sequência de lasers de 532-1064 nm (b).

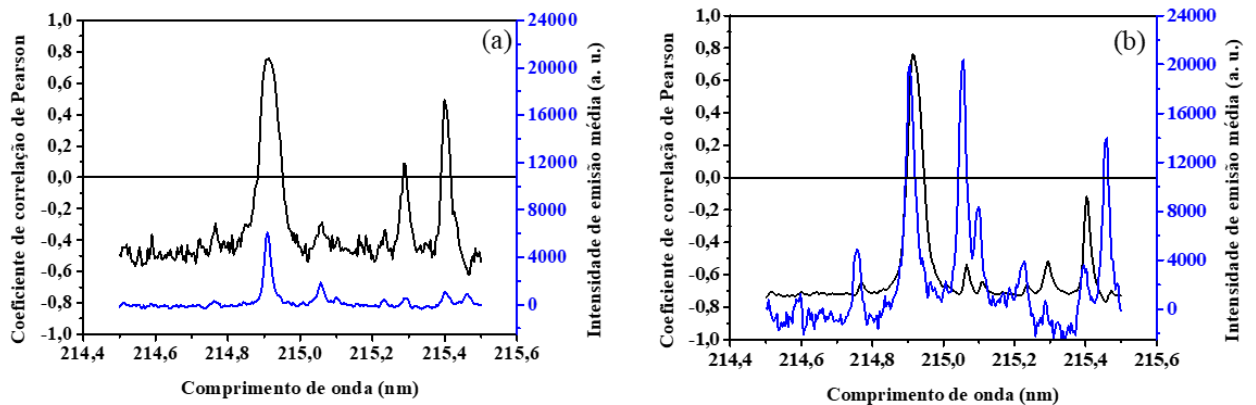


Fonte: Autoria própria.

A linha de emissão atômica do P em 214,91 nm apresentou correlação linear significativa com os valores de referência para ambas as configurações, 0,75 e 0,76; para os dados não tratados de SP e DP LIBS nm, respectivamente (Figura 18). A relação S/N média

para P I 214,91 nm foi de 15,1 e 27,9 para SP e DP LIBS, respectivamente, então DP LIBS aumentou a relação S/N em 1,8 vezes. Assim, a linha de emissão em 214,91 nm foi escolhida para a construção dos modelos de calibração.

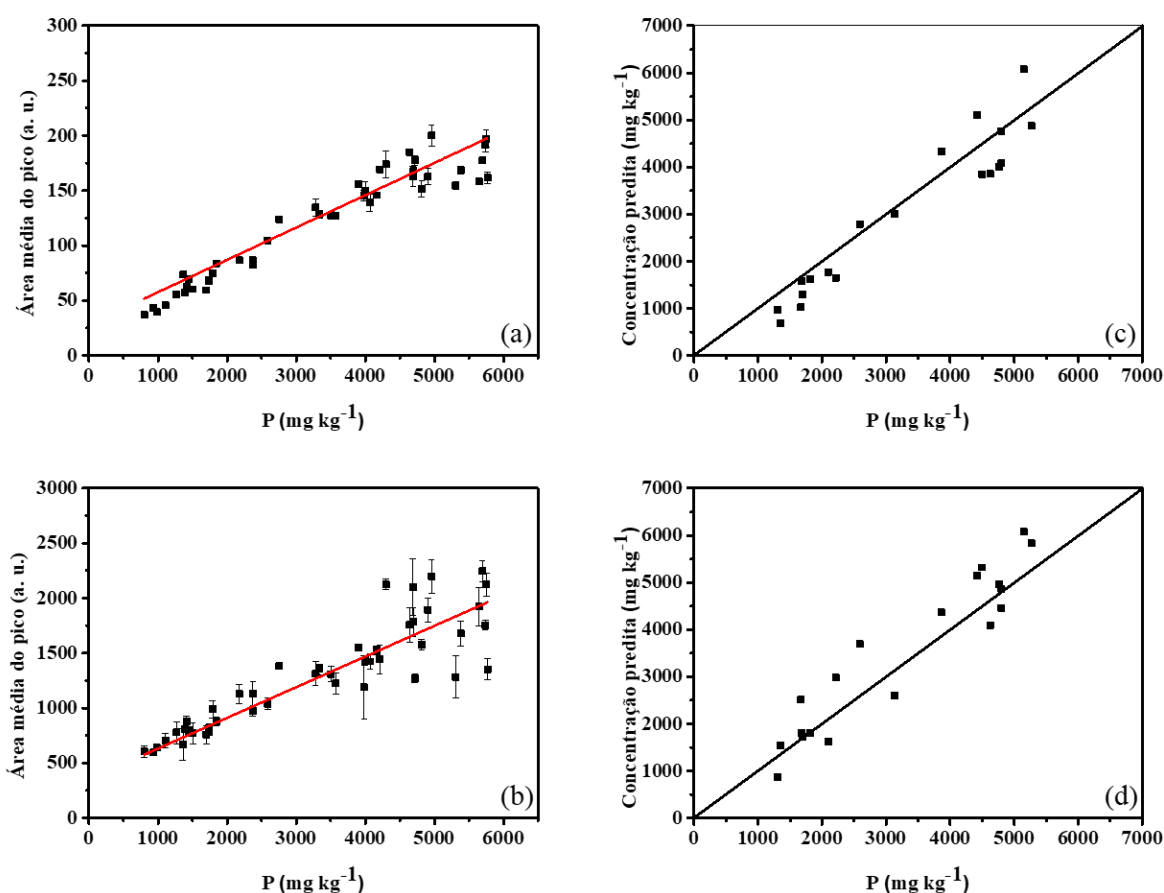
Figura 18 – Gráficos de correlação linear para P usando (a) SP e (b) DP LIBS de 214,4 nm a 215,16 nm.



Fonte: Autoria própria.

Os modelos de calibração para SP e DP LIBS (Figura 19a e 19b, respectivamente) foram construídos pela correlação direta entre a área da linha de emissão ajustada pela função de Lorentz e os valores de referência das concentrações de P obtidos com ICP OES. As curvas de calibração de P mostraram a existência de uma correlação linear forte e positiva, na qual foram obtidos coeficientes de correlação de 0,93 e 0,92 para SP e DP LIBS, respectivamente, e uma faixa linear de trabalho de 802 a 5770 mg kg<sup>-1</sup> P para ambas as curvas. Os valores de LOD de 709 mg kg<sup>-1</sup> e 349 mg kg<sup>-1</sup> para SP e DP LIBS, respectivamente, foram calculados de acordo com Currie (CURRIE, 1999). Os dois métodos propostos foram validados usando o conjunto de validação (Figura 19c e 19d). Nesse tipo de validação, os gráficos foram construídos utilizando a correlação da concentração de P prevista pelos modelos de calibração do método LIBS com a concentração de P determinada pelo ICP OES.

Figura 19 – Curvas analíticas de calibração para a determinação de P total em sedimentos por (a) SP LIBS e (b) DP LIBS e curvas de validação para os métodos (c) SP LIBS e (d) DP LIBS.



Fonte: Autoria própria.

Para melhor interpretar os valores de RMSEC (erro quadrático médio da calibração) e RMSEV (erro quadrático médio da validação), o erro percentual médio foi calculado para os conjuntos de calibração e validação em ambos os métodos. O erro percentual médio para as curvas de calibração foi de 12% e 11% para SP e DP LIBS, respectivamente. Para as curvas de validação, foi de 14% e 10% para SP e DP LIBS, respectivamente. Os erros médios na quantificação de TP por SP e DP LIBS são aceitáveis para medidas de amostras sem preparação (MARANGONI *et al.*, 2016), e embora o efeito de matriz seja comum na técnica LIBS (HOU *et al.*, 2019), os modelos desenvolvidos utilizando a linha P I 214,91 nm mostraram-se independentes da matriz e não apresentaram efeitos não-lineares. Além disso, na linha de emissão escolhida, não foi observada interferência espectral de outros elementos, permitindo a construção de modelos de calibração univariada para diferentes tipos de amostras (VIEIRA *et al.*, 2018). Os dois métodos desenvolvidos para quantificação de P em sedimentos de rios

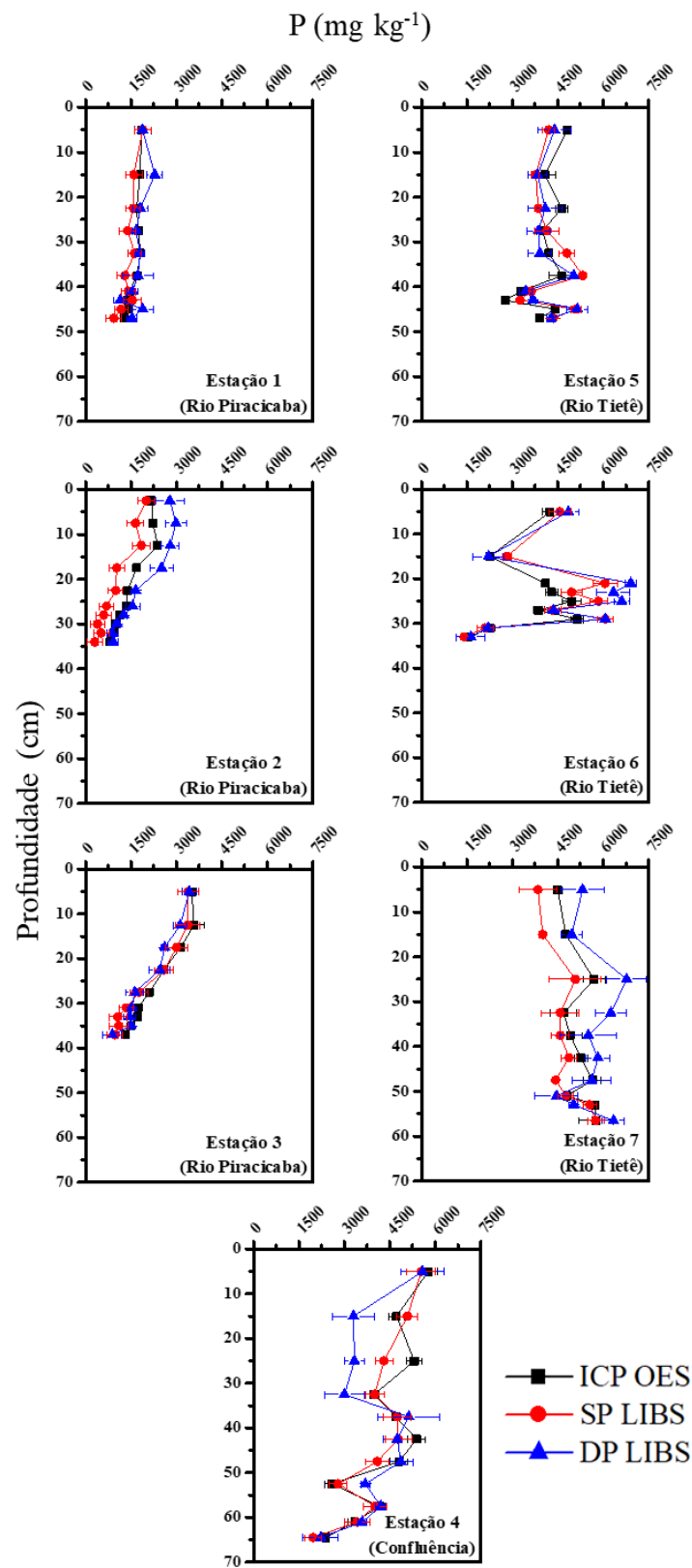


apresentam valores de LODs abaixo do valor máximo considerado de origem natural ( $750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) definido pelas leis brasileiras (CETESB, 2018) e pode ser usado para determinar o TP em substituição ao ICP OES. O método desenvolvido com DP LIBS é mais sensível e apresentou um LOD duas vezes menor que o método com SP LIBS. Porém, para analisar o grau de eutrofização de rios eutrofizados, o SP LIBS é suficiente e preferível, pois utiliza apenas um laser, sendo, portanto, um sistema instrumental mais barato.

### **3.3.2.2 Distribuição de TP dentro dos núcleos de sedimentos**

As concentrações de P determinadas por ICP OES, SP e DP LIBS foram descritas em relação a profundidade dos testemunhos de sedimento (Figura 20). A distribuição das concentrações de P nos testemunhos de sedimento de acordo com os métodos LIBS desenvolvidos apresentou o mesmo comportamento em todas as estações quando comparada com o ICP OES. Os resultados obtidos por ICP OES foram concordantes com os resultados obtidos por SP e DP LIBS ao nível de confiança 95% (teste t pareado). Portanto, ambos os métodos são muito eficientes para avaliar o grau de eutrofização e obter informações sobre as contribuições antrópicas no que diz respeito ao teor de P total em testemunhos de sedimentos.

Figura 20 – Distribuição de P total dentro dos testemunhos de sedimentos nas estações de coleta.



Fonte: Autoria própria.

As concentrações médias de TP nos sedimentos dos Rios Tietê ( $4316,16 \pm 1062,63 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ) e Piracicaba ( $1800,17 \pm 696,82 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ) são altas quando comparadas com aquelas relatadas em estudos semelhantes para ecossistemas aquáticos eutrofizados (concentração de até  $1844,90 \text{ mg kg}^{-1}$  de P) (BARIK *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2020). A maior concentração de P está na superfície do testemunho de sedimentos da estação 4 ( $5770,31 \text{ mg kg}^{-1}$ ), este resultado ocorre porque a região de confluência pode provocar a imobilização de P nos sedimentos superficiais (YUAN *et al.*, 2019). Os pontos de coleta nas estações 1, 2 e 3 (Rio Piracicaba) e na estação 4 (região de confluência) mostraram uma tendência linear decrescente significativa do teor de P com a profundidade, com teores de P nas camadas superficiais de  $1846,02$ ;  $2174,23$ ;  $3506,09$  e  $5770,31 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Os valores para as taxas de diminuição do conteúdo de P por centímetro foram  $-14,86$ ;  $-53,62$ ;  $-66,41$  e  $-66,68 \text{ mg kg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  com os valores de  $R^2$  sendo  $0,87$ ;  $0,98$ ;  $0,99$  e  $0,91$  para as estações 1, 2, 3 e 4, respectivamente. O aumento do teor de TP da parte inferior para a parte superior dos testemunhos dos sedimentos indica que a deposição de P está aumentando, e isso se deve à intensificação das atividades antropogênicas na região (LUPINACCI *et al.*, 2017). As estações 5, 6 e 7 do Rio Tietê não apresentaram tendência linear significativa, e seus níveis médios e respectivos desvios-padrão do teor de P foram  $4072,64 \pm 643,96$ ;  $3629,12 \pm 1293,20$  e  $5178,02 \pm 498,50 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. A diferença no comportamento da distribuição de TP ao longo do perfil nos Rios Tietê (estações 5, 6 e 7) e Piracicaba (estações 1, 2 e 3) pode estar ligada ao suprimento e ressuspensão de P nos sedimentos. As principais fontes de P nos pontos amostrados são descartes de esgoto doméstico, com grande quantidade de matéria orgânica fecal e detergentes, água drenada em áreas agrícolas e alguns efluentes industriais (SMITH; ESPÍNDOLA; ROCHA, 2014).

De acordo com o critério brasileiro de qualidade de sedimentos em relação ao teor de TP, as camadas de sedimento mais profundas do Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3) apresentam níveis de TP que poderiam impactar o corpo d'água se forem remobilizados (concentração de TP entre  $750$  e  $1500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), e as camadas mais superficiais da Rio Piracicaba, todas as camadas sedimentares do Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) e da região da confluência apresentam níveis de TP que causam alto impacto no corpo d'água (concentração de TP acima de  $1500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (CETESB, 2018). Esses resultados indicam que a variabilidade do TP na distribuição vertical é alta para o Rio Piracicaba, enquanto no Rio Tietê é relativamente baixa. Os resultados apresentados para o Rio Tietê corroboram com os observados por Baran *et al.* (2019) no rio Dunajec, onde não houve grande variabilidade de P na distribuição vertical, o que significa que a matéria intensamente suspensa transportada por esses rios é homogênea.

### 3.3.3 Determinação de Cr, Cu e Ni por LIBS

#### 3.3.3.1 Métodos de calibração

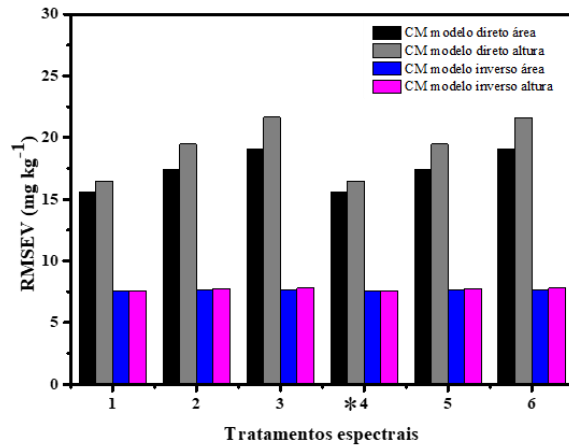
As linhas de emissão atômica de Cu e Ni foram selecionadas de acordo com o DOE, Cu I 324,75 nm e Ni I 232,00 nm. Todavia para Cr foi escolhida a linha de emissão Cr I 357,87 nm porque é mais sensível que a linha utilizada no DOE (Cr I 359,35 nm), sendo ideal para o monitoramento de baixas concentrações desse analito. As linhas de emissão atômicas do Cr 357,87 nm, 359,35 nm e 360,53 nm são linhas ressonantes que partem do estado fundamental, são um triplete. O DOE foi feito com uma amostra contendo uma concentração média dos analitos a fim de evitar a não detecção do elemento para amostras menos concentradas e o efeito de auto-absorção para as amostras mais concentradas.

Duas estratégias de calibração univariadas, a compatibilização de matriz (CM) e a padronização interna (PI), foram avaliadas para superar ou minimizar os efeitos de matriz na determinação de Cr, Cu e Ni em amostras de sedimentos dos Rios Tietê e Piracicaba e a região de confluência por LIBS. Além disso, para cada estratégia de calibração, a regressão direta e inversa foi avaliada com intuito de aumentar a exatidão na determinação dos analitos utilizando os modelos desenvolvidos. Para as estratégias de PI, o Ti II 324,85 nm foi escolhido como padrão interno para Cu e o Fe II 233,80 nm foi escolhido como padrão interno para Ni. A escolha dos padrões internos foi feita com base na similaridade das propriedades físico-químicas entre o analito e o padrão interno.

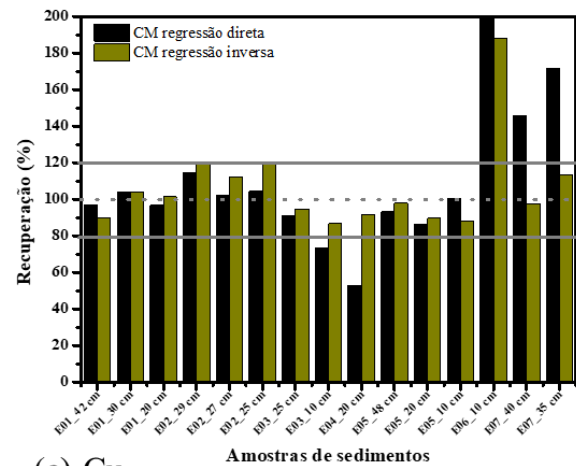
As Figuras 21a, 21b e 21c mostram o erro quadrático médio de validação, RMSEV para cada modelo de calibração baseado na área e altura das linhas de emissão do Cr, Cu e Ni, respectivamente, empregando os oito tratamentos espectrais propostos. Para o Cr e Ni não foi possível obter modelos de calibração empregando a PI e a CM, respectivamente. A melhor estratégia de calibração em função do RMSEV para cada analito foi comparada com seu oposto. Essa comparação foi feita entre os valores de recuperação obtidos pelos modelos direto e inverso para as amostras do mesmo conjunto de validação mostradas nas Figuras 21d, 21e e 21f.

Figura 21 – Erro quadrático médio de validação (RMSEV) para Cr, Cu e Ni, empregando os tratamentos espectrais propostos e a recuperação (%) para Cr, Cu e Ni em amostras de sedimentos determinadas por LIBS usando modelos de calibrações com a CM e a PI.

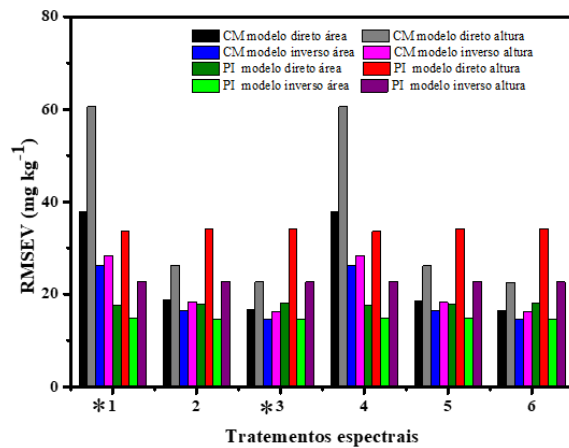
(a) Cr



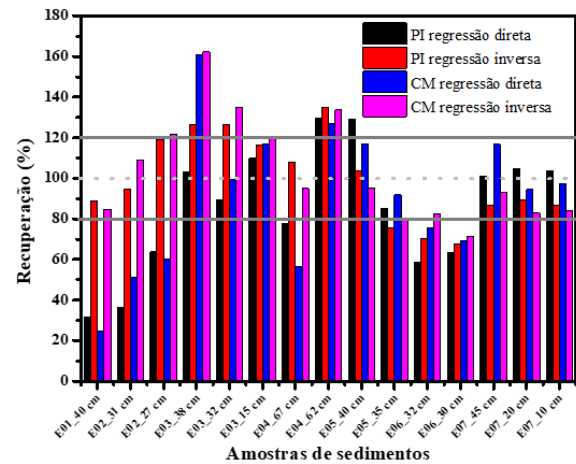
(d) Cr



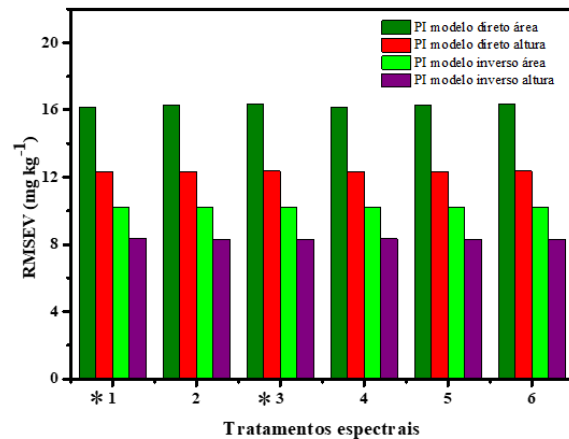
(b) Cu



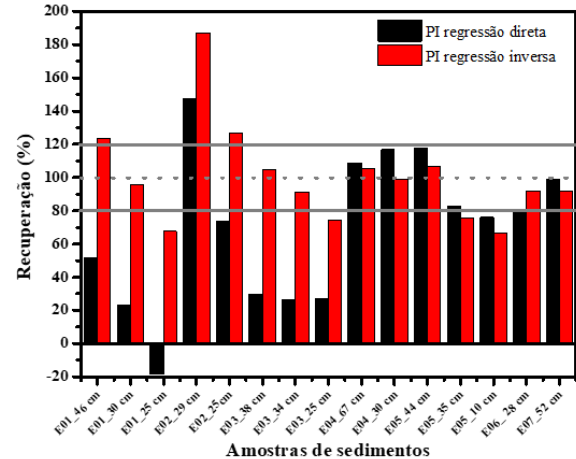
(e) Cu



(c) Ni



(f) Ni



\*Melhor tratamento espectral.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Figura 21a, independente do sinal analítico monitorado (área e altura), o RMSEV foi menor utilizando a calibração por CM com o modelo inverso quando comparado com a CM com o modelo direto. Em função do menor RMSEV ( $7,54 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Tabela 8), o melhor modelo de calibração obtido para o Cr foi a CM com regressão inversa baseado na área utilizando o tratamento espectral 4. Comparando os valores de recuperação de Cr obtidos pelos modelos direto e inverso para as mesmas amostras de sedimentos (Figura 21d) e considerando que os valores aceitáveis de recuperação estão entre 80% e 120%, observa-se que das 15 amostras somente uma amostra (amostra de sedimento do Rio Tietê coletada na estação 6 a uma profundidade de 10 cm na camada de sedimento) ficou fora da faixa ótima de recuperação para CM com regressão inversa, enquanto para CM com regressão direta, cinco amostras ficaram fora da faixa aceitável de recuperação.

Para o Cu foi possível obter modelos de calibração empregando a estratégias de calibração por CM e a PI. Para os resultados obtidos com a CM (Figura 21b), assim como observados para Cr, independente do sinal analítico monitorado (área e altura), o RMSEV foi menor para a CM com o modelo inverso quando comparado com a CM com o modelo direto. Em função do menor RMSEV ( $14,56 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Tabela 8), o melhor modelo de calibração obtido para Cu foi a CM com regressão inversa baseado na área utilizando o tratamento espectral 3. Para os resultados obtidos com a PI (Figura 21b), independentemente do tipo de tratamento espectral, o menor RMSEV foi para a área e para a PI com o modelo inverso. Em função do menor RMSEV ( $14,53 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Tabela 8), o melhor modelo de calibração obtido para Cu com padrão interno sendo o Ti foi a PI com regressão inversa baseado na área utilizando o tratamento espectral 3. Comparando os valores de recuperação de Cu obtidos pela PI e CM com modelos direto e inverso para as mesmas amostras de sedimentos (Figura 21e), observa-se que a maioria das amostras ficaram dentro da faixa ótima de recuperação para a PI e CM com regressão inversa. Esse resultado mostra que independente da estratégia de calibração, o modelo inverso mostrou melhores predições da concentração de Cu das amostras do conjunto de validação.

Para o Ni, independentemente do tipo de tratamento espectral, o RMSEV foi menor para a PI com o modelo inverso usando a área como sinal analítico (Figura 21c). Em função do menor RMSEV ( $8,29 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Tabela 8), o melhor modelo de calibração obtido para o Ni foi a PI utilizando o Fe como padrão interno a com regressão inversa baseado na área e utilizando o tratamento espectral 3. Comparando os valores de recuperação de Ni obtidos pelos modelos direto e inverso para as mesmas amostras de sedimentos (Figura 21f) e considerando que os valores aceitáveis de recuperação estão entre 80% e 120%, observa-se que a maioria das amostras ficaram dentro da faixa ótima de recuperação empregando a PI com regressão inversa.

Além disso, os valores que ficaram fora da faixa aceitável para esse modelo de calibração ficaram mais próximos das faixas que limitam o intervalo de 80% a 120% do que para a PI com regressão direta.

Tabela 8 – Parâmetros de desempenho analítico

Parâmetro	Cr		Cu				Ni	
	CM regressão direta	CM regressão Inversa	CM regressão direta	CM regressão Inversa	PI regressão direta	PI regressão Inversa	PI regressão direta	PI regressão Inversa
<b>Comprimento de onda (nm)</b>	Cr I 357,87		Cu I 324,75		Cu I 324,75 / Ti II 324,85		Ni I 232,00 / Fe II 233,80	
<b>Tratamento espectral</b>	4	4	3	3	1	3	1	3
<b>Tipo de sinal</b>	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Altura	Altura
<b>Intervalo de trabalho (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	19,06 – 64,13		21,3 – 194,9				11,6 – 85,4	
<b>R</b>	0,5713	0,5713	0,7885	0,7885	0,7885	0,7937	0,7560	0,7531
<b>R<sup>2</sup></b>	0,3264	0,3264	0,6218	0,6218	0,6218	0,6299	0,5716	0,5672
<b>RMSEC (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	14,5	8,25	29,78	23,48	29,78	23,24	16,14	12,27
<b>RMSEV (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	15,58	7,54	16,58	14,56	17,58	14,53	12,32	8,29
<b>Amostras dentro da faixa de recuperação de 80% - 120% (%)</b>	67	93	47	73	47	60	40	53

Fonte: Autoria própria.



De acordo com a ANOVA da regressão, todos os modelos desenvolvidos (Tabela 8) podem ser utilizados para predição, uma vez que, o F calculado foi maior que o F tabelado. Esses resultados demonstram claramente a importância de avaliar diferentes estratégias de calibração de método para LIBS. Cada estratégia de calibração apresenta vantagens e limitações em contornar os efeitos de matriz, e sua escolha deve ser feita considerando as características intrínsecas das estratégias de calibração, dos analitos e amostras. Assim é possível obter excelentes parâmetros de desempenho analítico e determinações com exatidão e precisão satisfatórias.

### **3.3.3.2 Avaliação de risco ecológico e nível de poluição de sedimentos**

#### **3.3.3.2.1 Concentração de elementos potencialmente tóxicos em sedimentos**

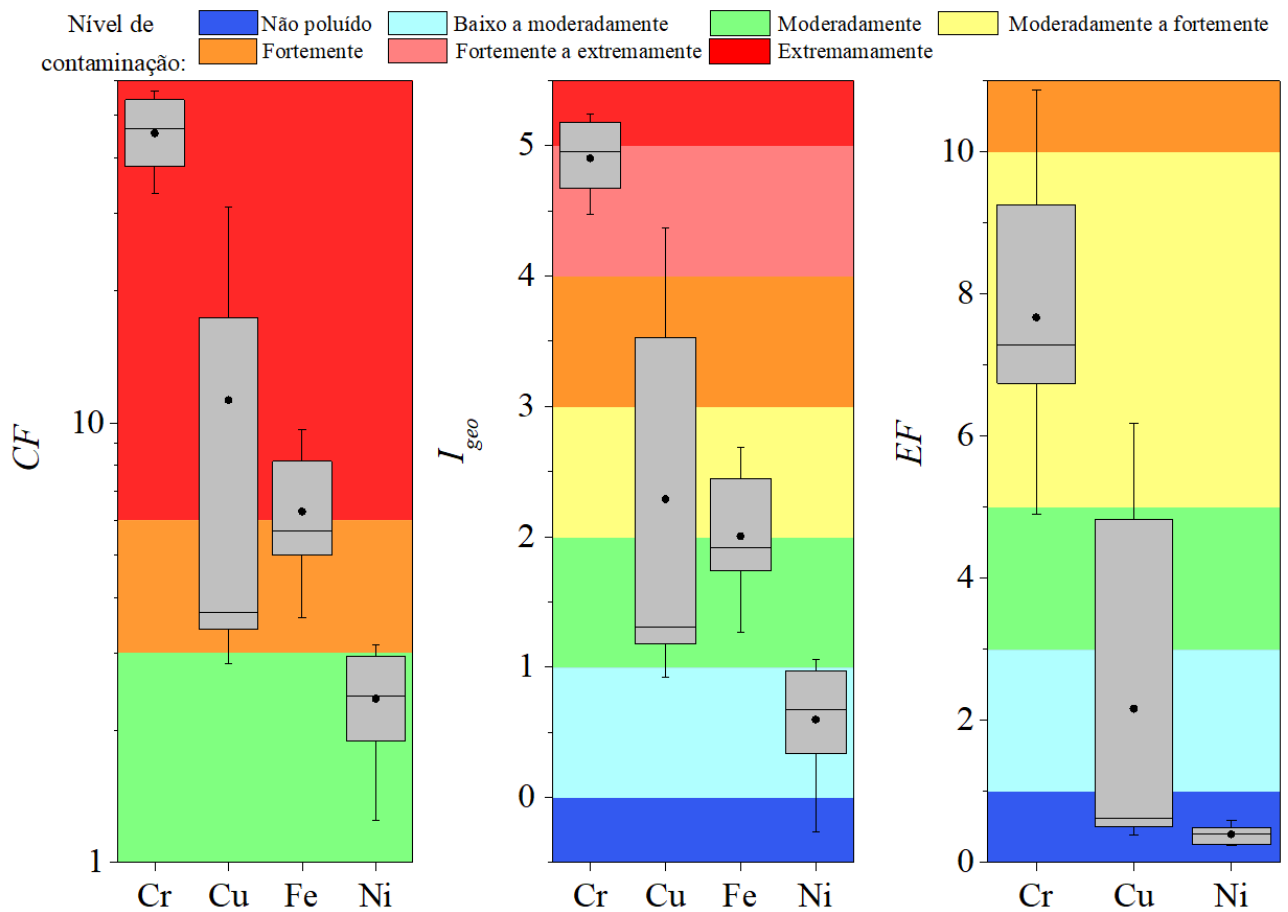
A avaliação da qualidade do sedimento foi realizada comparando as concentrações de PTEs com os valores padrões TEL e PEL de SQGs de água doce. Os resultados obtidos (Tabela 4A na seção apêndice) mostram que as concentrações de Cr na estação 6 e Cu nas estações 1 e 2 foram as únicas abaixo dos respectivos valores de TEL, não implicando em efeitos adversos ao meio ambiente causados por esses PTEs. Por outro lado, a maioria das estações de coleta (57,1% a 85,7%) apresentou concentrações de Ni, Cr e Cu entre os valores de TEL e PEL, sugerindo que a maior parte da área de estudo possui probabilidade moderada de efeitos adversos na biota. Os locais 4, 5 e 7 foram os únicos a apresentar altas possibilidades de detrimento do bioma associado às espécies de Ni, uma vez que suas concentrações foram superiores ao nível de efeito provável (PEL Ni > 36,00 mg kg<sup>-1</sup>).

#### **3.3.3.2.2 Índices simples**

Os níveis de poluição dos sedimentos relacionados às espécies químicas de forma independente foram avaliados por meio de índices simples. Os valores de CF, I<sub>geo</sub> e EF obtidos para o sedimento estão resumidos na Figura 22. A faixa de valores de CF para cada espécie química foi: Cr (33,27 a 56,84), Cu (2,83 a 30,91), Fe (3,60 a 9,64) e Ni (1,25 a 3,13). Esses resultados sugerem que o sedimento está extremamente poluído por espécies de Cr em todos os locais inspecionados. Os fatores de contaminação associados ao Cu variam consideravelmente na área estudada, apresentando um nível de poluição extremo nas estações de coleta no Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) e contaminações moderadas ou forte no Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3). As concentrações de Fe quantificadas nas amostras deste estudo são 3,60 a 9,64 vezes maiores do que as coletadas por BRAMORSKI (2004) 15 anos atrás. Como resultado, as estações 1, 3 e 7 exibem extrema interferência antropogênica, enquanto os outros locais

apresentam alta poluição por Fe ( $5,66 \geq CF \geq 3,60$ ). Por outro lado, a contaminação por Ni em todos os pontos de amostragem foi moderada, com exceção da estação 1 cujo valor de CF (3,13) indica uma alta contaminação por Ni.

Figura 22 – Boxplot de CF,  $I_{geo}$  e EF no sedimento. As caixas (box) representam os percentis 25, 50 (mediana) e 75, enquanto as hastes (bigodes ou whiskers) indicam os valores mínimo e máximo. Valores médios (●).



Fonte: Autoria própria.

Os valores  $I_{geo}$  calculados para todos os PTEs medidos mostraram as mesmas tendências identificadas pelo índice de fator de contaminação, mas com níveis de contaminação mais suaves na maioria dos casos. Os valores de  $I_{geo}$  entre 4,47 e 5,24 encontrados para Cr reforçam a interferência de atividades humanas altas a extremas em toda a área de estudo. Uma contaminação forte a extrema por Cu ( $I_{geo} = 4,36$ ) foi observada na estação 5, enquanto as estações 6 e 7 exibiram forte poluição. Diferentemente, as demais estações apresentam contaminação moderada ou de baixa a moderada ( $3 > I_{geo} \geq 1$ ). Da mesma forma que o CF, o índice  $I_{geo}$  sugere que as estações 1, 3 e 7 tiveram uma maior poluição por Fe. Por outro lado, a

contaminação por Ni é moderada apenas na estação 1 ( $I_{geo} = 1,06$ ), enquanto em outros pontos de amostragem é de baixa a moderada ou mesmo insignificante (estação 6).

Os valores de EF mostraram alto fator de enriquecimento ( $10 \leq EF < 25$ ) de Cr no sedimento da estação 5 de, enquanto as demais apresentaram enriquecimento de moderado a forte ou moderado (estação 3). Para o Cu, foi observada contaminação significativa dos sedimentos apenas no Rio Tietê (estações 5, 6 e 7), com níveis de moderado a forte, moderado e de baixo a moderado, respectivamente. Nenhum EF ( $EF < 1,5$ ) foi observado para a espécie química de Cu no Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3) e na confluência (estação 4) e para a espécie química de Ni em ambos os rios (todas estações). De acordo com Rocha *et al.* (2015),  $EF < 1,5$  sugere que as concentrações de PTEs são inteiramente derivadas de origens naturais ou intemperismo crustal.

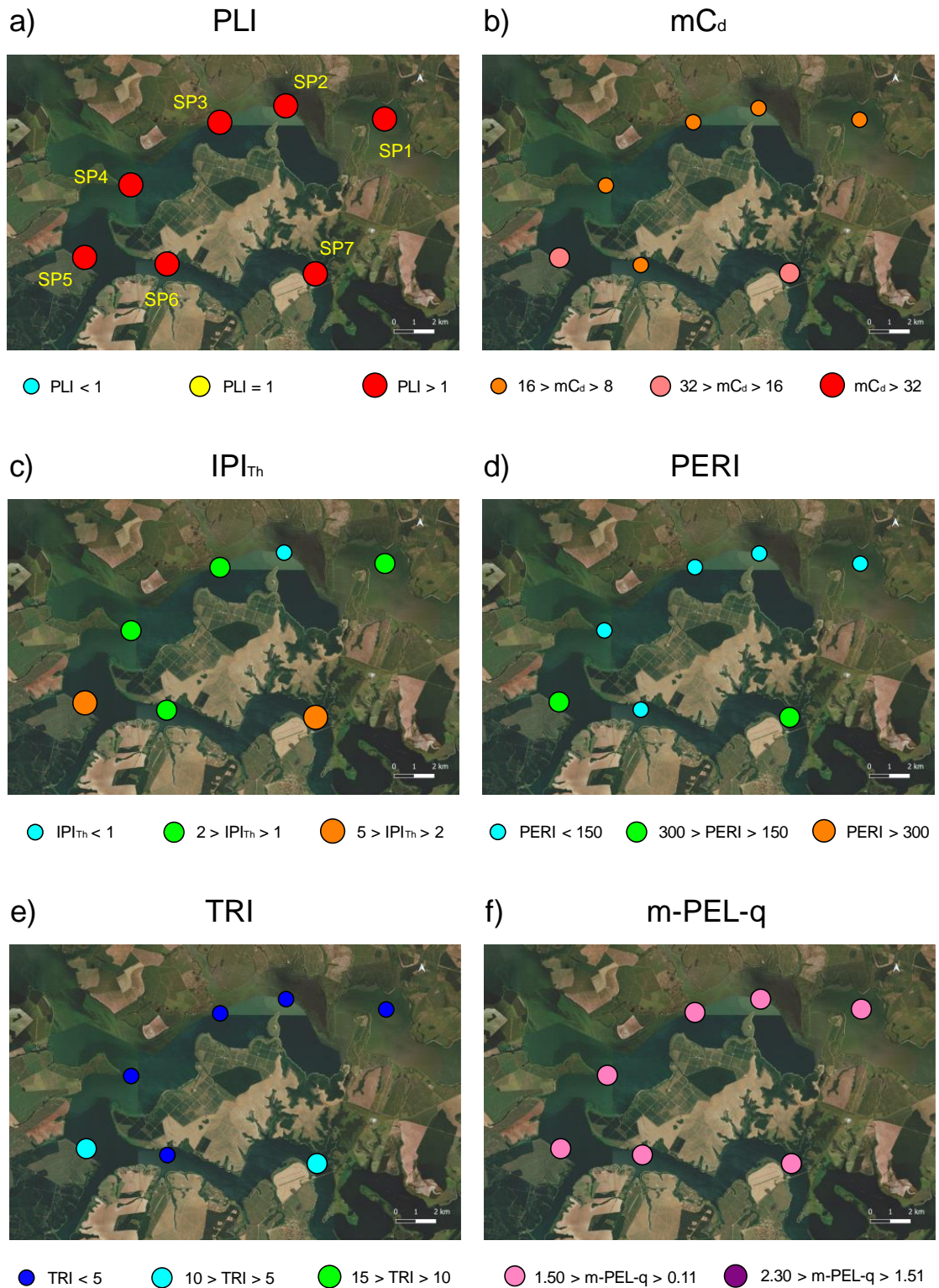
Os valores de EF para Cu e Ni não estão de acordo com os resultados de CF e  $I_{geo}$ . O índice EF leva em consideração a variação da concentração do elemento de referência (Fe) em seus cálculos (KESHAVARZI; KUMAR, 2019). Essa estratégia permite identificar se as concentrações de PTEs no sedimento são derivadas de fontes naturais ou antropogênicas (FAVARO *et al.*, 2018). Como mencionado anteriormente, a concentração de Fe aumentou consideravelmente desde 2002, sugerindo que uma parte significativa do aumento nas concentrações de Cr, Cu e Ni pode estar associada a fontes naturais, como intemperismo crustal. Mortatti *et al.* (2013) quantificaram a concentração de Ni em sedimentos coletados antes do reservatório de Barra Bonito do Rio Tietê e relacionaram o aumento da concentração de Ni com os óxidos de Fe e Mn e a fase geoquímica residual ou litogênica. Em outro trabalho, Mortatti, Moraes e Probst (2012) verificaram contribuições antrópicas significativas para as concentrações de Cu e Cr nos sedimentos também coletados próximo ao reservatório de Barra Bonito (Rio Tietê). Esses autores sugeriram ainda que as fontes mais prováveis de contaminação por Cu podem ser efluentes industriais ou o uso de  $CuSO_4$  para controlar a proliferação de algas em reservatórios de usinas hidrelétricas, enquanto as fontes de Cr são predominantemente de agroquímicos.

### 3.3.3.2.3 Índices combinados

Os níveis de contaminação total do sedimento e seus riscos ecológicos interligados para todas as estações de coleta foram avaliados usando os índices combinados, cujos resultados são mostrados na Figura 23 e Tabela 5A na seção apêndice. A avaliação geral da área de estudo foi obtida com base nos valores médios dos valores de PLI (8,44),  $mC_d$  (16,35),  $IPI_{Th}$  (1,68), PERI (159), TRI (3,82) e  $m-PEL-q$  (0,61). Esses resultados indicaram um nível de poluição de forte

a extremo considerando as concentrações regionais de fundo, moderada interferência antropogênica considerando os valores limites estipulados pelo BRASIL (2012) e riscos ecológicos insignificantes/baixos usando valores TEL e PEL nacionais e internacionais.

Figura 23 – Intervalos dos valores dos índices combinados (PLI,  $mC_d$ ,  $IPITh$ , PERI, TRI e  $m-PEL-q$ ) em cada ponto de amostragem.



Fonte: Autoria própria.

Mais especificamente, estações 1, 2 e 3 (Rio Piracicaba), 6 (Rio Tietê) e 4 (confluência) apresentaram alta interferência antrópica quando comparadas as concentrações de PTEs de 2002 e 2017 ( $15,73 \geq mC_d \geq 12,22$ ). As estações 5 e 7, localizados no Rio Tietê, apresentaram os maiores níveis de contaminação da área estudada ( $PLI = 12,53$  e  $11,06$ , respectivamente), exibindo níveis de poluição fortes a extremos.

Por outro lado, ao se considerar os valores limites de concentração definidos pela legislação brasileira, o sedimento parece ser um pouco menos afetado pelas atividades antropogênicas da região. Diferentemente da análise  $mC_d$ , o  $IPI_{Th}$  indicou interferência humana moderada nas estações 1, 2, 3, 4 e 6 ( $1,63 \geq IPI_{Th} \geq 0,97$ ). Embora a estação 2 tenha um valor  $IPI_{Th}$  classificável como baixo, este valor ( $0,97$ ) está muito próximo da fronteira de classificação moderada ( $IPI_{Th} \geq 1,00$ ). Mesmo utilizando os limites nacionais, as estações 5 e 7 apresentaram altos graus de poluição com valores de  $IPI_{Th}$  de  $2,82$  e  $2,38$ , respectivamente.

A avaliação de risco ecológico revelou uma divergência entre o risco ecológico calculado pelo PERI, que usa valores de fundo regionais, e TRI, que usa valores nacionais de TEL e PEL. A avaliação realizada pelo índice de risco ecológico potencial mostrou que as amostras coletadas no Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3) e na região de confluência (estação 4) apresentaram baixo risco ecológico ( $125,61 \geq PERI \geq 101,63$ ), enquanto no Rio Tietê são moderados. Por outro lado, os riscos para a flora e a fauna obtidos pelo TRI são desprezíveis ( $TRI < 5$ ) para as estações 1, 2, 3 e 4 e 6 e baixos para as estações 5 e 7 ( $TRI = 6,41$  e  $5,38$ , respectivamente). Finalmente, os valores de  $m-PEL-q$  calculados ficaram na faixa de  $0,11$  a  $1,50$  para todas as estações, indicando uma probabilidade baixa (25%) do sedimento ser tóxico e reforçando os baixos riscos ecológicos encontrados em toda a região estudada.

Em geral, os níveis de poluição aumentam na ordem estação 2 < 4 < 6 < 1 < 3 < 7 < 5, enquanto os riscos ecológicos aumentam na ordem estação 2 < 1 < 3 < 6 < 4 < 7 < 5. Esses resultados mostram um maior nível de contaminação do Rio Tietê em relação ao Rio Piracicaba, o que pode ser explicado pelo primeiro atravessar a cidade de São Paulo e receber suas grandes quantidades e diferentes tipos de efluentes (industriais, domésticos, hospitalares, entre outros).

### 3.4 Considerações parcial

Os parâmetros que influenciam a análise qualitativa multielementar de uma amostra de sedimento do Rio Piracicaba por SP LIBS (lasers de 1064 nm e 532 nm) foram otimizados usando um DCC para cada sistema, preservando a vantagem de ser uma técnica multielementar. No domínio experimental avaliado para as variáveis, a energia do laser (LE) teve pouca ou nenhuma influência na relação S/N dos elementos estudados, utilizando ambos os sistemas SP

LIBS. Independentemente do sistema, os valores máximos de pulsos acumulados (AP) e janela de integração (GW) maximizaram as respostas para a maioria dos elementos afetados por esses fatores. No entanto, para SP LIBS com laser de 1064 nm, o uso do tempo de atraso (DT) em seu valor mais baixo maximizou a relação S/N para a maioria dos elementos, enquanto para SP LIBS com laser de 532 nm, o maior valor deste fator maximizou a resposta para a maioria dos elementos.

O planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  para DP LIBS mostrou que a sequência de laser de 532–1064 nm forneceu um melhor desempenho, portanto, esse sistema foi otimizado usando um DCC. De acordo com os resultados obtidos pelo planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  com a sequência de laser de 532–1064 nm, os fatores GW, tempo de atraso entre os pulsos (ID) e DT tiveram os maiores efeitos na relação S/N, por isso, eles foram selecionados para refinar as condições ideais. Ao contrário de SP LIBS, a resposta foi maximizada no valor de GW mais baixo. O DT otimizado para DP LIBS foi o mesmo para SP LIBS com o laser de 1064 nm. Para os elementos afetados pelo ID, a maioria apresentou resposta máxima com o menor valor do ID.

O DOE permitiu descrever os efeitos combinados dos fatores na resposta utilizando um menor número de experimentos e, assim, economizando tempo e custos, quando comparados à otimização de um fator por vez. O DCC combinado com a técnica LIBS mostrou ser uma excelente ferramenta para otimizar os parâmetros que afetam a análise LIBS, e o planejamento fatorial fracionado se mostrou muito eficiente para triagem e decisão sobre quais fatores merecem um estudo mais aprofundado.

As técnicas SP LIBS com laser 1064 nm e DP LIBS com a sequência de lasers 532-1064 nm provaram ser ferramentas com potenciais para determinar TP em sedimentos de rios. Os métodos desenvolvidos apresentam forte correlação ( $> 0,91$ ) com os valores de referência, utilizando calibração linear univariada. O método desenvolvido usando DP LIBS 1064-532 nm é mais sensível, mas o método usando SP LIBS 1064 nm também demonstrou sensibilidade suficiente para determinação de TP em sedimentos de rios eutrofizados. Os métodos desenvolvidos têm potencial para serem utilizados por órgãos responsáveis pela preservação e restauração da qualidade dos ecossistemas aquáticos por meio do monitoramento do teor de TP nos sedimentos desses ambientes. Considerando um elevado número de pontos amostrados, a técnica LIBS pode ser implementada, pois elimina o uso de reagentes para o preparo da amostra, reduz o tempo e o custo da análise e não há geração de resíduos químicos. Portanto, propomos a utilização de técnicas LIBS para monitoramento de grandes áreas de rios, a fim de auxiliar no

desenvolvimento de tecnologias para tomada decisões para evitar a entrada de P em corpos d'água e para remediação desses ecossistemas.

A concentração de P determinada por ICP OES (valores de referência) foram concordantes com os resultados obtidos por SP e DP LIBS ao nível de confiança de 95% (teste t pareado). De acordo com esses resultados, observa-se uma diferença significativa no teor de TP dos testemunhos de sedimentos dos Rios Piracicaba e Tietê. A variabilidade do TP na distribuição vertical é maior no Rio Piracicaba do que no Rio Tietê. Esses resultados sugerem que a matéria intensamente suspensa transportada pelo Rio Tietê era homogênea, enquanto no Rio Piracicaba ela está aumentando das camadas mais profundas para as camadas mais superficiais.

Foi possível desenvolver modelos de calibração para Cr e Cu empregando a calibração por compatibilização de matriz (CM) e para Cu e Ni empregando a padronização interna (PI). Para ambas as estratégias de calibração, CM e PI, a regressão inversa apresentou o menor RMSEV. Além disso, a maioria das amostras dos conjuntos de validação apresentaram melhores valores de recuperação (entre 80% e 120%) nos modelos inversos.

Com os resultados obtidos das concentrações de Cr, Cu e Ni por DP LIBS e Fe (elemento de referência) por ICP OES foi possível fazer uma avaliação de risco ecológico completa dos sedimentos estudados. Visto que para os cálculos dos índices que precisam de valores de referência regionais foram usados os valores obtidos por BRAMORSKI (2004), a qual coletou amostras de sedimentos há 15 anos nos mesmos pontos coletados para este estudo. Dessa forma, foi possível avaliar o nível de poluição nessa região em relação ao tempo. Além disso, com os valores das concentrações de Fe das amostras de sedimentos, foram calculados índices que permitiram distinguir se o aumento da concentração dos PTEs foi por causas naturais ou antropogênicas.

## CAPÍTULO 4 – ANÁLISE MOLECULAR DA MATÉRIA ORGÂNICA E DA CLOROFILA A DOS SEDIMENTOS POR TÉCNICAS BASEADAS EM FLUORESCÊNCIA

### 4.1 Revisão bibliográfica

#### 4.1.1 Matéria orgânica em sedimentos

Os sedimentos consistem no acúmulo de partículas com diferentes propriedades físicas e químicas que são compostas por materiais inorgânicos e orgânicos. Essas partículas são transportadas por água, ar, erosão e processos de intemperismo e distribuídas ao longo dos rios (MURDOCH; MACKNIGHT, 1991; SCHORER; EISELE, 1997). Os sedimentos são biogeoquimicamente ativos devido à elevada presença microbiana e à entrada contínua de substâncias orgânicas e inorgânicas (HE *et al.*, 2019; KUMWIMBA *et al.*, 2017).

A MO dos sedimentos pode se originar de fontes externas (alóctones) ou do próprio ecossistema aquático (autóctones) (BRAILSFORD *et al.*, 2019; KINDLER *et al.*, 2011). Os rios são responsáveis em parte pela transferência de carbono (C) entre a biosfera terrestre e os oceanos, onde este elemento é transformado e armazenado (COLE *et al.*, 2007). O material orgânico resistente à ação microbiana e quaisquer produtos remanescentes de sua atividade são depositados no fundo dos rios, junto com os sedimentos terrestres (BURDIGE, 2007; HENRICHS, 1992). Nos sedimentos, os microrganismos consomem ou decompõem partículas orgânicas, reduzindo assim a massa da MO (BLOESCH, 2009). A MO é então mineralizada, alterada ou preservada durante a diagênese inicial, a qual registra o histórico de entrada (ENGEL; MACKO, 2013). Durante este processo, o consumo de oxigênio e de outros oxidantes ( $\text{NO}_3^-$ , Mn(IV), Fe(III),  $\text{SO}_4^{2-}$  e até a própria MO) da superfície em direção a profundidade do sedimento torna o ambiente ainda mais redutor, acumulando e fixando os metais de forma reduzida, assim formando um arquivo temporal, caso o sedimento não seja mecanicamente perturbado.

A mobilização e a qualidade dos sedimentos são parcialmente afetadas por ações antrópicas que causam grandes alterações no ambiente aquático (BLOESCH, 2009). A carga excessiva de nutrientes leva à eutrofização dos rios, que é um processo de aumento da carga de MO em um ecossistema aquático (NIXON, 1995). Em áreas com alta densidade populacional, as principais fontes de nutrientes são despejo de esgoto doméstico, efluente industrial e água drenada de áreas agrícolas (KUBO; KANDA, 2020; SMITH; ESPÍNDOLA; ROCHA, 2014). Sedimentos com alto teor de MO favorecem atividade de microrganismos aeróbicos, causando o consumo de oxigênio dos corpos aquáticos, sendo prejudicial a vida aquática (animais e plantas) (DUARTE, 1995).



No cenário atual de escassez de recursos hídricos, tanto em qualidade quanto em quantidade disponível para uso, é urgente a recuperação dos corpos d'água. Uma maneira de se fazer isso é se concentrar no uso de ferramentas para avaliar a qualidade da MO em sedimentos a fim de monitorar a saúde dos sistemas aquáticos e assim tomar medidas para a implementação de ações. A MO é uma pequena fração de massa do sedimento em comparação com a fração inorgânica. A extração é realizada no intuito de separá-la da fração inorgânica para obter informações sobre sua origem e qualidade, que quando analisadas diretamente não são possíveis, principalmente devido a presença de ferro e alumínio interferentes em análises como fluorescência molecular, ressonância magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrônica. Para isso, água ou diferentes extratores têm demonstrado potencial para determinar a qualidade e a origem da MO em sedimentos (BRYM *et al.*, 2014; FUNKEY; CONLEY; STEDMON, 2019). O meio aquoso neutro permite a extração de substâncias polares de baixo peso molecular, que são livres da fração mineral dos sedimentos. A extração alcalina favorece a extração de substâncias mais polares ou reativas, permitindo inclusive a extração de substâncias ligadas a minerais (OLK *et al.*, 2019). Sendo assim, as frações livres, polares e reativas em meio aquoso e alcalino são extraídas, restando somente uma fração orgânica insolúvel, hidrofóbica, associada fortemente aos minerais. Esta fração pode ser considerada uma MO mais inerte ou menos reativa, que dificilmente influenciará os processos químicos de reatividade no sedimento (GUIGUE *et al.*, 2014; MULLER *et al.*, 2014; OLK *et al.*, 2019).

A determinação das relações molares de C e N, razão C/N, podem ser úteis para identificar o tipo e às vezes a origem da MO (BURONE; MUNIZ; PIRES-VANIN, 2003; MEYERS, 1994), ao passo que determinar as propriedades ópticas da MO presente nos sedimentos também é uma maneira rápida e eficiente de avaliar a qualidade dos recursos hídricos e obter informações sobre as atividades antrópicas (DU *et al.*, 2021).

#### **4.1.2 Clorofila a como indicador de eutrofização**

A Chl-a é utilizada como indicador para avaliar a produção primária, que consiste na síntese de MO por um organismo autotrófico a partir de nutrientes, principalmente N e P (CASTILLO, 2020; SZYMCZAK-ZYŁA; KOWALEWSKA; LOUDA, 2011). O aumento da concentração de nutrientes nos corpos aquáticos, sejam de formas naturais ou antropogênicas, aumentam a produção primária, proporcionando a ocorrência do fenômeno de eutrofização, levando a efeitos ambientais negativos (GHAI *et al.*, 2012; KOWALEWSKA, 2005). A resiliência da Chl-a em sedimentos de rios eutrofizados está principalmente relacionada a ambientes anóxicos (VILLANUEVA; HASTINGS, 2000). A quantificação de Chl-a em

amostras de sedimentos é comumente feita através da sua extração com acetona e determinação por espectrofotometria UV-Vis (SANCHINI; GROSJEAN, 2020). Além disso, são reportados na literatura a determinação de Chl-a através da espectroscopia de reflectância no visível (RYDBERG *et al.*, 2020) e da cromatografia (BOON; DUINEVELD, 1998; KOWALEWSKA, 2005; SZYMCZAK-ZYŁA; KOWALEWSKA; LOUDA, 2011; VILLANUEVA; HASTINGS, 2000).

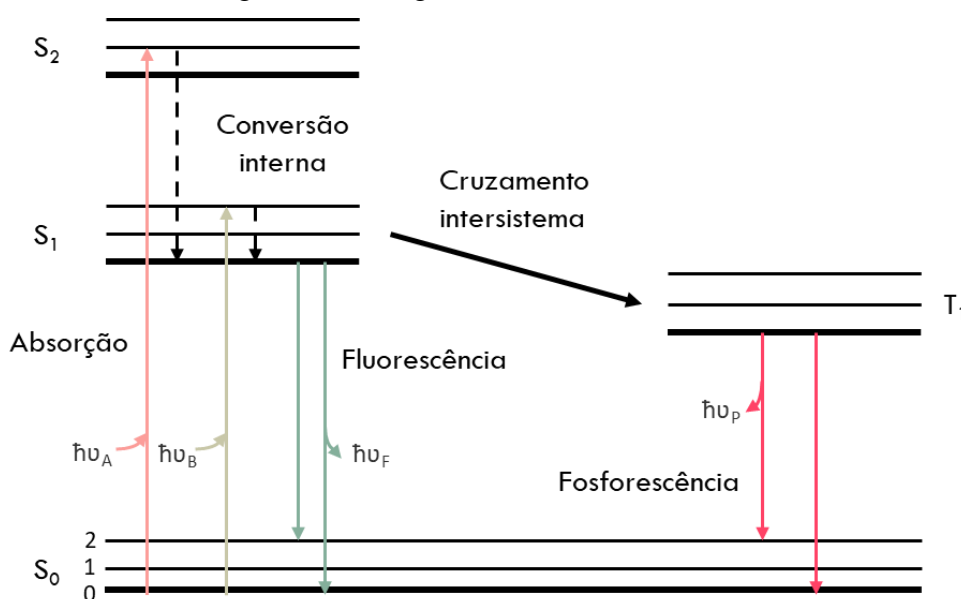
#### 4.1.3 Luminescência

A luminescência é um fenômeno de emissão de luz por uma substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados (LAKOWICZ, 2013). Esse fenômeno é subdividido em quatro categorias: (i) quimiluminescência: uma reação química fornece energia à molécula eletronicamente excitada, a qual emite luz ao retornar para um estado de menor energia (PIETRZYK; FRANK, 1979), quando a quimiluminescência é produzida por organismos vivos é denominada bioluminescência; (ii) termoluminescência: é a emissão de luz causada pelo aquecimento moderado de um material previamente exposto à radiação ionizante, geralmente ocorre abaixo da incandescência (CAPELLETTI, 2005); (iii) eletroluminescência: é a geração de luz não térmica pelo uso de um campo elétrico (DONOFRIO, 2005) e (iv) fotoluminescência: é um processo no qual uma molécula absorve um fóton na região visível, excitando um de seus elétrons a um estado de excitação eletrônica superior, e então irradia um fóton quando o elétron retorna a um estado de energia inferior (HERMAN, 1996).

Dependendo da natureza do estado excitado, a fotoluminescência é dividida em dois processos: fluorescência e fosforescência. A Figura 24 mostra o diagrama de Jablonski, o qual descreve os processos envolvendo a fluorescência e a fosforescência (LAKOWICZ, 2013). A fluorescência é o processo de decaimento radiativo que ocorre a partir do estado excitado de mais baixa energia ( $S^*_1$ ) após rápida relaxação energética através de estados vibracionais. Na fluorescência há emissão de luz rápida a partir de um estado excitado singleto, isso acontece quando a transição entre os estados superior e inferior é permitida, ou seja, o elétron é excitado e não muda sua orientação de spin, continuando desemparelhado ( $S^*_1 \rightarrow S_0$ ) (Figura 24) (HERMAN, 1996). Nesse processo, um material absorve luz em um comprimento de onda curto e de alta energia e emite luz em um comprimento de onda de energia inferior, geralmente visível. A fluorescência normalmente ocorre a partir de moléculas contendo átomos com pares de elétrons isolados como  $O_2$  e N ou sistemas insaturados conjugados aromáticos e/ou alifáticos com um alto grau de ressonância, ou seja, com deslocalização de elétrons, que são denominados de fluoróforos. Por isso, as técnicas baseadas na fluorescência são tão usadas na caracterização

na MO (SENESI *et al.*, 1991). A fosforescência é uma emissão relativamente lenta a partir de um estado excitado tripleto ( $T^*_1$ ) que ocorre quando a transição entre os dois estados é quanticamente proibida, ou seja, o elétron excitado muda a orientação de spin ficando emparelhado com o elétron que permaneceu no orbital de menor energia (uma transição entre estados de diferentes multiplicidades de spin), como acontece entre os estados de tripleto de spin e singleto ( $T^*_1 \rightarrow S_0$ ) (Figura 24) (HERMAN, 1996).

Figura 24 – Diagrama de Jablonski.



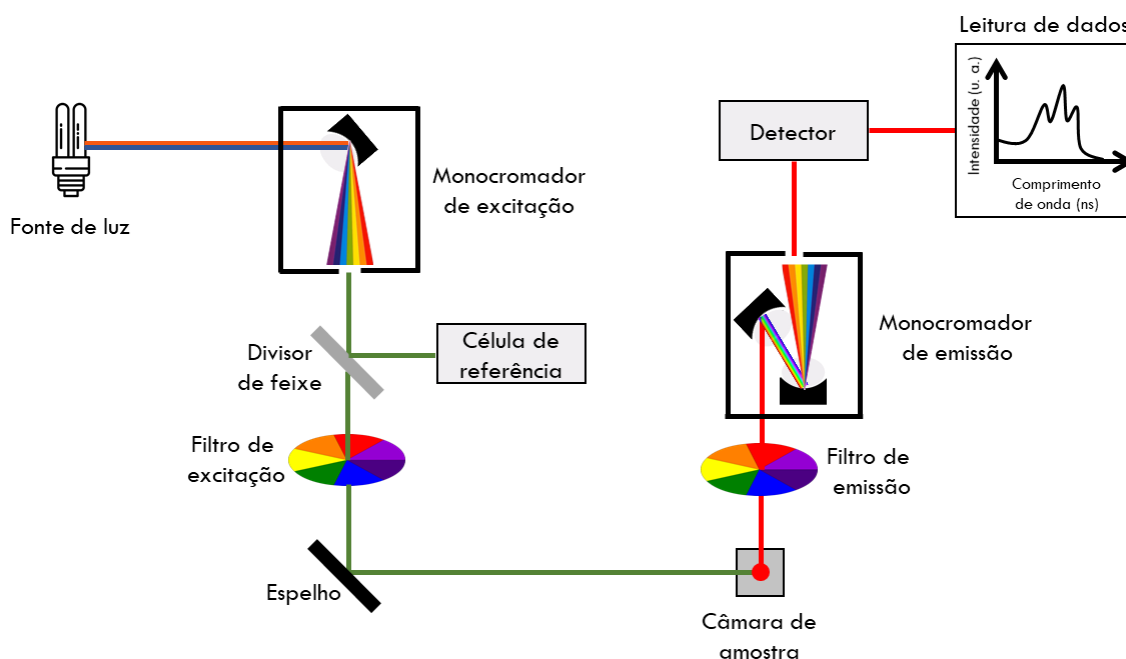
Fonte: Adaptado de Lakowicz (2013).

#### 4.1.4 Espectroscopia de fluorescência convencional

Os fluorímetros permitem registrar espectros de excitação e emissão (ZWINKELS; DEROSE; LELAND, 2014). Um espectro de excitação é medido fixando um comprimento de emissão no detector, geralmente o pico de emissão do analito. Enquanto, um espectro de emissão é a distribuição de comprimento de onda de uma emissão medida em um único comprimento de onda de excitação. Na Figura 25 é mostrado um esquema geral da configuração de um fluorímetro. Ele é composto por uma fonte de excitação, que geralmente é uma lâmpada de Xe devido a sua alta intensidade em todos os comprimentos de onda que variam de 250-700 nm. A seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão é feita por meio de dois monocromadores, um monocromador de excitação e outro de emissão, respectivamente. No meio do caminho do feixe de excitação há um divisor de feixes que reflete parte da luz para a amostra e outra parte para a célula de referência que mede a intensidade de excitação. Os filtros

ópticos de excitação e emissão removem comprimentos de onda indesejados no feixe de excitação e a luz espalhada do canal de emissão, respectivamente. A fluorescência emitida ( $I_F$ ) é detectada com tubos fotomultiplicadores, normalizada à intensidade de referência ( $I_0$ ) e quantificada com os dispositivos eletrônicos apropriados (LAKOWICZ, 2013; ZWINKELS; DEROSE; LELAND, 2014).

Figura 25 – Esquema geral da configuração de um fluorímetro.



Fonte: Adaptado de Lakowicz (2013).

As intensidades de fluorescência, em soluções diluídas, são proporcionais à concentração em uma faixa limitada de densidades ópticas (Equação 6).

$$I_F(\lambda_{EX}, \lambda_{EM}) = I_0(\lambda_{EX}) \cdot K \cdot \gamma(\lambda_{EM}) \cdot \Phi \cdot \varepsilon(\lambda_{EX}) \cdot C \cdot l \quad (6)$$

Com  $K$  constante de aparelho,  $I_0(\lambda_{EX})$  a intensidade de excitação,  $\gamma(\lambda_{EM})$  a probabilidade de emissão (espectro de emissão),  $\Phi$  o rendimento quântico,  $\varepsilon(\lambda_{EX})$  o coeficiente de absorção ( $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$ ),  $l$  o caminho óptico (cm) e  $C$  a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Em altas concentrações, alguns fluoróforos podem ser obscurecidos por dois fenômenos de absorção chamados de efeitos de filtro interno (MOBED *et al.*, 1996; TUCKER; AMSZI; ACREE, 1992). O primeiro, denominado efeito de filtro interno primário, é uma atenuação do feixe de excitação antes de atingir a região de interrogação, devido à absorção pelos fluoróforos

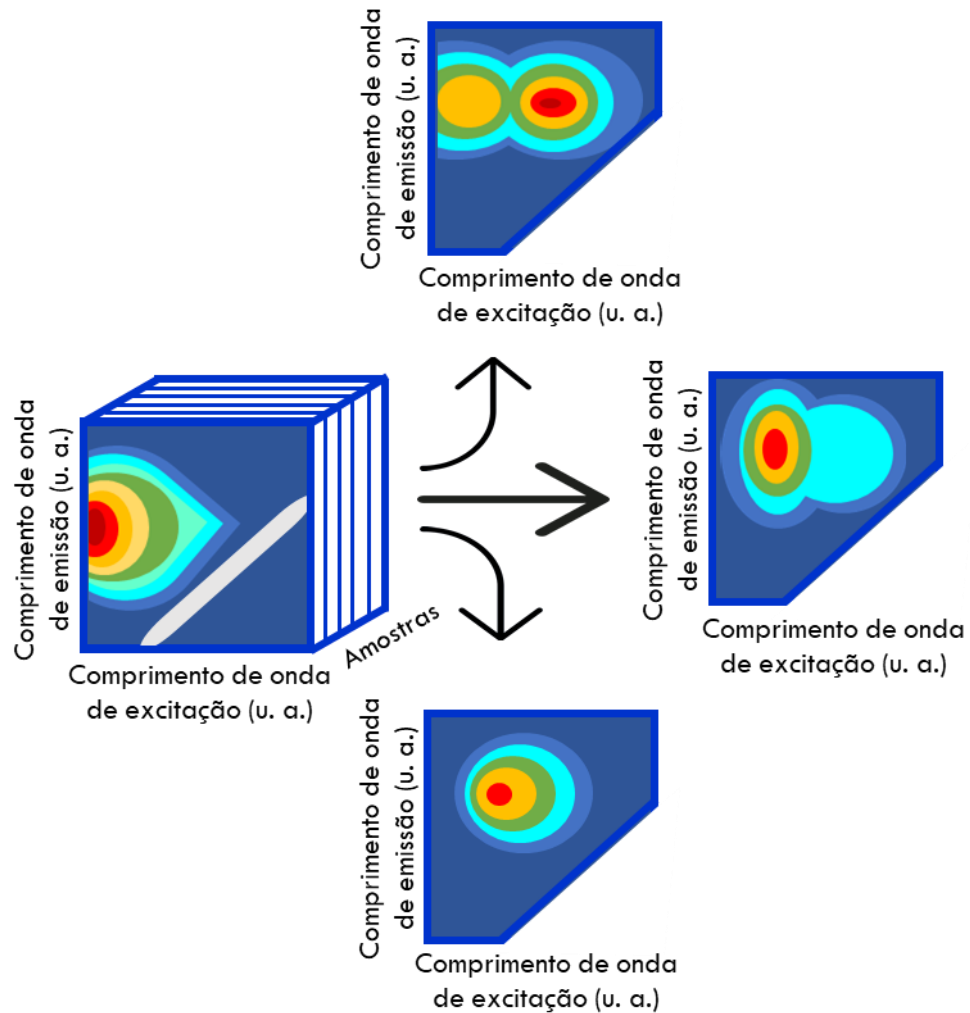
na solução. O segundo fenômeno, o efeito de filtro interno secundário, resulta da absorção da radiação fluorescente emitida por outros fluoróforos em solução. Esses efeitos podem diminuir a intensidade da excitação no ponto de observação ou diminuir a fluorescência observada por absorção da fluorescência (MOBED *et al.*, 1996). A importância relativa de cada processo depende das densidades ópticas da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão. Como resultado desses efeitos, a forma dos espectros de fluorescência pode ser distorcida, causando a não-linearidade em curvas de calibração em fluorescência e levando a interpretações errôneas (TUCKER; AMSZI; ACREE, 1992). Para reduzir os efeitos de filtro interno pode-se utilizar dois métodos: a diluição da amostra (ZEPP; SHELDON; MORAN, 2004) ou correções matemáticas dos espectros (KOTHAWALA *et al.*, 2013).

#### 4.1.4.1 Fluorescência no modo matriz excitação-emissão

A fluorescência no modo matriz excitação-emissão (EEM) é uma medida específica no campo da espectroscopia de fluorescência. Para obtenção dos espectros nessa modalidade é feita uma varredura tridimensional que resulta em um gráfico de contorno de comprimento de onda de excitação *versus* comprimento de onda de emissão *versus* intensidade de fluorescência. A EEM representa o mapa das dupla  $IF(\lambda_{EX}, \lambda_{EM})$ . Para a sua aquisição, é possível juntar numa matriz vários espectros de emissão feitos por diferentes comprimentos de onda de excitação, vários espectros de excitação feitos por diferentes comprimentos de onda de emissão e o fluorímetro o permite medir intensidade de emissão de fluorescência por cada dupla  $IF(\lambda_{EX}, \lambda_{EM})$  (ZWINKELS; DEROSE; LELAND, 2014). A EEM é bastante utilizada para acessar as informações composicionais da MO dos sistemas aquáticos, com o intuito de avaliar as frações fluorescentes que a compõe e inferir os processos responsáveis de sua formação, naturais ou antropogênicos (MCKNIGHT *et al.*, 2001).

Cada EEM representa a fluorescência total de um número desconhecido de fluoróforos que em condições ideais fluorescem independentemente de acordo com a lei de Beer-Lambert, mas em condições não ideais podem interagir (BOGUTA; PIECZYWEK; SOKOŁOWSKA, 2016; MURPHY *et al.*, 2014). A decomposição matemática de conjuntos de dados EEM usando PARAFAC reduz o conjunto de dados EEM em um pequeno número de gráficos de contorno, denominados componentes fluorescentes, cada uma com um espectro de excitação e emissão característicos (Figura 26) (MURPHY *et al.*, 2013). A soma das componentes fluorescentes de cada amostra reconstrói o espectro EEM. (MURPHY *et al.*, 2014; MURPHY; BRO; STEDMON, 2014).

Figura 26 – Conjunto de dados EEM decompostos em três componentes fluorescentes usando PARAFAC.



Fonte: Adaptado de Murphy *et al.* (2013).

O número de componentes fluorescentes em um modelo PARAFAC é definido pelo diagnóstico de consistência de núcleo (CORCONDIA, do inglês *core consistency diagnostic*) (BRO; KIERS, 2003). Um valor do CORCONDIA elevado, próximo de 100%, resulta em um menor número de componentes fluorescentes. Conforme se amplia a possibilidade de obter mais componentes fluorescentes o CORCONDIA diminui e implica em um risco dos componentes fluorescentes determinados não estarem presentes em todas as amostras.

#### 4.1.4.2 Supressão de fluorescência

A intensidade de fluorescência pode ser diminuída ou eliminada devido às interações da espécie fluorescente com outras espécies químicas que aumentam a probabilidade do decaimento do estado excitado por vias não radiativas (LAKOWICZ, 2013). Esse fenômeno é denominado supressão de fluorescência e pode ser estático ou dinâmico. A supressão estática envolve um processo de equilíbrio de complexação no qual os complexos fluorescentes do fluoróforo, no estado fundamental, reagem com um inibidor para formar complexos não fluorescentes do fluoróforo. A eficiência da supressão estática depende da taxa de formação das espécies não fluorescentes e pela concentração do inibidor (MANCIULEA; BAKER; LEAD, 2009). A supressão dinâmica é um processo colisional, na qual o complexo fluorescente do fluoróforo e o inibidor, que pode ser um metal, entram em contato durante o tempo de vida do estado excitado e envolve a transferência de energia. A eficiência da supressão dinâmica depende da viscosidade da solução, da vida útil do estado excitado, do complexo fluorescente, do fluoróforo e da concentração do inibidor (MANCIULEA; BAKER; LEAD, 2009).

A ligação metal-ligante tem grande importância biogeoquímica, visto que a MO interage com os metais do ambiente, principalmente por meio da complexação. Os PTEs, como Cu, Cr, Ni, Cd, Hg, Pb, entre outros, são complexados pela MO. O Cu é um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento de todas as plantas e animais aquáticos, no entanto, em excesso pode se tornar tóxico (YRUELA, 2005). A complexação do metal com ligantes orgânicos pode amenizar a toxicidade do metal devido a diminuição da concentração do metal livre (BOYD *et al.*, 2005) e/ou aumentar a solubilidade do metal na água (LIU, X.; MILLERO, 2002). A formação de complexos de metal com ligantes orgânicos afeta a fluorescência da MO devido a supressão estática. A supressão dinâmica não é tão significativa para concentrações de metais muito diluídas, porém o aumento da temperatura pode aumentar a importância desse fenômeno (OSBURN; DEL VECCHIO; BOYD, 2014).

Por meio da titulação de supressão de fluorescência, o modelo de equilíbrio 1:1 proposto por Ryan e Weber (1982) permite calcular a constante de estabilidade condicional ( $K_{ML}$ ), que é a força da interação metal-ligante, para complexos metal-ligante orgânico como mostrado na Equação 7:



onde, M é o metal livre, L é o ligante (sítio de complexação livre) e ML é o complexo formado. Em um determinado pH, a  $K_{ML}$  pode ser apresentada de acordo com a Equação 8:

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M] + [L]} \quad (8)$$

onde, [ML] é a concentração do complexo formado ( $\text{mol L}^{-1}$ ), [M] é a concentração do metal livre ( $\text{mol L}^{-1}$ ) e [L] é a concentração do ligante ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Os balanços de massa do metal e do ligante podem ser descritos de acordo com as equações 9 e 10, respectivamente:

$$C_M = [ML] + [M] \quad (9)$$

$$C_L = [ML] + [L] \quad (10)$$

onde,  $C_M$  é a concentração de metal total em  $\text{mol L}^{-1}$  e  $C_L$  é a concentração total de sítios ligantes em  $\text{mol L}^{-1}$ . A capacidade de complexação (CC em  $\mu\text{mol de sítios mg}^{-1} \text{ C}$ ), que é a quantidade de sítios capazes de participar da interação metal-ligante por carbono, pode ser calculada empregando a razão  $C_L$  ( $\mu\text{mol de sítios L}^{-1}$ ) e o teor de C correspondente a cada amostra ( $\text{mg}^{-1} \text{ C L}^{-1}$ ).

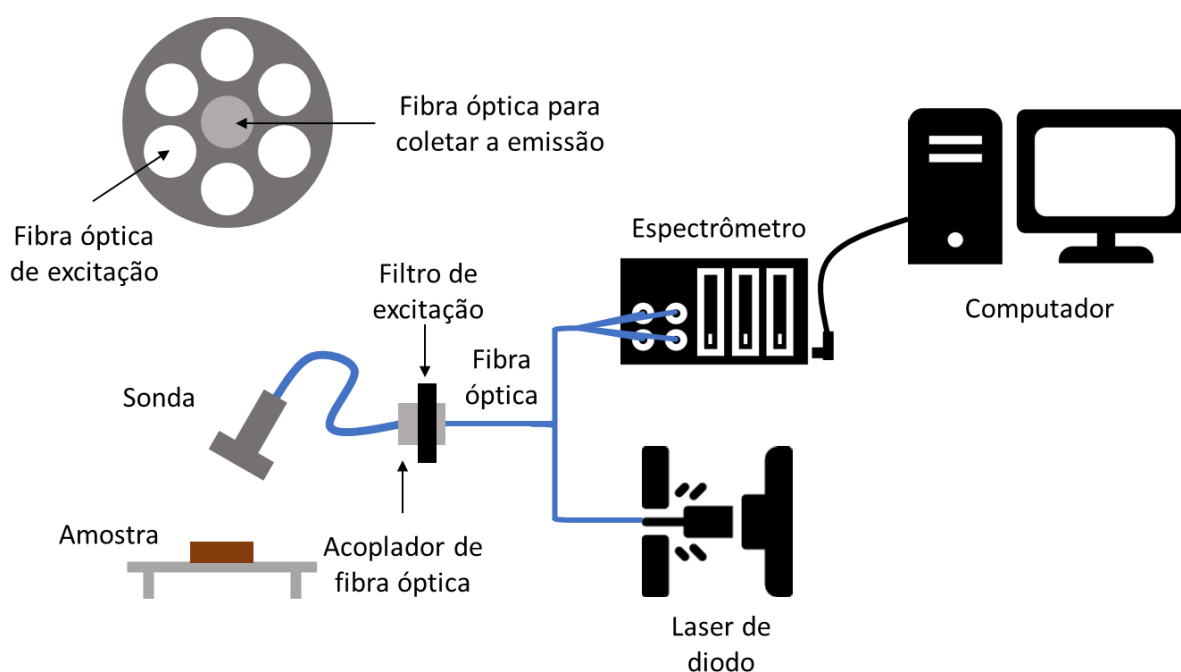
#### 4.1.5 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser

O termo espectroscopia de fluorescência ou espectroscopia de fluorescência convencional é utilizado para indicar que a fonte de excitação é uma lâmpada. Quando a fonte de excitação é um laser, o termo utilizado é espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS). A técnica LIFS apresenta uma melhor relação sinal ruído porque os lasers de diodo emitem radiação monocromática, de alta intensidade, direcional e oscilação do campo magnético bem definido, além disso, estão disponíveis com comprimentos de onda variando de 405 a 1500 nm e a saída é facilmente focalizada e manipulada e pode ser pulsada ou modulada em até vários GHz (LAKOWICZ, 2013; MILORI *et al.*, 2014).



A técnica LIFS tem sido usada para avaliar a qualidade da MO do solo por meio do espectro de emissão, que tem mostrado relação direta com a aromaticidade da MO (MILORI *et al.*, 2006; TADINI *et al.*, 2018, 2021). O fenômeno de fluorescência ocorre em sistemas que permitem a transição de elétrons  $n$  ou  $\pi$  para orbitais  $\pi^*$ , como os de sistemas aromáticos (SENESI *et al.*, 1991), cujo a intensidade do espectro está relacionada ao número de espécies excitadas. O sistema LIFS comumente empregado para análise de MO do solo, representado na Figura 27, é constituído por um laser de diodo contínuo na região azul para excitar os fluoróforos presentes nas amostras; uma sonda contendo um sistema de fibras ópticas: seis fibras para direcionar o feixe de laser para a superfície da amostra (fibras ópticas de excitação) e uma fibra central para coletar a emissão de fluorescência das espécies excitadas (fibra óptica para coletar a emissão); um acoplador de fibra óptica; um filtro de excitação; uma fibra óptica bifurcada; espectrômetro; e um computador (MILORI *et al.*, 2006; TIVET *et al.*, 2013).

Figura 27 – Esquema geral de um sistema LIFS.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.1.6 Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) é uma técnica que tem sido aplicada nos últimos anos para obter imagens de fluorescência de amostras com alta resolução espacial e espectro de emissão de fluorescência para cada pixel da imagem (LORÉN; LANGTON; HERMANSSON, 2007). A CLSM pode fornecer informações relevantes sobre a

concentração e a distribuição espacial dos fluoróforos em uma amostra (COLETTA *et al.*, 2013).

Um microscópio de fluorescência é um microscópio convencional com lentes convergentes e iluminação monocromática apropriada para excitar os fluoróforos presentes na amostra. Quando um *pinhole* é posicionado antes do detector há somente a passagem de luz provinda do ponto focal das lentes, então o microscópio de fluorescência é chamado de microscópio confocal. Este tipo de microscópio utiliza filtros ópticos para adquirir apenas a luz emitida pela espécie de interesse para formar a imagem de fluorescência da amostra e essa fluorescência é normalmente captado na geometria de reflectância. Esses microscópios são chamados de invertidos quando a amostra é iluminada por baixo e de direita quando é iluminado por cima. Na CLSM, a luz proveniente do laser é direcionada para a amostra através de espelhos de varredura e lentes. Quando o feixe de laser atinge a amostra, é gerada a fluorescência, a qual é coletada pelo mesmo caminho da luz de excitação passando ainda por filtros ópticos para excluir a reflexão do laser e pelo *pinhole* para excluir a fluorescência proveniente de fora do ponto focal (PAWLEY, 2006).

## **4.2 Avaliação da matéria orgânica por EEM e supressão de fluorescência**

### **4.2.1 Procedimento experimental**

#### **4.2.1.1 Análise Elementar**

O teor de carbono total (TC, do inglês *total carbon*) das amostras de sedimento foi avaliado usando o método de combustão a seco. Para isso, 20 mg das amostras de sedimentos previamente homogeneizadas como descrito na seção 2.2 foram pesadas com precisão diretamente nas cápsulas de estanho. O padrão usado na análise foi o ácido aspártico, e o método foi validado usando um material de referência certificado de solo (Soil Reference Material NC PN338 40025, ThermoFisher Scientific). Todas as medidas foram realizadas em um analisador elementar (Flash 2000; ThermoFisher Scientific).

#### **4.2.1.2 Caracterização da matéria orgânica extraída das amostras de sedimentos**

##### **4.2.1.2.1 Extração**

A MO dos sedimentos extraída em meio alcalino foi denominada EOMSed (matéria orgânica extraída dos sedimentos). Aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi colocado em frascos de polipropileno com 45,0 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (ThermoFisher Scientific) e agitado por 24 h em um agitador rotativo (Reax 20, Heidolph) a 10 rpm. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (Sigma 3-18K, Grosseron) a 10.000 rpm por 10 min e filtradas em filtros

de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Minisart NML, Sartorius). Além disso, outro método de extração foi conduzido da mesma forma ao descrito anteriormente com 45,0 mL de água deionizada (Ultrapure Water Cell, Starna Ltd) e a MO dos sedimentos extraída em meio aquoso foi denominada WEOM Sed (matéria orgânica extraída dos sedimentos com água).

#### **4.2.1.2.2 Determinação de carbono orgânico não-purgável e nitrogênio orgânico total**

O carbono orgânico não-purgável (NPOC, do inglês *non-purgeable organic carbon*) e o nitrogênio orgânico total (TON, do inglês *total organic nitrogen*) da EOM Sed foram quantificados após diluição com água ultrapura para se ajustar à curva de calibração NPOC padrão (máximo 30  $\text{mg L}^{-1}$  de C). Os extratos foram acidificados, verificando que não tem precipitados e medidos em um analisador elementar (TOC-V, Shimadzu). As razões molares NPOC/TON foram calculadas. O rendimento da extração foi obtido dividindo a quantidade de carbono orgânico (OC, do inglês *organic carbon*) na solução extraída em mg (NPOC foi corrigido pela diluição e multiplicado pelo volume de extração) pelo teor de C no sedimento correspondente em mg (TC foi multiplicado pela massa de amostra pesada para a extração).

#### **4.2.1.2.3 Espectroscopia UV-Vis**

As medidas de absorvância foram realizadas para todas as amostras de EOM Sed e WEOM Sed usando um espectrofotômetro UV-Vis de feixe duplo (UV 1800, Shimadzu) com uma faixa de comprimento de onda de 200 a 700 nm em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e uma velocidade de varredura de 300  $\text{nm min}^{-1}$ . Uma cubeta de referência de NaOH 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  e água deionizada foi usada para medir EOM Sed e WEOM Sed, respectivamente. A partir das medidas de absorvância, foi possível definir o fator de diluição para fluorescência. Assim, todas as amostras tiveram a absorvância ajustada para 0,1 a 254 nm, permitindo assim suas comparações evitando o efeito de filtro interno para a análise de fluorescência (KOTHAWALA *et al.*, 2013). A absorvância ultravioleta específica a 254 nm ( $\text{SUVA}_{254}$ , do inglês *specific ultraviolet absorbance at 254 nm*) foi calculada dividindo a absorvância ultravioleta medida a 254 nm pela concentração de NPOC ( $\text{mg de C L}^{-1}$ ) e o caminho óptico da cubeta (0,01 m) (WEISHAAR *et al.*, 2003).

#### **4.2.1.2.4 Análise estatística**

O teste t não pareado foi usado para determinar qualquer diferença estatística entre o TC em sedimentos intactos dos Rios Tietê e Piracicaba e o NPOC, o TON, as razões molares NPOC/TON e os valores de  $\text{SUVA}_{254}$  obtido para a EOM Sed dos Rios Tietê e Piracicaba. O

coeficiente de correlação entre as razões molares NPOC/TON e os valores de  $SUVA_{254}$  foi calculado.

#### **4.2.1.2.5 EEM**

##### **4.2.1.2.5.1 Preparo e análise das amostras por EEM**

Para o estudo de EEM, 1,0 mL de cada amostra diluída para absorvância em 254 nm igual a 0,1 (caminho óptico de 1 cm) foi colocada em cubetas de quartzo junto com 1,0 mL de HEPES 0,3 mol L<sup>-1</sup> (Acros Organics) para regular o pH a 7 e 1,5 mL de NaClO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) com pureza de 99,99% para controlar a força iônica. As amostras foram analisadas imediatamente após a preparação.

Todos os espectros medidos foram obtidos com um espectrofluorímetro (F4500, Hitachi). Os espectros EEM foram adquiridos com uma faixa de excitação de 200 a 500 nm com um passo de 5 nm e uma faixa de emissão de 250 a 700 nm a uma velocidade de varredura de 2400 nm min<sup>-1</sup>. As abertura da fenda de emissão e excitação foram fixadas em 5 nm, e a voltagem do detector era 700 V. Ambos os detectores de emissão e excitação foram corrigidos para evitar a sensibilidade ao comprimento de onda e a resposta da fotomultiplicadora foi corrigida da flutuação da lâmpada de excitação com o sinal de referência. O espectro Raman da água deionizada (Ultrapure Water Cell, Starna Ltd) foi medido diariamente com excitação a 350 nm, velocidade de varredura a 240 nm min<sup>-1</sup>, emissão de 360 a 420 nm e fenda de excitação e emissão fixada em 5 nm e 700 V para normalizar a intensidade dos espectros EEM com o pico de espalhamento Raman (LAWAETZ; STEDMON, 2009).

##### **4.2.1.2.5.2 Análise dos dados EEM**

O PARAFAC foi realizado no conjunto de dados EEM usando o software PROGMEEF (REDON; MOUNIER, 2018) em linguagem Matlab. Todos os dados de EEMs foram limpos dos sinais de difusão usando o espalhamento Rayleigh através do corte da banda de difusão em 15 nm e usando o espalhamento Raman de primeira e segunda ordem por meio da aplicação do método Zeep (MOUNIER *et al.*, 2011; ZEPP; SHELDON; MORAN, 2004). O número de componentes avaliadas variou de 2 a 5 em uma faixa espectral de 240 a 500 nm em excitação e de 250 a 700 nm em emissão. O número de componentes foi definido usando o CORCONDIA. A classificação ótima foi o modelo que deu o maior número de componentes com um CORCONDIA acima de 60% (MOUNIER *et al.*, 2011). A excitação e a emissão de componentes obtidos pelo PARAFAC foram comparadas com o banco de dados OpenFluor (MURPHY *et al.*, 2014).

#### **4.2.1.2.6 Supressão de fluorescência**

##### **4.2.1.2.6.1 Preparo e análise das amostras por supressão de fluorescência**

A interação da EOMSed com Cu(II) foi avaliada usando supressão de fluorescência. Para isso, o estudo da capacidade de complexação da MO extraída com NaOH com Cu(II) foi realizado usando 15 cubetas com concentrações crescentes de Cu(II). Cada cubeta continha 1,0 mL de amostra de EOMSed diluída para absorvância em 254 nm igual a 0,1 (caminho óptico de 1 cm) em meio tamponado com pH 7,0 ajustado com 1,0 mL de HEPES 0,3 mol L<sup>-1</sup> (Acros Organics) e 0,2 mL de HClO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich). A titulação de Cu(II) foi realizada pela adição de soluções estoque contendo 5x10<sup>-5</sup>, 5x10<sup>-4</sup>, 5x10<sup>-3</sup> mg L<sup>-1</sup> de Cu preparadas com Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) e NaClO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich) foi usado para completar o volume final de 3,5 mL. Este procedimento foi realizado para as 69 amostras de EOMSed. Os espectros EEM foram obtidos de acordo com a descrição na seção 4.2.1.2.5.1.

##### **4.2.1.2.6.2 Análise dos dados de supressão de fluorescência**

O PARAFAC foi realizado como descrito na seção 4.2.1.2.5.2. As K<sub>ML</sub> dos complexos EOMSed-Cu(II) foram calculadas de acordo com o modelo de equilíbrio 1:1 proposto por Ryan e Weber (RYAN; WEBER, 1982). A variação entre os valores teóricos e experimentais para a supressão de fluorescência foi verificada com o BIAS, que é a soma do valor absoluto da diferença entre o logaritmo da intensidade de fluorescência experimental e o logaritmo da intensidade de fluorescência calculada (MOUNIER *et al.*, 2011). Para melhor comparação entre as K<sub>ML</sub> dos complexos formados os logaritmos das K<sub>ML</sub> foram calculados. As capacidades de complexação (CC) foram calculadas empregando a razão da concentração total de sítios ligantes (C<sub>L</sub>) dos componentes fluorescente e o teor de NPOC correspondente a cada amostra.

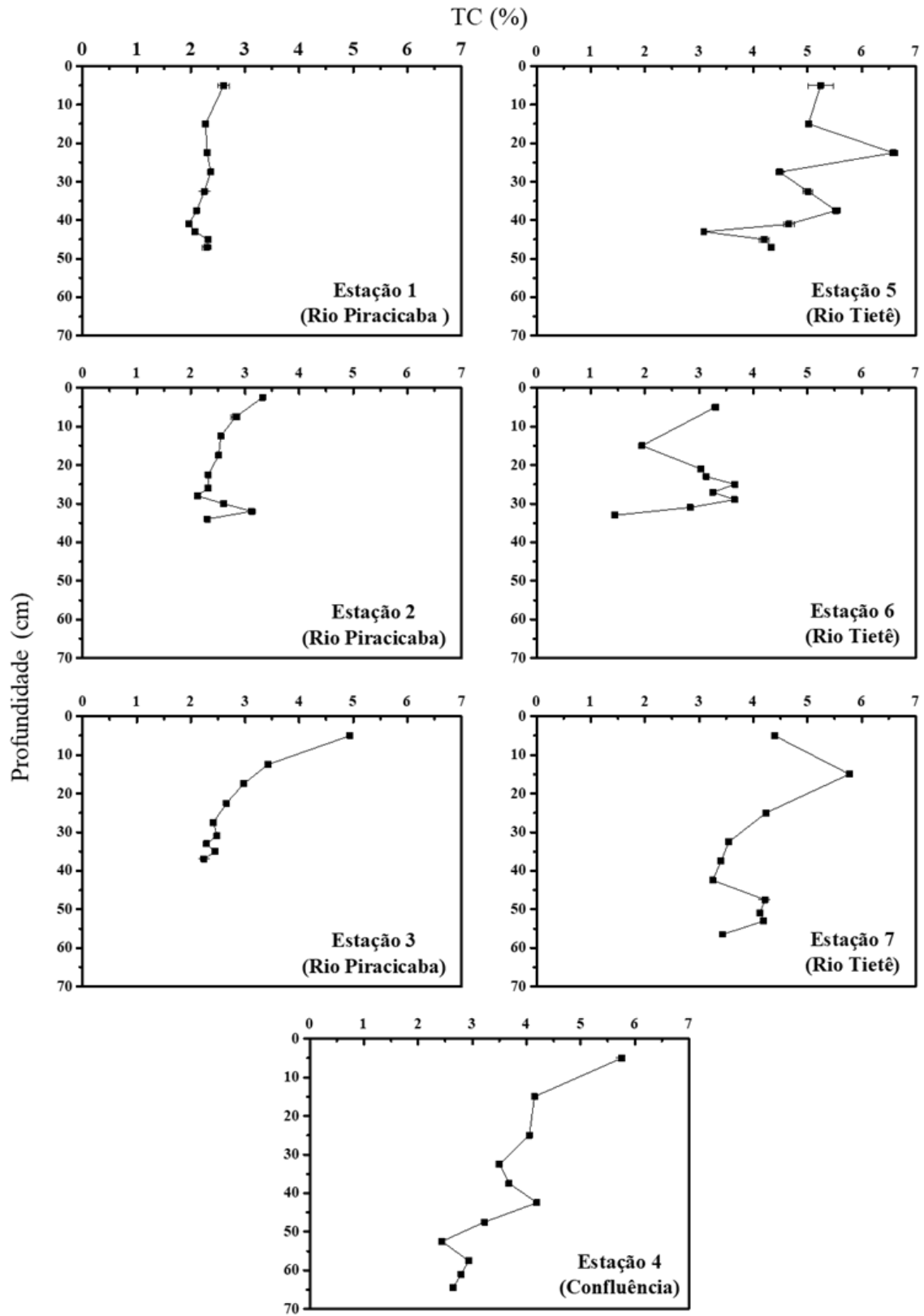
## **4.2.2 Resultados e discussão**

### **4.2.2.1 Características do carbono total nos sedimentos inteiros**

As distribuições do conteúdo de TC nos testemunhos de sedimentos inteiros nos Rios Piracicaba e Tietê foram diferentes (Figura 28). Nas estações de coleta do Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3), o maior valor de TC foi encontrado na camada superior dos testemunhos de sedimentos, e uma diminuição do teor de TC foi observada nas camadas inferiores da distribuição vertical. Na estação 1, o TC variou de 1,96% a 2,60% (CV = 0,10), sendo o menor valor na profundidade de 41 cm. Na estação 2, o TC variou de 2,12% a 3,32% (CV = 0,15), e apesar da diminuição do TC nas camadas inferiores do sedimento, foi possível observar um aumento do teor de TC entre as profundidades de 30 cm e 32 cm. Na estação 3, o TC variou de

2,24% a 4,94% ( $CV = 0,30$ ), embora tenha diminuído exponencialmente da superfície até a profundidade de 27,5 cm, a partir dessa profundidade, permaneceu quase constante. Na região da confluência, o TC variou de 2,44% a 5,76% ( $CV = 0,27$ ), embora o maior teor de TC seja encontrado na camada superficial, como nas estações de coleta do Rio Piracicaba, seu comportamento é mais semelhante ao das estações coletas localizadas no Rio Tietê, que apresentaram distribuição perturbada de TC nas camadas mais profundas dos testemunhos. A distribuição do TC no Rio Tietê variou de 3,09% a 6,59% ( $CV = 0,19$ ), de 1,44% a 3,66% ( $CV = 0,26$ ) e de 3,25% a 5,77% ( $CV = 0,19$ ) nas estações 5, 6 e 7, respectivamente.

Figura 28 – Distribuição de TC dentro dos testemunhos de sedimentos nas estações de coleta.



Fonte: Autoria própria.

O conteúdo de TC é um parâmetro fundamental para descrever a abundância de MO e C inorgânico nos sedimentos (VERES, 2002). A distribuição aleatória de TC no rio Tietê pode estar associada a uma entrada irregular de MO e C inorgânico. Um teste t não-pareado com um nível de confiança de 95% mostrou que havia diferenças significativas entre o TC médio dos rios. O teor médio de TC no Rio Tietê ( $3,96\% \pm 1,11\%$ ) é estatisticamente maior do que no Rio Piracicaba ( $2,57\% \pm 0,58\%$ ). O maior teor de TC para o Rio Tietê sugere que este rio é mais eutrofizado que o Rio Piracicaba, pois o acúmulo de nutrientes, principalmente P e N, nos corpos aquáticos aumenta a síntese de MO (CASTILLO, 2020). Essa hipótese é confirmada pelo estudo sobre a quantificação do TP descrito na seção 3.3.2 (DE MORAIS *et al.*, 2021b). Como o TP é uma variável química usada para avaliar a carga de nutrientes e a extensão da eutrofização em corpos d'água, o maior teor médio de TP no Rio Tietê ( $4316,16 \pm 1062,63 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ) do que no Rio Piracicaba ( $1800,17 \pm 696,82 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ) indica que o Rio Tietê apresenta maior grau de eutrofização (DE MORAIS *et al.*, 2021b).

#### **4.2.2.2 Características da matéria orgânica extraída com NaOH dos sedimentos**

A Tabela 9 mostra a concentração média de NPOC e TON, o rendimento de extração alcalina, a razão molar NPOC/TON e os valores de  $SUVA_{254}$  para a EOMSed nas diferentes estações. Esses valores para cada amostra são mostrados na Tabela 6A na seção apêndice. O método de extração com solução alcalina extraiu em média  $40,71\% \pm 5,52\%$  da MO presente nos sedimentos a inteiros. O rendimento da extração da MO depende da propriedade do solvente utilizado e geralmente é baixo. Entre os diferentes solventes usados para extração de MO, o NaOH parece ser um dos mais eficientes (KUREK *et al.*, 2020; SIRE *et al.*, 2009).



Tabela 9 – Concentração média de carbono orgânico não-purgável (NPOC) e nitrogênio orgânico total (TON), rendimento de extração alcalina, razão molar NPOC/TON e absorvância ultravioleta específica a 254 nm (SUVA<sub>254</sub>) da matéria orgânica extraída de sedimentos nas estações de coleta.

<b>Estação</b>	<b>NPOC (mg C g<sup>-1</sup>)</b>	<b>TON (mg N g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento de extração (%)</b>	<b>Razão molar NPOC/TON</b>	<b>SUVA<sub>254</sub> (L mg<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	9,02±0,84	1,14±0,11	40,63±5,17	6,80±0,20	6,36±0,53
<b>2</b>	10,65±1,71	1,25±0,24	41,03±3,58	7,37±1,00	5,99±0,69
<b>3</b>	12,59±1,98	1,75±0,38	45,23±6,56	6,22±0,49	6,11±1,08
<b>4</b>	13,54±4,82	2,40±0,76	37,17±5,61	4,78±0,30	4,54±0,73
<b>5</b>	19,60±5,74	3,01±0,74	40,11±5,17	5,53±0,50	3,92±0,61
<b>6</b>	11,90±3,54	2,00±0,52	40,50±3,96	5,05±0,37	3,70±0,51
<b>7</b>	16,24±2,31	2,51±0,45	41,05±6,36	5,59±0,32	4,44±0,83

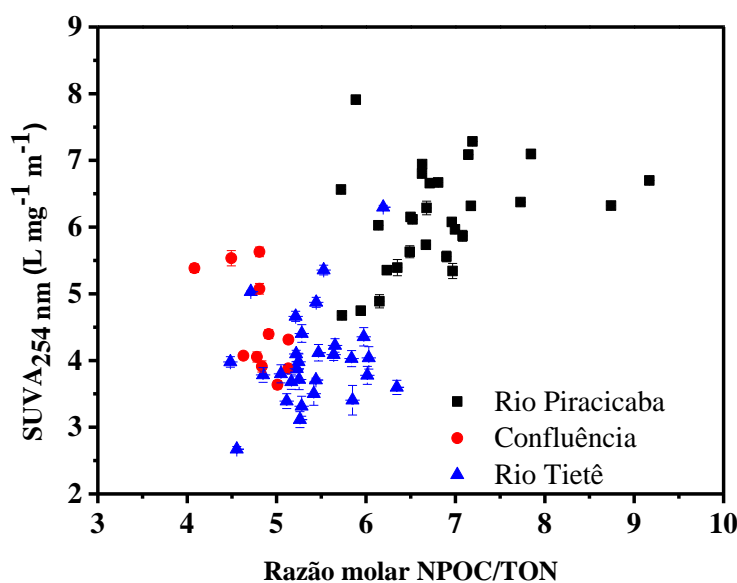
Fonte: Autoria própria.

Um teste t não-pareado com nível de confiança de 95% demonstrou que houve diferenças significativas entre as médias de NPOC e TON da EOM Sed dos Rios Tietê e Piracicaba. A concentração média de NPOC e TON de EOM Sed no Rio Tietê ( $16,05 \pm 5,10$  mg C g<sup>-1</sup> e  $2,52 \pm 0,70$  mg N g<sup>-1</sup>, respectivamente) foi maior do que no Rio Piracicaba ( $10,69 \pm 2,11$  mg C g<sup>-1</sup> e  $1,37 \pm 0,37$  mg N g<sup>-1</sup>, respectivamente). As maiores concentrações de NPOC na EOM Sed do Rio Tietê podem ser devido ao fato desse rio passar pela região metropolitana de São Paulo, onde recebe uma grande carga de esgoto doméstico e efluentes industriais, resultando em uma DBO maior do que a Rio Piracicaba (CETESB, 2018). Além disso, levando em consideração a história do rio Tietê, seu alto grau de contaminação (ROCHA *et al.*, 2010, 2011) e eutrofização (DE MORAIS *et al.*, 2021b), a maior concentração de TON na EOM Sed do Rio Tietê quando comparada com o Rio Piracicaba pode ser devido ao lançamento de esgoto contendo MO lábil e fresca.

As razões molares NPOC/TON médias na EOM Sed dos Rios Tietê e Piracicaba foram também estatisticamente diferentes (nível de confiança de 95%, teste t não-pareado) e foram maiores para o Rio Piracicaba ( $6,80 \pm 0,79$ ) em comparação com o Rio Tietê ( $5,39 \pm 0,46$ ). Considerando o curso histórico do Rio Tietê e seu alto grau de eutrofização (DE MORAIS *et al.*, 2021b), as menores proporções encontradas neste rio sugerem um aporte maior de MO simples com estruturas nitrogenadas, o que pode indicar aporte de efluente. Na região da

confluência, a razão molar NPOC/TON da EOMSed foi a mais baixa:  $4,78 \pm 0,30$ . O menor valor da razão molar NPOC/TON mostra um aumento na deposição de MO com estruturas nitrogenadas, sugerindo que a região de confluência é predominantemente influenciada pelo Rio Tietê, que apresentou as maiores concentrações de N (faixa de 2,00 a 3,01 mg N g<sup>-1</sup>). Apesar da diferença nas razões molares NPOC/TON da EOMSed entre os Rios Tietê e Piracicaba, a EOMSed estudado apresentou uma razão molar NPOC/TON que variou de 4,1 a 9,2 (Figura 29). As razões molares NPOC/TON entre 4 e 10 categorizam as fontes de C e N de algas e plantas aquáticas (KAUSHAL; BINFORD, 1999; MEYERS, 1994).

Figura 29 – Relação entre absorvância ultravioleta específica a 254 nm (SUVA<sub>254</sub>) e razão molar carbono orgânico não-purgável (NPOC) e nitrogênio orgânico total (TON) da matéria orgânica extraída de sedimentos.



**Fonte:** Autoria própria.

A SUVA<sub>254</sub> está associada à aromaticidade da MO devido à ligação dupla de carbono (C=C) de frações aromáticas ou anéis aromáticos policondensados que absorvem luz em 254 nm (EDZWALD; TOBIASON, 2011). Portanto, altos valores de SUVA<sub>254</sub> indicam uma MO formada por mais estruturas que absorvem luz em 254 nm por unidade de concentração de OC (EDZWALD; TOBIASON, 2011). Os valores médios de SUVA<sub>254</sub> da EOMSed nos Rios Piracicaba e Tietê foram estatisticamente diferentes (nível de confiança de 95%, teste t não-pareado) e foram maiores para o Rio Piracicaba ( $6,16 \pm 0,78$ ) do que para o Rio Tietê ( $4,02 \pm$

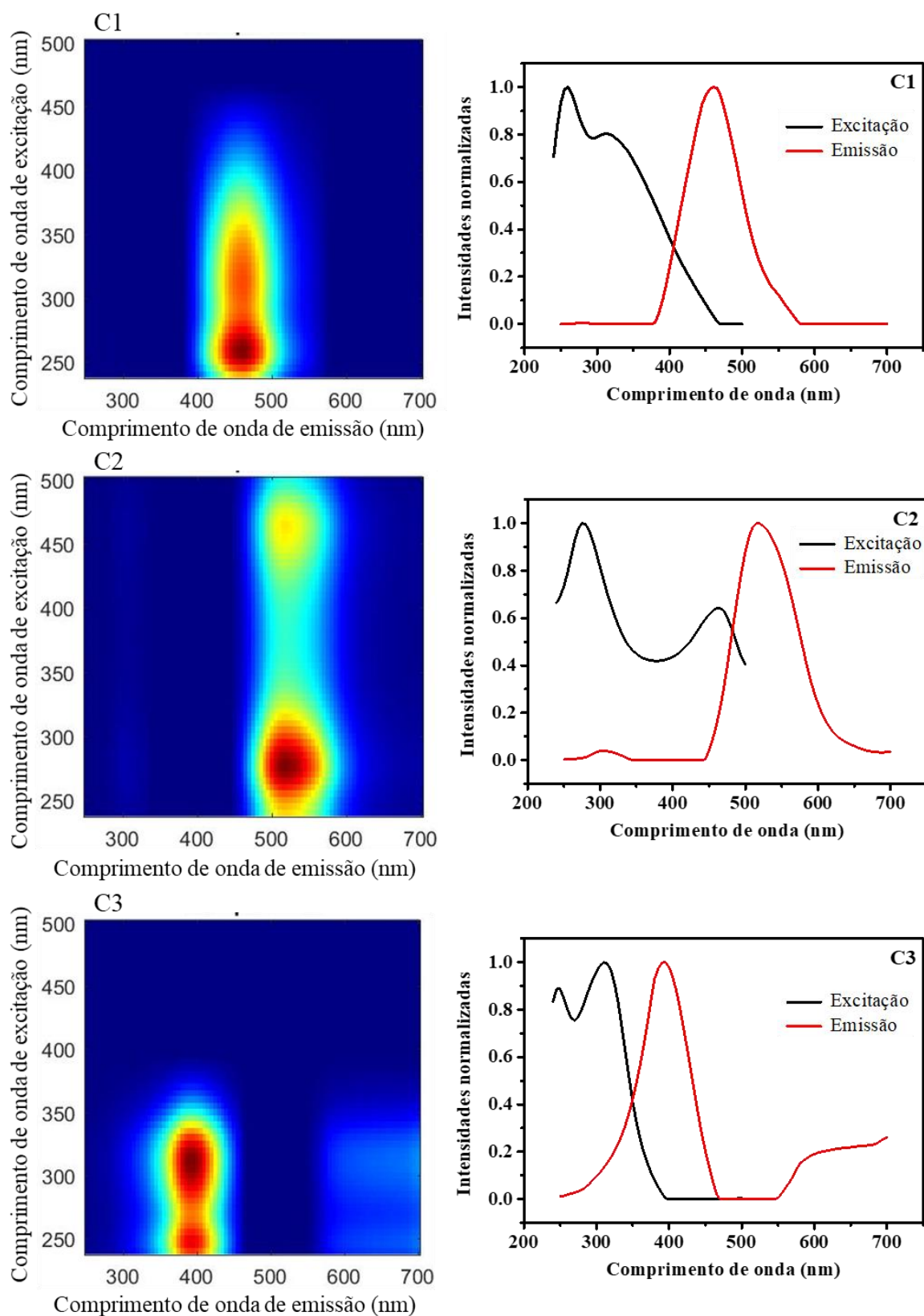
0,71). A região de confluência apresentou valores de  $SUVA_{254}$  da EOMSed mais próximos do Rio Tietê (os valores médios de  $SUVA_{254}$  foram  $4,54 \pm 0,71 \text{ L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ). A  $SUVA_{254}$  apresentou diferenças na composição da EOMSed entre os dois rios, com os maiores valores médios de  $SUVA_{254}$  para o Rio Piracicaba indicando que EOMSed tem um conteúdo aromático relativamente alto em comparação com o Rio Tietê.

As razões molares NPOC/TON da EOMSed foram correlacionadas com os valores de  $SUVA_{254}$  (Figura 29). A análise de regressão encontrou uma relação positiva entre a razão molar NPOC/TON e  $SUVA_{254}$  ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,001$ ). Por analogia à MO do solo, esses resultados podem estar associados à complexidade funcional da EOMSed (DUNGAIT *et al.*, 2012; LEHMANN *et al.*, 2020). Durante a degradação da MO, as estruturas mais polares são mais acessíveis aos microrganismos e, portanto, são consumidas mais rapidamente, resultando em um acúmulo de MO que é termodinamicamente desfavorável aos microrganismos (frações hidrofóbicas e aromáticas). A presença relativamente menor de N sugere que essas estruturas já foram totalmente ou parcialmente assimiladas, resultando na preservação seletiva e no acúmulo de estruturas mais estáveis quimicamente, o que levou a uma maior aromaticidade no Rio Piracicaba. Por outro lado, o menor valor da  $SUVA_{254}$  e da razão molar NPOC/TON no Rio Tietê sugere a adição de MO fresca. Essa evidência é suportada pelo alto valor de DBO do Rio Tietê.

#### **4.2.2.3 Espectros EEM da matéria orgânica**

O modelo PARAFAC ajustado para os espectros EEM ( $n = 138$ ) da EOMSed e WEOMSed diluídos na mesma densidade óptica resultou em três componentes fluorescentes (Figura 30) com CORCONDIA de 89,98%. As características espectrais dos três componentes foram comparadas com o banco de dados OpenFluor (MURPHY *et al.*, 2014) e a similaridade foi medida com os modelos PARAFAC de diferentes ambientes aquáticos usando a pontuação de similaridade de 0,95. Os componentes 1, 2 e 3 corresponderam respectivamente a 35, 5 e 25 modelos PARAFAC do banco de dados OpenFluor.

Figura 30 - Gráficos de contorno EEM das três componentes do modelo PARAFAC (esquerda) e seus espectros de excitação e emissão (direita).



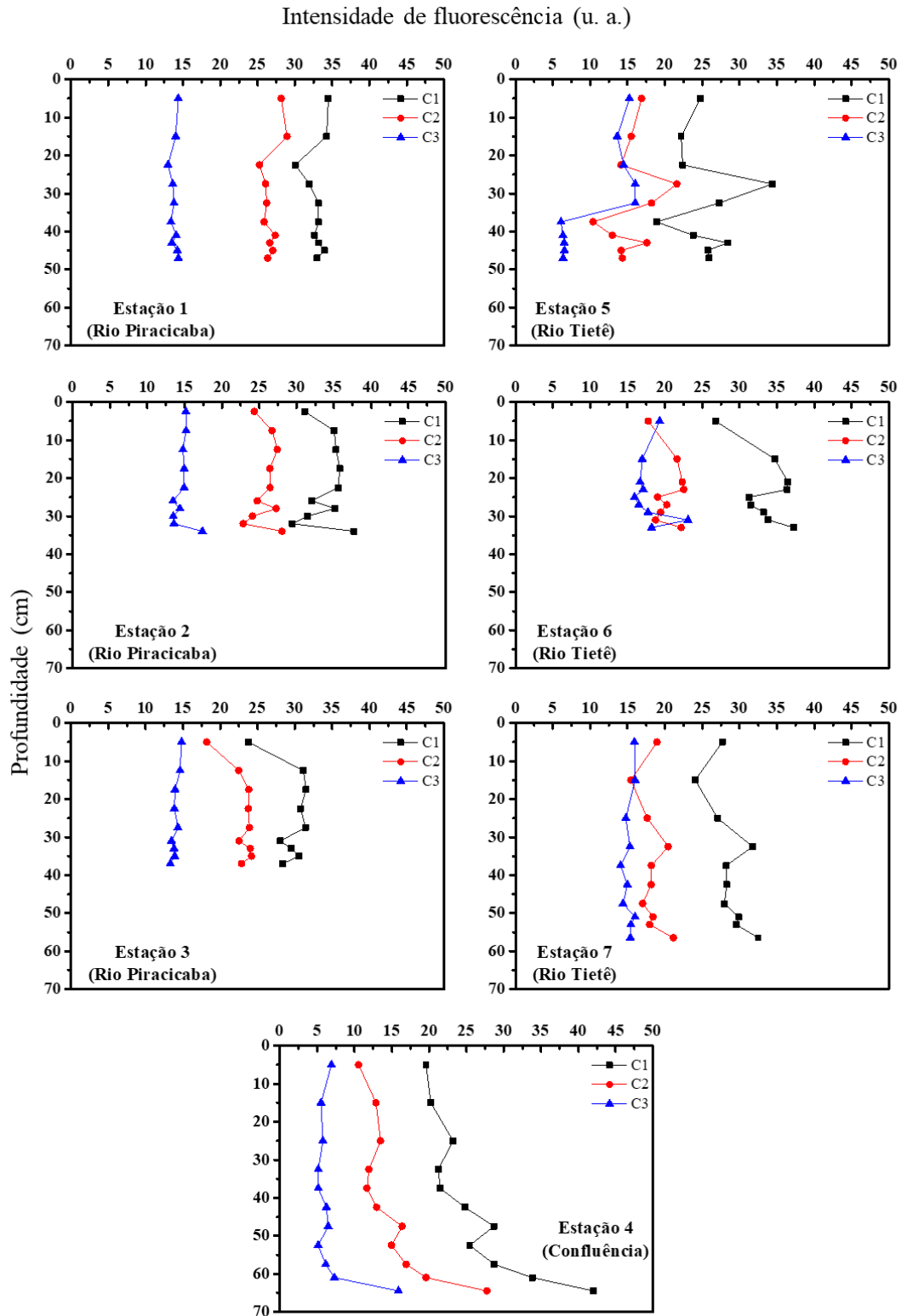
Fonte: Autoria própria.

O componente 1 (C1) apresentou dois máximos de excitação: um em 260 nm estimulado por excitação ultravioleta (pico A) e o outro em 310 nm estimulado por excitação visível, com um máximo de emissão na faixa visível em 465 nm para ambos os picos de excitação (COBLE, 1996). O componente 2 (C2) era composto por dois máximos de excitação, um em 285 nm e outro em 465 nm, e um máximo de emissão em 520 nm (OSBURN *et al.*, 2011; WALKER; AMON; STEDMON, 2013). A emissão de fluorescência é útil para acessar o arranjo estrutural da MO devido à emissão de fluoróforo em comprimento de onda curto (desvio para o azul ou *blue-shift*) ou longo (desvio para o vermelho ou *red-shift*). C1 e C2 apresentaram características semelhantes aos ácidos fúlvico e húmico do solo, respectivamente. C1 se assemelha aos ácidos fúlvicos devido à emissão de comprimento de onda mais curto e o componente deslocada para o azul é atribuído ao peso molecular mais baixo e um arranjo estrutural composto por mais frações alquil (BORISOVER *et al.*, 2009; KOWALCZUK *et al.*, 2009; OSBURN *et al.*, 2011; SHUTOVA *et al.*, 2014; YAMASHITA *et al.*, 2010b, 2010a). C2 se assemelha aos ácidos húmicos do solo devido ao componente deslocado para o vermelho, que é atribuído a um arranjo estrutural mais complexo composto principalmente de frações aromáticas (SILVA *et al.*, 2020). Além disso, a mudança no comprimento de onda diz respeito à agregação de estruturas húmicas em solução; uma estrutura húmica deslocada para o vermelho pode mostrar um arranjo molecular com agregação molecular mais alta, enquanto um comprimento de onda mais curto sugere moléculas menores (BENTO *et al.*, 2020; BOGUTA; SOKOŁOWSKA, 2016, 2020). O componente 3 (C3) demonstrou dois máximos de excitação, um em 250 nm e outro em 315 nm, e um máximo de emissão em 395 nm. C3 assemelhava-se a compostos microbianos semelhantes a húmicos de ambientes aquáticos (COBLE, 1996; OSBURN *et al.*, 2011). Este componente é provavelmente um produto da atividade microbiana e, portanto, de origem autóctone (YAMASHITA *et al.*, 2008).

O modelo PARAFAC foi feito para um conjunto de dados contendo todas as amostras, permitindo assim comparar as contribuições dos componentes. A Figura 31 e a Figura 32 mostram as contribuições fluorescentes de cada componente identificada pelo PARAFAC para a EOMSed e a WEOMSed, respectivamente, juntamente com a suas distribuições ao longo dos testemunhos de sedimentos das diferentes estações, corrigidos para o fator de diluição analítico. Para a EOMSed (Figura 31), a contribuição fluorescente média de C1 foi maior em ordem decrescente para o Rio Piracicaba > Rio Tietê > região de confluência. Isso mostra que pequenas moléculas contribuem mais para o arranjo da EOMSed do Rio Piracicaba. A contribuição fluorescente média de C2 teve a mesma ordem decrescente de C1 (Rio Piracicaba > Rio Tietê > região da confluência), mostrando que estruturas complexas na forma de frações aromáticas e

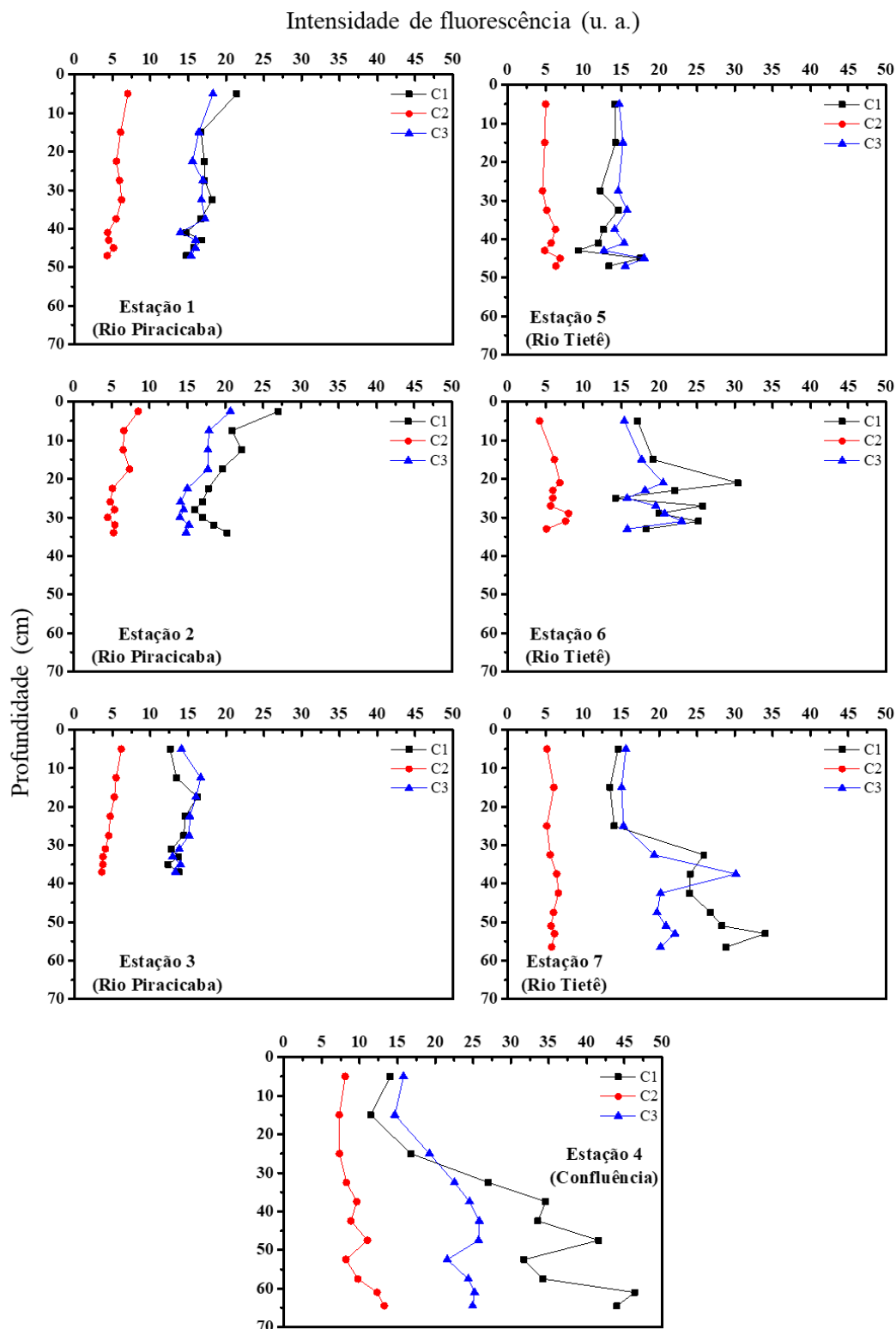
poliaromáticas contribuem mais para o arranjo da EOM<sub>Sed</sub> do Rio Piracicaba. A contribuição fluorescente média de C<sub>3</sub> foi maior em ordem decrescente para o Rio Tietê > Rio Piracicaba > região de confluência, mostrando que produtos de origem microbiana contribuem mais para o arranjo da EOM<sub>Sed</sub> do Rio Tietê. Assim, a EOM<sub>Sed</sub> do Rio Piracicaba contém mais aromáticos, enquanto o EOM<sub>Sed</sub> do rio Tietê contém mais produtos de origem microbiana. Esses resultados estão de acordo com os valores de  $SUVA_{254}$  e relações molares NPOC/TON, os quais mostraram uma EOM<sub>Sed</sub> menos aromáticas com mais estruturas nitrogenadas para o Rio Tietê em comparação com o Rio Piracicaba. A baixa razão molar NPOC/TON pode ser a principal razão para a maior atividade microbiana e a consequente presença de derivados microbianos (C<sub>3</sub>).

Figura 31 – Intensidade de fluorescência dos componentes (C1, C2 e C3) retirados da matéria orgânica extraída dos sedimentos ao longo dos testemunhos de sedimentos identificadas por PARAFAC.



Fonte: Autoria própria.

Figura 32 – Intensidade de fluorescência dos componentes (C1, C2 e C3) retirados da matéria orgânica extraída com água dos sedimentos ao longo dos testemunhos de sedimentos identificadas por PARAFAC.



Fonte: Autoria própria.



Na WEOM Sed (Figura 32), as contribuições fluorescentes médias de C1, C2 e C3 foram maiores em ordem decrescente para a região da confluência > Rio Tietê > Rio Piracicaba. A extração de produtos derivados de micróbios (C3) foi relativamente maior para a WEOM Sed do que para a EOM Sed, e os valores de C3 foram maiores nas estações do Rio Tietê do que no Rio Piracicaba, indicando mais uma vez sua maior atividade microbiana. A baixa abundância de C2 pode ser atribuída à estrutura do componente, porque substâncias do tipo húmico com alta aromaticidade são mais solúveis em solução alcalina de pH mais alto do que em água, o que pode resultar no maior conteúdo relativo de C2 em solução alcalina; além disso, a maior concentração de C2 em extratos alcalinos ofusca a concentração de C3. O meio alcalino favoreceu a maior extração de C1 e C2 (compostos húmicos) devido à hidrólise causada nos grupos funcionais de moléculas húmicas ligadas à superfície do mineral do sedimento (KLEBER; LEHMANN, 2019; OLK *et al.*, 2019).

As propriedades ópticas da EOM Sed e WEOM Sed mostraram uma diferença de eficiência devido a qualidade e composição da MO dos sedimentos. Esta diferença permite a discriminação entre os componentes de fluorescência mais solúvel (tipo ácido fúlvico) e menos solúvel (tipo ácido húmico) e, portanto, é possível avaliar a qualidade da MO nos sedimento. Embora a extração com água tenha sido usada para avaliar fontes de MO e vincular a contaminação em rios urbanos poluídos (CHEN, Z. *et al.*, 2019; ZHANG, L. *et al.*, 2020), em nosso estudo, os extratos alcalinos juntos com os aquosos fornecerem dados complementares para descrever as propriedades de MO.

#### **4.2.2.4 Características da composição da matéria orgânica extraída de sedimentos dos Rios Piracicaba e Tietê**

A solução aquosa neutra favorece a extração de pequenas moléculas (*blue-shifted*), que estão livres da fração mineral dos sedimentos. Já a solução alcalina favorece a extração de substâncias mais complexas (*red-shifted*). Os resultados obtidos com o EEM-PARAFAC juntamente com os valores de SUVA<sub>254</sub> e a razão molar NPOC/TON permitiram a avaliação total da qualidade do EOM Sed.

Embora o componente mais abundante na EOM Sed dos dois rios seja do tipo húmico com menor peso molecular (C1), a aromaticidade da EOM Sed do Rio Piracicaba foi evidenciada pela maior contribuição dos valores de C2 e SUVA<sub>254</sub>. Por outro lado, a EOM Sed do Rio Tietê apresentou maior atividade microbiana devido à maior contribuição de C3, presença de pequenas moléculas (menor contribuição de C2) e presença de estruturas nitrogenadas. Com base nas análises realizadas, não foi possível identificar alteração

composicional da EOMSed e da WEOMSed, que pode estar relacionada à sua semelhante deposição.

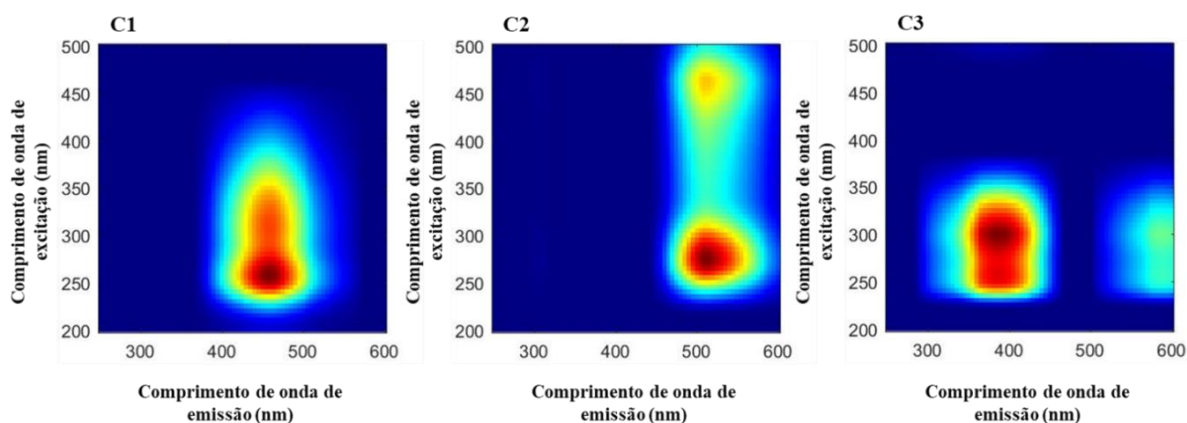
A origem da EOMSed é inferida dos resultados aqui obtidos. As razões molares NPOC/TON calculadas para a EOMSed do Rio Piracicaba indicam que a EOMSed pode se formar no corpo aquático (autóctone). As contribuições de dois componentes semelhantes a húmicos em extratos alcalinos indicam que a EOMSed também pode ser originado da MO do solo (alóctone). Pelas razões molares NPOC/TON calculadas para a EOMSed do Rio Tietê e pela maior atividade microbiana neste ecossistema aquático, pode-se inferir que a origem da EOMSed é predominantemente alóctone, principalmente devido ao lançamento de esgoto doméstico, que é indicada pelo maior teor de TC presente nos sedimentos do Rio Tietê.

#### **4.2.2.5 Avaliação da reatividade da matéria orgânica na presença de Cu(II) por supressão de fluorescência**

##### **4.2.2.5.1 Componentes fluorescentes**

O ajuste dos espectros EEM com PARAFAC para todas as amostras ( $n = 1035$ ) forneceu um modelo de resposta com três componentes fluorescentes (Figura 33) com CORCONDIA de 95,22%. As 1035 amostras referem-se aos 15 pontos das curvas de titulação para cada uma das 69 amostras de EOMSed. As características espectrais do componente 1 (C1), componente 2 (C2) e componente 3 (C3) foram semelhantes às encontradas na seção 4.2.2.3 (DE MORAIS *et al.*, 2021a). Resumidamente, C1 tinha características semelhantes aos ácidos fúlvicos com dois máximos de excitação: um em 255 nm e outro em 310 nm e um máximo de emissão no visível a 460 nm para ambos os picos de excitação (COBLE, 1996). C2 tinha características semelhantes aos ácidos húmicos com dois máximos de excitação, um em 255 e outro em 465 nm, e um máximo de emissão em 510 nm (OSBURN *et al.*, 2011; WALKER; AMON; STEDMON, 2013). C3 assemelhava-se a compostos de origem microbiana de ambiente aquático com dois máximos de excitação, um em 255 nm e outro em 300 nm, e um máximo de emissão em 385 nm (COBLE, 1996; OSBURN *et al.*, 2011).

Figura 33 – Gráficos de contorno EEM das três componentes do modelo PARAFAC.

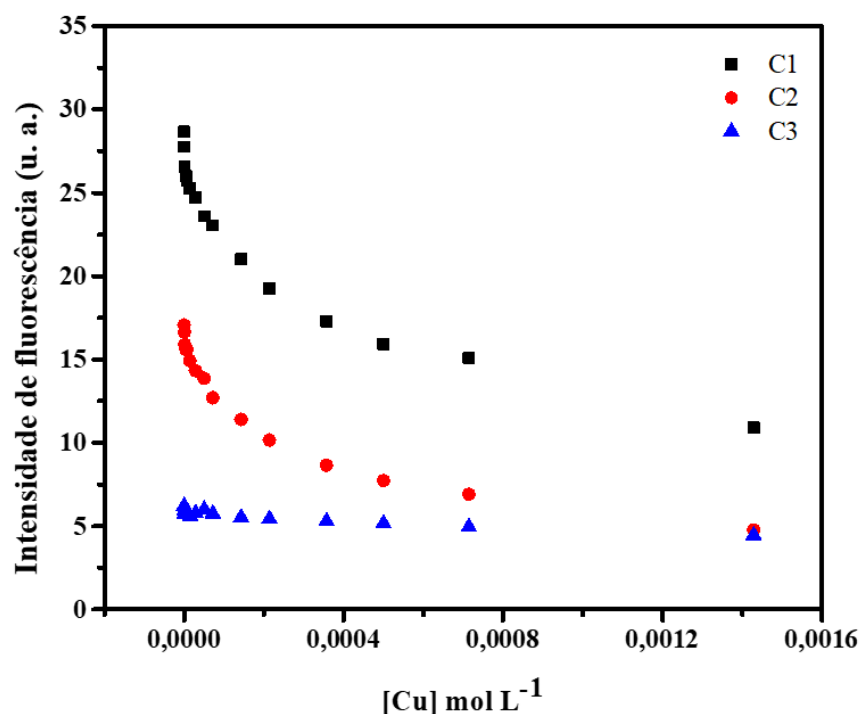


Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.2.5.2 Constantes de estabilidade e capacidades de complexação

Os valores da contribuição fluorescentes de C1 e C2 para a EOMSeD diminuiram gradualmente com o aumento da adição de Cu(II), indicando que os íons Cu(II) interagiram com os ligantes dos componentes fluorescentes do tipo fúlvico e tipo húmico (Figura 34). No entanto, o valor da contribuição fluorescentes de C3 para a EOMSeD não mostrou qualquer mudança significativa quando Cu(II) foi adicionado, indicando que os íons Cu(II) e os ligantes de compostos microbianos de ambientes aquáticos não interagiram ou não tem efeito de supressão de fluorescência (Figura 34). Assim, os dados experimentais para C3 não foram modelados pelo modelo de Ryan e Weber (Ryan e Weber, 1982). O modelo de equilíbrio 1:1 proposto por Ryan e Weber apresentou um bom ajuste para as interações da EOMSeD com Cu(II), em que o BIAS variou de 0,3 a 3,7. Em que o BIAS é a diferença entre o valor experimental e o teórico obtido pelo modelo (MOUNIER *et al.*, 2011).

Figura 34 – Gráfico da supressão da fluorescência dos componentes 1 e 2 e da constante fluorescência da componente 3 com adição de Cu(II).

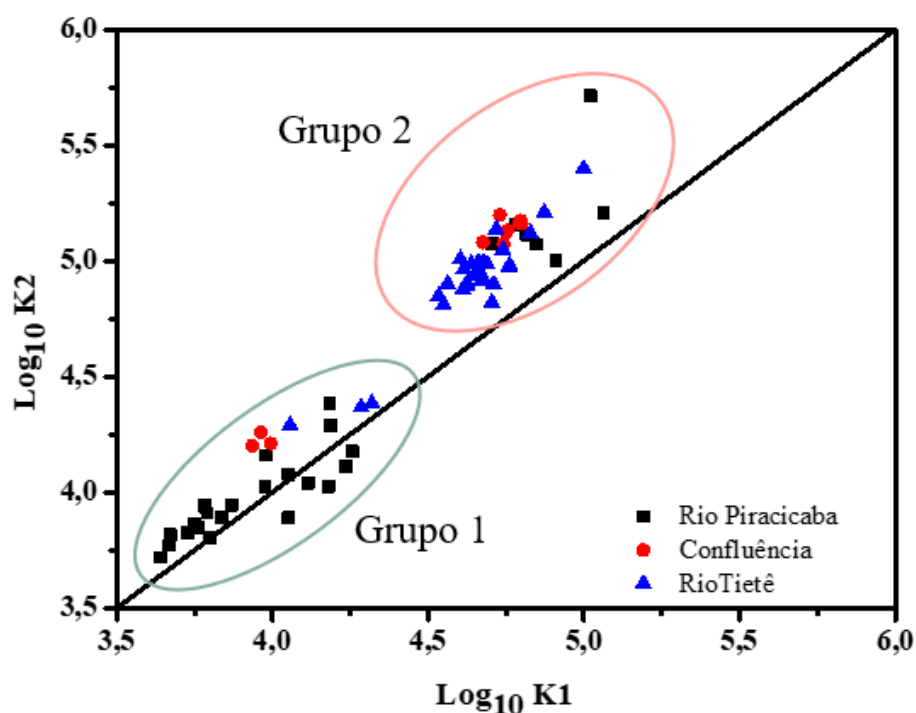


Fonte: Autoria própria.

A Figura 35 mostra os logaritmos das constantes de estabilidade para C1 ( $\log_{10} K1$ ) e C2 ( $\log_{10} K2$ ). É possível observar dois grupos de amostras, o grupo 1 com menores valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$ , que variaram de 3,64 a 4,32 e de 3,72 e 4,39, respectivamente e o grupo 2 com maiores valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$ , que variaram de 4,53 a 5,06 e de 4,81 a 5,71, respectivamente. As amostras do grupo 1 são compostas por todas as amostras das estações 1 e 2 (ambas do Rio Piracicaba), amostras das camadas mais profundas das estações 3 e 5 (Rios Piracicaba e Tietê, respectivamente), e amostras da camada superficial da estação 4 (região de confluência). Enquanto as amostras do grupo 2 são compostas pelas amostras das camadas superficiais das estações 3 e 5 (Rios Piracicaba e Tietê, respectivamente), amostras da camada mais profunda da estação 4 (região de confluência), e todas as amostras das estações 6 e 7 (ambas do Rio Tietê). Portanto, a EOMSed do Rio Piracicaba apresentou menores valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$ , exceto para a EOMSed das camadas superficiais da estação 3 (Figura 1A na seção apêndice). Já a EOMSed do Rio Tietê apresentou maiores valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$ , exceto para a EOMSed das camadas mais profundas da estação 5 (Figura 1A na seção apêndice).

Os maiores valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$  encontrados para a maioria dos extratos do Rio Tietê sugerem uma maior estabilidade termodinâmica entre o ligante e o íon metálico, ou seja, a formação de um complexo mais estável entre a EOMSed e o Cu(II) do que os extratos do Rio Piracicaba. De acordo com GUO *et al.* (2012), diferentes fontes de poluição podem afetar a complexação da MO dissolvida com Cu(II). Embora neste estudo tenhamos avaliado a extração alcalina, que favorece a extração de substâncias mais polares e reativas, os diferentes valores de  $\log_{10} K1$  e  $\log_{10} K2$  entre os Rios Tietê e Piracicaba podem ser devidos a diferença estrutural da MO, uma vez que, uma maior carga de poluente é despejada no Rio Tietê (SMITH; ESPÍNDOLA; ROCHA, 2014). Além disso, a partir da Figura 35, é possível observar que para a maioria das amostras da EOMSed, os valores de  $\log_{10} K2$  são maiores que os valores de  $\log_{10} K1$ , principalmente para as amostras do grupo 2. Isso indica que a componente tipo húmica (C2) proporcionou a formação de complexos mais estáveis.

Figura 35 – Avaliação das constantes de estabilidade condicional (K) para as interações de Cu(II) com a EOM<sub>Sed</sub>, utilizando o modelo de equilíbrio 1:1 proposto por Ryan e Weber com os componentes 1 e 2 obtidos pelo PARAFAC.



Fonte: Autoria própria.

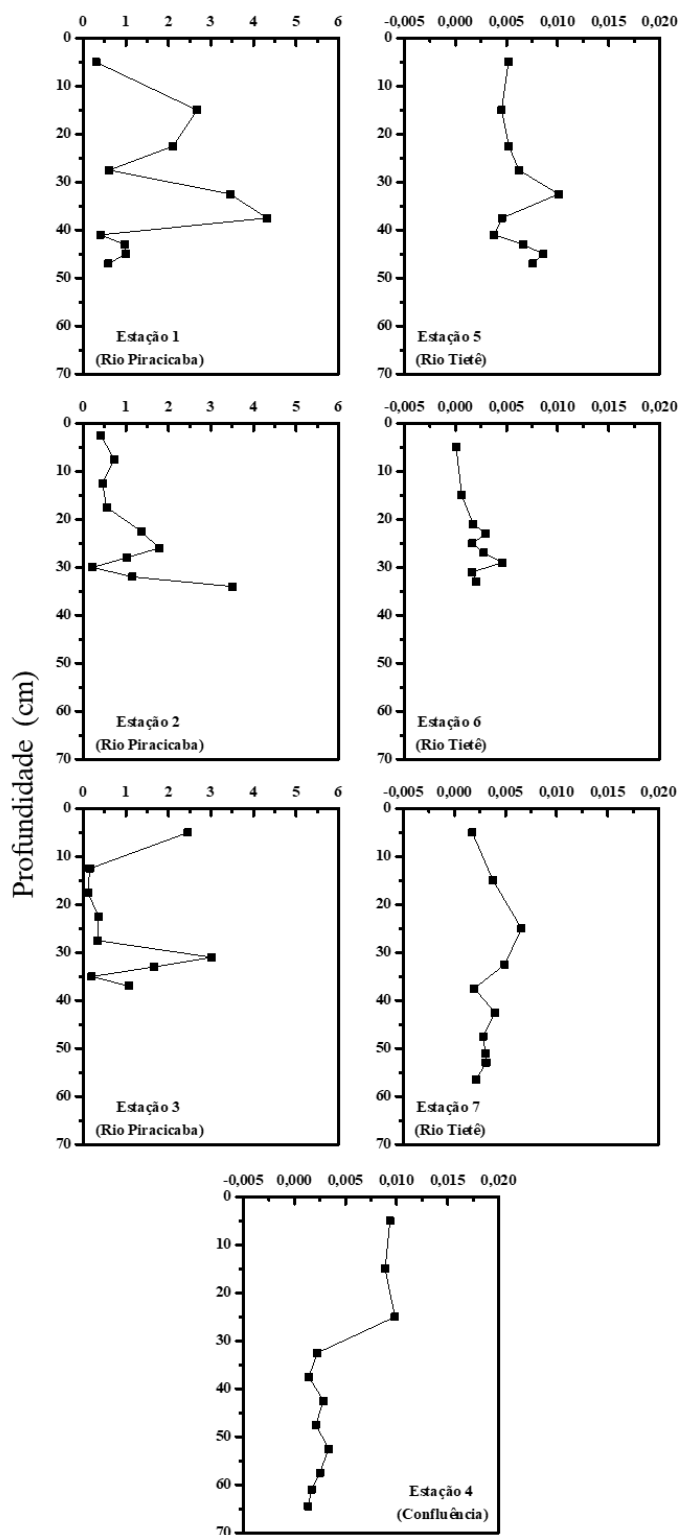
A distribuição da CC nos testemunhos de sedimentos do Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3), região de confluência (estação 4) e Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) são mostradas na Figura 36. O teste t não-pareado com nível de confiança de 95% demonstrou que houve diferença significativa na média da CC da EOM<sub>Sed</sub> do Rio Piracicaba quando comparada com o Rio Tietê e confluência. A CC foi obtida a partir da soma dos sítios de ligantes totais ( $C_{L1} + C_{L2}$ ) dividido pelo NPOC. A média da CC da EOM<sub>Sed</sub> do Rio Tietê ( $0,0039 \pm 0,0024$ , variando de 0,0001 a 0,0101) e da confluência ( $0,0041 \pm 0,0034$ , variando de 0,0013 a 0,0098) foi menor do que no Rio Piracicaba ( $1,27 \pm 1,17$ , variando de 0,11 a 4,31). Isto é, o Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3) apresentou maior CC do que o Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) e a região de confluência (estação 4), que por sua vez apresentaram CC similares. Este resultado pode ser devido à maior aromaticidade da EOM<sub>Sed</sub> do Rio Piracicaba (DE MORAIS *et al.*, 2021a). A baixa CC do Rio Tietê e da confluência pode estar associada a uma saturação dos sítios ativos da MO por outros metais, fazendo com que estes sítios não fiquem disponíveis para se ligarem ao Cu(II) adicionado durante o estudo de supressão de fluorescência. Esta hipótese é corroborada pelos resultados exibidos na seção 3.3.3.2, os quais mostram que o nível de

contaminação por Cr, Cu e Ni nos sedimentos do Rio Tietê é maior quando comparado com o Rio Piracicaba. Além disso, pode ser que os baixos valores de CC para o Rio Tietê e a confluência sejam por causa da alta concentração de C que não complexa (MO microbiana).

O maior aporte de MO recente e não transformada pela poluição do Rio Tietê, ou seja, uma MO mais polar, pode ter ocasionado uma maior estabilização entre os ligantes e complexos resultando em maiores constante de estabilidade. Em contrapartida, o Rio Piracicaba que contém maior frações aromáticas na composição da MO possibilitou maiores interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  com os íons metálicos, resultando em uma maior capacidade de complexação, mas com complexos de baixa estabilidade. Como já apontado por Silva *et al.* (2020), a interação eletrostática entre os ligantes polares e o íon metálico tende a formar complexos mais estáveis do que as frações aromáticas.

Figura 36 – Distribuição da capacidade de complexação (CC) ao longo dos testemunhos de sedimento das estações de coleta.

Capacidade de complexação ( $\mu\text{mol de Cu mg}^{-1}$  NPOC)



Fonte: Autoria própria.



### 4.2.3 Considerações parcial

A EOM Sed proveniente dos Rios Piracicaba e Tietê foi caracterizada principalmente por um arranjo de compostos de baixo peso molecular. No entanto, a EOM Sed do Rio Piracicaba apresentou mais frações aromáticas e menos estruturas nitrogenadas em comparação com o Rio Tietê. A presença de estruturas nitrogenadas e fluoróforos relacionadas à atividade microbiana pode ser um indicador da qualidade da MO, podendo ser utilizado como indicador global do estado do rio. Assim, a combinação de técnicas elementares e espectroscópicas permite a decifração bem-sucedida das características da MO extraídas. Esta abordagem pode, portanto, ser usada como uma ferramenta para avaliar a qualidade dos corpos aquáticos.

A supressão de fluorescência com a adição de Cu permitiu a determinação das propriedades da EOM Sed. A EOM Sed dos Rios Piracicaba e Tietê e confluência são diferentes. De acordo com as  $K_{ML}$  e as CC para os complexos EOM Sed-Cu(II) do Rio Piracicaba, a força de interação da EOM Sed-Cu(II) é menor e a quantidade de sítios que participam da interação EOM Sed-Cu(II) por carbono é maior do que para o Rio Tietê. A EOM Sed do Rio Tietê e da confluência pode estar associada a outros metais e não estar disponíveis para se ligar ao Cu(II) confirmando o observado pela avaliação de risco feita com os resultados obtidos pelos métodos desenvolvidos empregando a DP LIBS. Além disso, pode ser que a EOM Sed nesses pontos seja composta por C que não complexa com o Cu(II).

## 4.3 Avaliação da clorofila a nos sedimentos por LIFS e CLSM

### 4.3.1 Procedimento experimental

#### 4.3.1.1 Espectroscopia UV-Vis

O conteúdo de Chl-a nos sedimentos foi avaliado através de extrações químicas com acetona para amostras de sedimentos das estações de coleta 2 no Rio Piracicaba e 5 no Rio Tietê. Aproximadamente 1,0 g das amostras de sedimentos homogeneizadas foram colocadas em frascos de polipropileno com 45,0 mL de acetona P. A. (Merck) e em seguida foram agitadas por 24 h em uma mesa agitadora a 10 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Rotina 380R, Hettich) a 10.000 rpm por 10 min e filtradas em sistema de filtração a vácuo com filtro de fibra de vidro de 0,70  $\mu\text{m}$ . As medidas de absorbância foram realizadas usando um espectrofotômetro UV-Vis de feixe duplo (UV-1601PC, Shimadzu) em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, uma faixa espectral de 200 a 1100 nm e uma velocidade de varredura de 370 nm  $\text{min}^{-1}$ . Uma cubeta com acetona P.A. foi usada como referência.

#### **4.3.1.2 Microscopia confocal de varredura a laser**

Todas as medidas para a obtenção das imagens de fluorescência com alta resolução espacial foram realizadas usando um microscópio confocal Zeiss LSM 780 invertido com um laser sintonizável de Ti:safira (Coherent Chameleon) como uma fonte de luz pulsada para excitação de dois fótons (2P) na faixa do infravermelho próximo entre 690 e 1100 nm. O arranjo molecular foi observado por pixel de imagem das amostras de sedimento no modo espectral do microscópio. O comprimento de onda de excitação por 2P a 800 nm foi utilizado para analisar as propriedades de emissão de moléculas depositadas na fase mineral dos sedimentos em uma área de 256x256  $\mu\text{m}$  através de espectros de fluorescência de 1040x1040 pixels na região do visível entre 400 nm e 700nm. As imagens confocais foram obtidas com uma lente objetiva Plan-Apochromat (40x, abertura numérica 1.4) usando imersão em água para acoplar com o lado inferior da lamínula. A resolução espacial foi de aproximadamente 200 nm, considerando a abertura numérica e o comprimento de onda de excitação. Cerca de 5% da potência nominal do laser (valor médio de aproximadamente 200 mW) foi suficiente para obter imagens brilhantes para excitação 2P usando a configuração acima para a objetiva de 40x.

Duas fotomultiplicadoras foram utilizadas para a obtenção das imagens no modo canal, e o intervalo de aquisição foi fixado por meio de filtros ópticos. A primeira fotomultiplicadora (Canal 1) recebeu fluorescência entre 417 e 620 nm, e está associado à ampla emissão de MO. A segunda fotomultiplicadora (Canal 2) recebeu fluorescência entre 648 e 792 nm, e está associado à emissão de Chl-a. O laser utilizado foi de 405 nm (contínuo), a potência do laser foi mantida baixa e constante e a velocidade de varredura foi de aproximadamente de 3  $\mu\text{s}$  por pixel, com 1024 pixels em cada eixo.

Aproximadamente 20 mg das amostras de sedimento homogeneizados das estações de coleta 2 (Rio Piracicaba) e 5 (Rio Tietê) foram colocadas em tubos Eppendorf juntamente com 1,5 mL de água deionizada. Algumas gotas desta solução de sedimento em suspensão em água foram espalhadas sobre uma lamínula de vidro e cobertas novamente com uma segunda lamínula. Essa configuração em sanduíche da amostra garante que as partículas de sedimento estejam sempre úmidas, fixas e homogeneamente distribuídas sobre a lamínula de vidro inferior durante o experimento de microscopia, além de fornecer melhor dissipação de calor que minimiza qualquer evento de queima por pixel durante a varredura a laser.

#### **4.3.1.3 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser**

O sistema LIFS empregado neste estudo consiste em (i) um laser de diodo contínuo (CUBE, Coerente) com emissão em 405 nm e potência máxima de 20 mW; (ii) um

espectrômetro USB2000-Ocean Optics operando na faixa espectral de 194 a 894 nm com uma resolução de 10 nm; (iii) uma sonda de aço inoxidável contendo um sistema de fibras ópticas: seis fibras para direcionar o feixe de laser para a superfície da pastilha e uma fibra central para coletar a emissão de fluorescência das espécies excitadas; (iv) um filtro óptico ajustável colocado entre a amostra e o espectrômetro para reduzir a intensidade da luz laser refletida na amostra; (v) um sistema de refrigeração e (vi) um computador com software de aquisição e análise de dados.

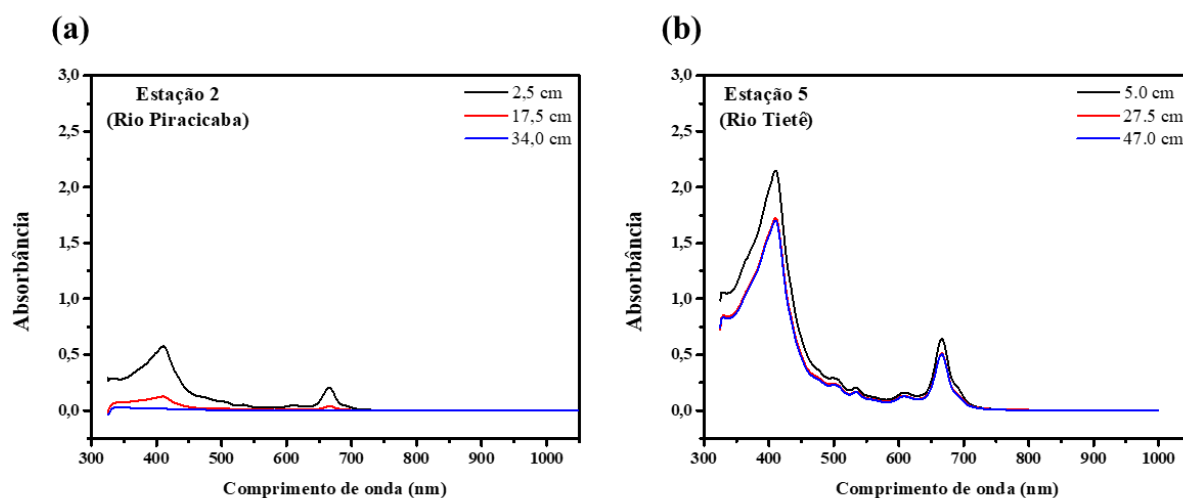
Para a análise LIFS, foram empregadas pastilhas que foram confeccionadas como descrito na seção 3.2.3.2. As pastilhas de sedimentos foram analisadas em duplicata e cada amostra foi representada pelas medidas LIFS médias de duas pastilhas. O tempo de integração do sinal foi de 800 ms e o *boxcar*, um parâmetro de suavização do espectro, foi de 8. A taxa de variação máxima da primeira derivada dos espectros foi calculada de 450 a 893 nm. A primeira derivada da banda de Chl-a foi relacionada à profundidade dos testemunhos de sedimentos para avaliar sua distribuição ao longo do perfil. O CV da primeira derivada da banda de Chl-a para cada estação de coleta foi calculado.

## **4.3.2 Resultados e discussão**

### **4.3.2.1 Confirmação de clorofila em sedimentos**

As Figuras 37a e 37b mostram os espectros UV-Vis dos extratos de acetona de amostras de sedimentos do Rio Piracicaba (estação 2) e do Rio Tietê (estação 5), respectivamente, em três diferentes profundidades. Ambos os máximos de absorção encontrados nas regiões do vermelho (666 nm) e do azul (410 nm) do espectro visível confirmaram a presença de Chl-a e seus derivados nas amostras de sedimento (SANCHINI; GROSJEAN, 2020; THRANE *et al.*, 2015; VILLANUEVA; HASTINGS, 2000). A presença da banda na região de 660 nm indica abundância de pigmentos clorofílicos nos extratos de sedimento (SUMMERHAYES *et al.*, 1995). Os espectros UV-Vis dos extratos do Rio Piracicaba (Figura 37a) mostram ambos os picos de absorção em 410 e 666 nm, destacando-se maiores intensidades de absorbância na camada superior (2,5 cm). Além disso, a intensidade da absorbância diminuiu em direção às camadas mais profundas, não sendo possível observar as bandas correspondentes a Chl-a e seus derivados na camada mais profunda (34 cm). Em relação aos espectros UV-Vis dos extratos das amostras de sedimento do Rio Tietê (Figura 37b), os picos de absorbância em 410 e 666 nm foram semelhantes em todas as profundidades, sendo ligeiramente mais intensos na camada superior.

Figura 37 – Espectros UV-Vis das amostras de sedimentos extraídas com acetona do Rio Piracicaba (estação 2) (a) e do Rio Tietê (estação 5) (b) em três diferentes profundidades.



Fonte: Autoria própria.

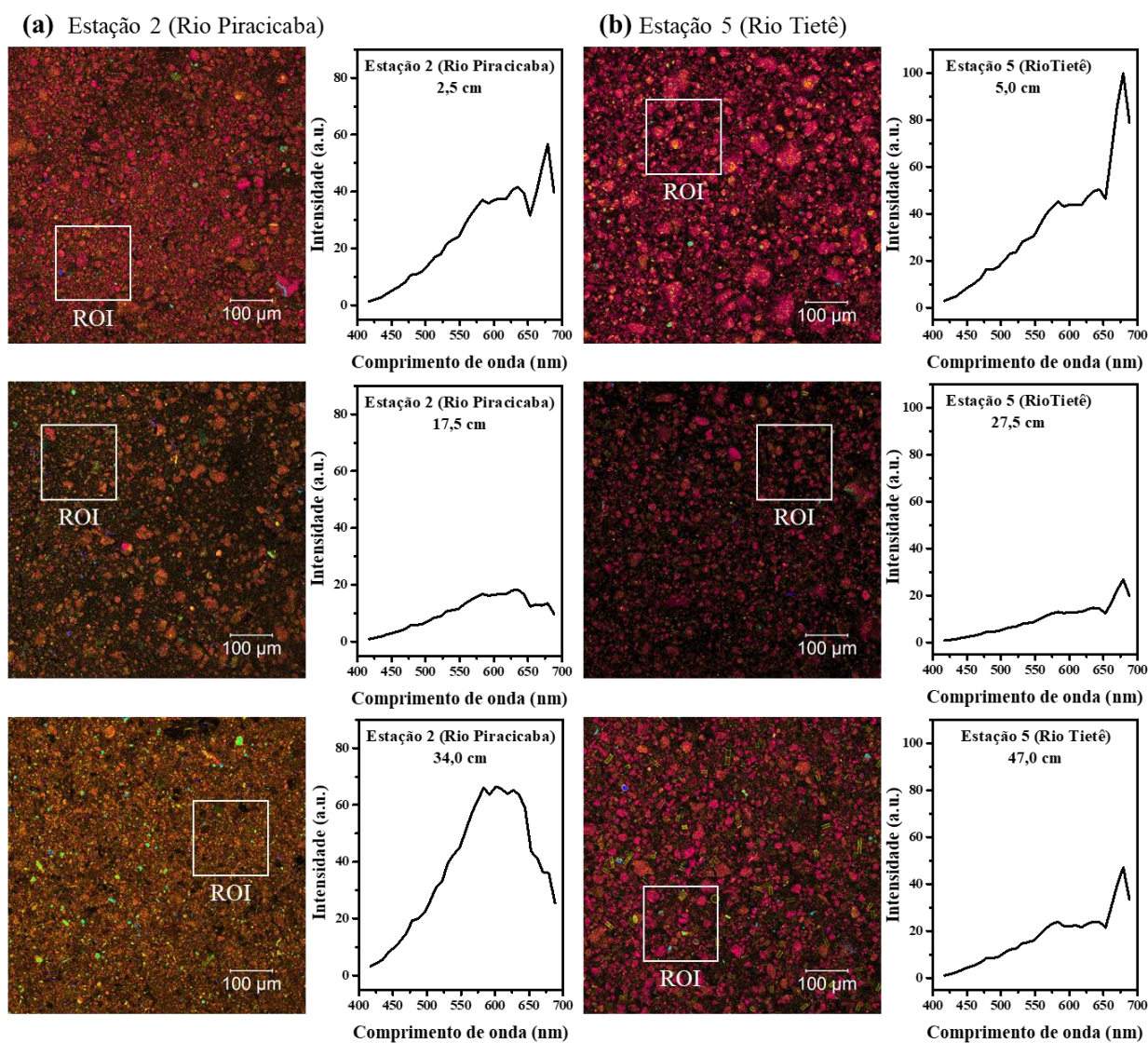
A alta intensidade de absorbância nas regiões de 410 e 666 nm para as amostras do Rio Tietê sugere um maior grau de eutrofização em relação ao Rio Piracicaba. A resiliência da Chl-a em sedimentos pode estar relacionada às condições anóxicas dos sedimentos, que favorecem a preservação dessas estruturas (SUN; LEE; ALLER, 1993). O maior grau de eutrofização e menor teor de oxigênio dissolvido no Rio Tietê (DE MORAIS *et al.*, 2021b) deve ser a principal força motriz para a maior preservação e menor oxidação da Chl-a nos sedimentos.

#### 4.3.2.2 Caracterização da clorofila a em sedimentos por CLSM

As amostras de sedimento inteiros do Rio Piracicaba (estação 2) e do Rio Tietê (estação 5) foram analisadas usando CLSM para avaliar a Chl-a total e não apenas a Chl-a extraída com acetona como mostrado por espectroscopia UV-Vis. A Figura 38 mostra as imagens de fluorescência com alta resolução espacial obtidas com CLSM e o espectro de emissão de fluorescência para cada região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*). A cor vermelha representa Chl-a e foi observada nas camadas superiores e estava ausente na camada mais profunda (34,0 cm) do Rio Piracicaba. As mudanças evidenciadas pela cor são suportadas pelos espectros de emissão ROI, no qual a intensidade máxima de fluorescência da Chl-a é em aproximadamente 679 nm (STASIUK; SANEI, 2001). Os espectros de emissão mostram uma diminuição na intensidade da banda de Chl-a com a profundidade no Rio Piracicaba. A banda deslocada na camada mais profunda no espectro de emissão para um comprimento de onda mais curto (aproximadamente 600 nm) está associada à emissão de outros compostos fluorescentes

da MO do sedimento e à não Chl-a. Por outro lado, é possível observar a presença de Chl-a em todas as amostras coletadas no Rio Tietê, independentemente da profundidade. A emissão é observada em todas as camadas, sendo mais intensa na camada superior. Embora CLSM avaliou as amostras de sedimento inteiros, os resultados estão de acordo com os dados obtidos com espectroscopia UV-Vis. Esse fato indica que o Chl-a extraído com acetona é relacionada a Chl-a total.

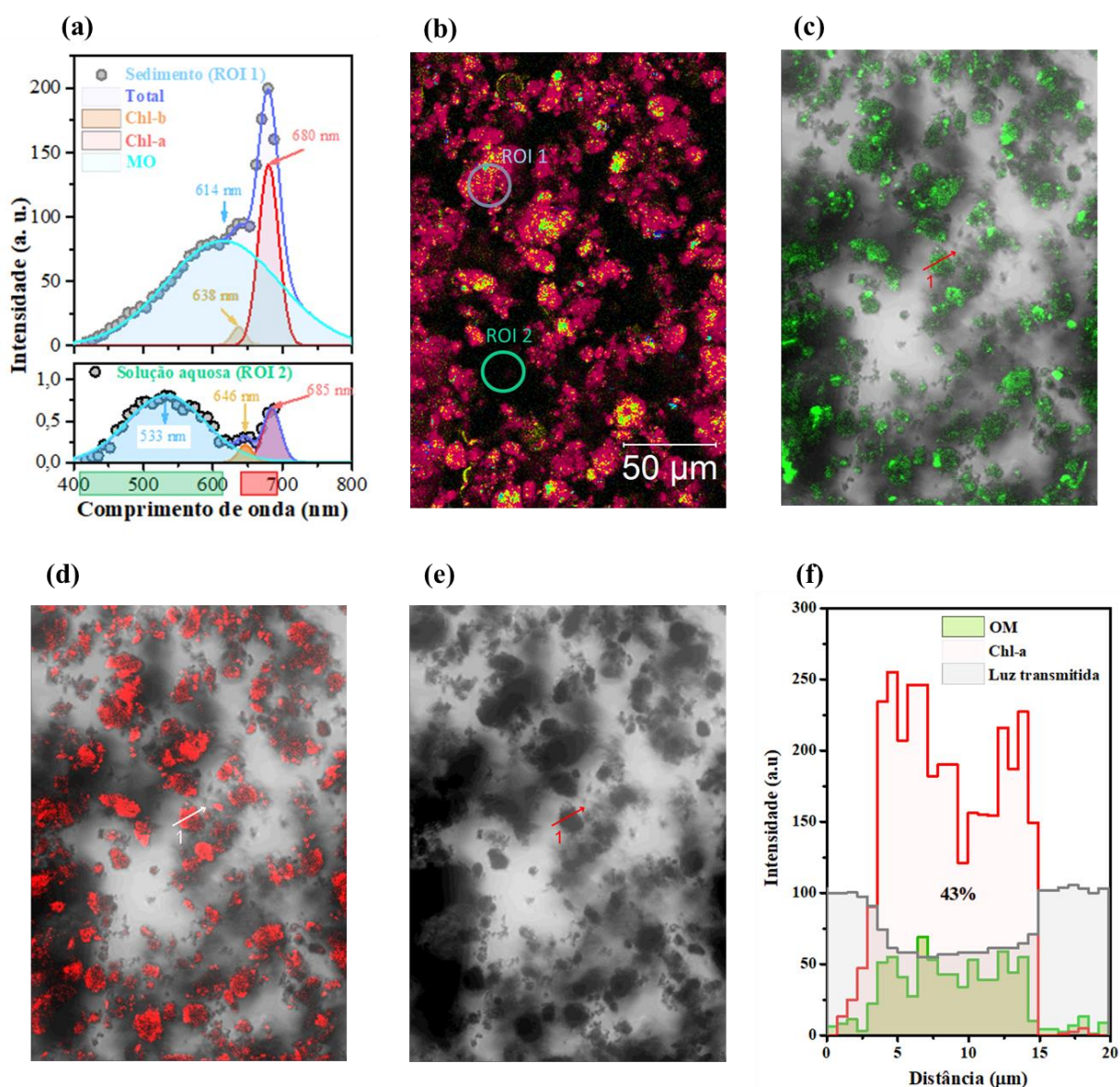
Figura 38 – Imagens de fluorescência com alta resolução espacial obtidas com CLSM das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) (a) e do Rio Tietê (estação 5) (b) e os respectivos espectros de emissão de fluorescência com excitação 2P à 800 nm para cada região de interesse (ROI).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 39a mostra os espectros de emissão e ajustes gaussianos da MO, clorofila b (Chl-b) e Chl-a para a amostra de sedimento do Rio Tietê coletada na estação 5 a uma profundidade de 27,5 cm. O primeiro espectro da Figura 39a é referente à análise realizada na fração mineral do sedimento (ROI 1) (Figura 39b). O segundo espectro é referente à análise realizada em solução aquosa (ROI 2) (Figura 39b). No eixo x da Figura 39a estão as faixas espectrais obtidas com as cores verde (417-620 nm) e vermelho (648-792 nm), correspondentes às medidas no modo canal. Os espectros de emissão de fluorescência em ambas as regiões (ROI 1 e 2) são compostos por uma banda de MO, uma banda de Chl-b e uma banda de Chl-a. É possível observar um aumento de 332, 314 e 98 vezes nas intensidades das bandas Chl-a, Chl-b e MO, respectivamente, do espectro do ROI 1 (fração mineral) quando comparado ao espectro ROI 2 (solução aquosa). Este resultado sugere que Chl-a, Chl-b e MO estão fortemente ligados à fração mineral e menos disponíveis para extração com solução aquosa. Há um desvio para o vermelho das bandas de Chl-a e Chl-b no espectro de emissão de fluorescência de  $\Delta\lambda = 5$  nm e  $\Delta\lambda = 8$  nm na ROI 2 (solução aquosa), respectivamente. De acordo com Stasiuk e Sanei (2001), um desvio para o vermelho na fluorescência dos pigmentos de clorofila corresponde a uma maior oxidação ou degradação. Assim, nossos resultados sugerem que a Chl-a e a Chl-b da solução aquosa foram mais oxidadas (ROI 2), enquanto, na fração mineral, as moléculas estavam mais preservadas e ligadas (ROI 1). Como apontado anteriormente na seção 4.3.2.1, a resiliência da Chl-a pode não estar exclusivamente relacionada às condições anóxicas dos sedimentos, mas também às interações organominerais que podem restringir a acessibilidade microbiana (LEHMANN *et al.*, 2020; POSSINGER *et al.*, 2020).

Figura 39 – Imagens confocais e espectros de emissão obtidos no modo canal para a amostra de sedimento do Rio Tietê coletada na estação 5 a uma profundidade de 27,5 cm. Espectros de emissão e ajustes gaussianos da MO, Chl-b e Chl-a (a) e imagem de fluorescência excitada em 800 nm obtida no modo canal (b). Imagens de fluorescência excitadas em 405 nm obtidas no canal verde (c), canal vermelho (d), a luz transmitida (e), e o gráfico da intensidade em relação à distância da reta 1 (f).



Fonte: Autoria própria.

A imagem obtida no canal verde para a amostra de sedimento do Rio Tietê na camada de 27,5 cm de profundidade mostra a emissão de MO (Figura 39c), enquanto a imagem obtida no canal vermelho, exibe a emissão de Chl-a (Figura 39d). A Figura 39e refere-se à luz

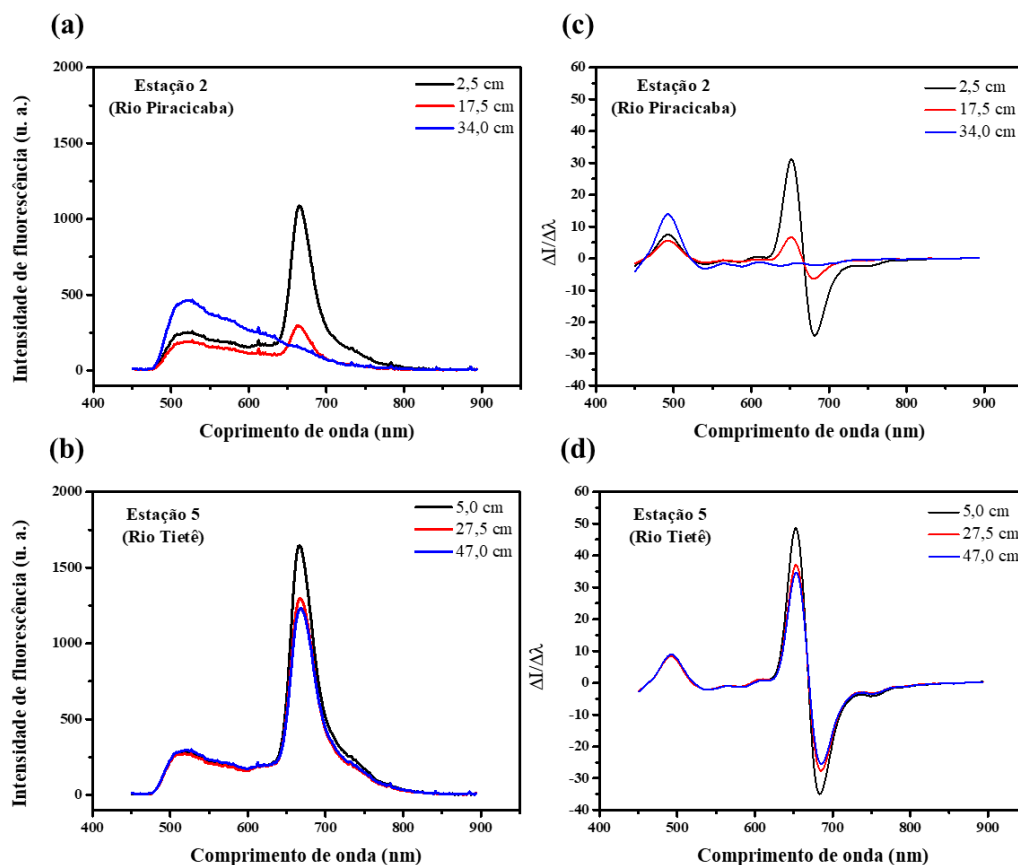
transmitida e a Figura 39f mostra o gráfico da intensidade de fluorescência da MO, Chl-a e a luz transmitida em relação à distância da reta 1. Na Figura 39c e 39d, é possível observar que o fenômeno de fluorescência acontece nas partículas do sedimento, atribuídas a outros compostos do sedimento, MO (Figura 39c) e Chl-a, especificamente (Figura 39d), enquanto nos espaços vazios entre as partículas do sedimento, há predominância de transmissão de luz. A intensidade de fluorescência em função da distância da reta 1 (Figura 39f) mostra um aumento na emissão de fluorescência de Chl-a e MO ligada na fração mineral com uma diminuição de 43% na luz transmitida. Em contraste, nas distâncias de 0 a 2,5  $\mu\text{m}$  e de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , fora da partícula do sedimento, a intensidade de fluorescência está quase ausente, revelando que o Chl-a e o MO estão associados entre si e com a fração inorgânica, e tem uma maior afinidade para a fração mineral do que a solução aquosa.

#### **4.3.2.3 Avaliação semiquantitativa da clorofila a por LIFS**

As Figuras 40a e 40b mostram os espectros LIFS de 450 a 893 nm das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) e do Rio Tietê (estação 5), respectivamente. Os espectros de emissão de fluorescência LIFS para amostras de sedimento inteiros apresentaram duas bandas de emissão com máximo em cerca de 518 e 678 nm que são devido à emissão diferenciada de outras frações da MO e Chl-a (CHEN *et al.*, 2015). Os resultados obtidos com LIFS corroboram com os resultados obtidos com CLSM para as amostras de sedimento. De acordo com os espectros LIFS, no Rio Piracicaba, a intensidade de fluorescência da banda de Chl-a foi maior na camada superior do testemunho de sedimento, e diminuiu em direção às camadas mais profundas. Na camada mais profunda, nenhuma banda de Chl-a foi observada. Já no Rio Tietê, a banda de Chl-a foi observada em todas as camadas, sendo mais intensa na camada superior.



Figura 40 – Espectros LIFS das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) (a), Rio Tietê (estação 5) (b), e os respectivos gráficos da primeira derivada do espectro de 450 a 893 nm (c e d).



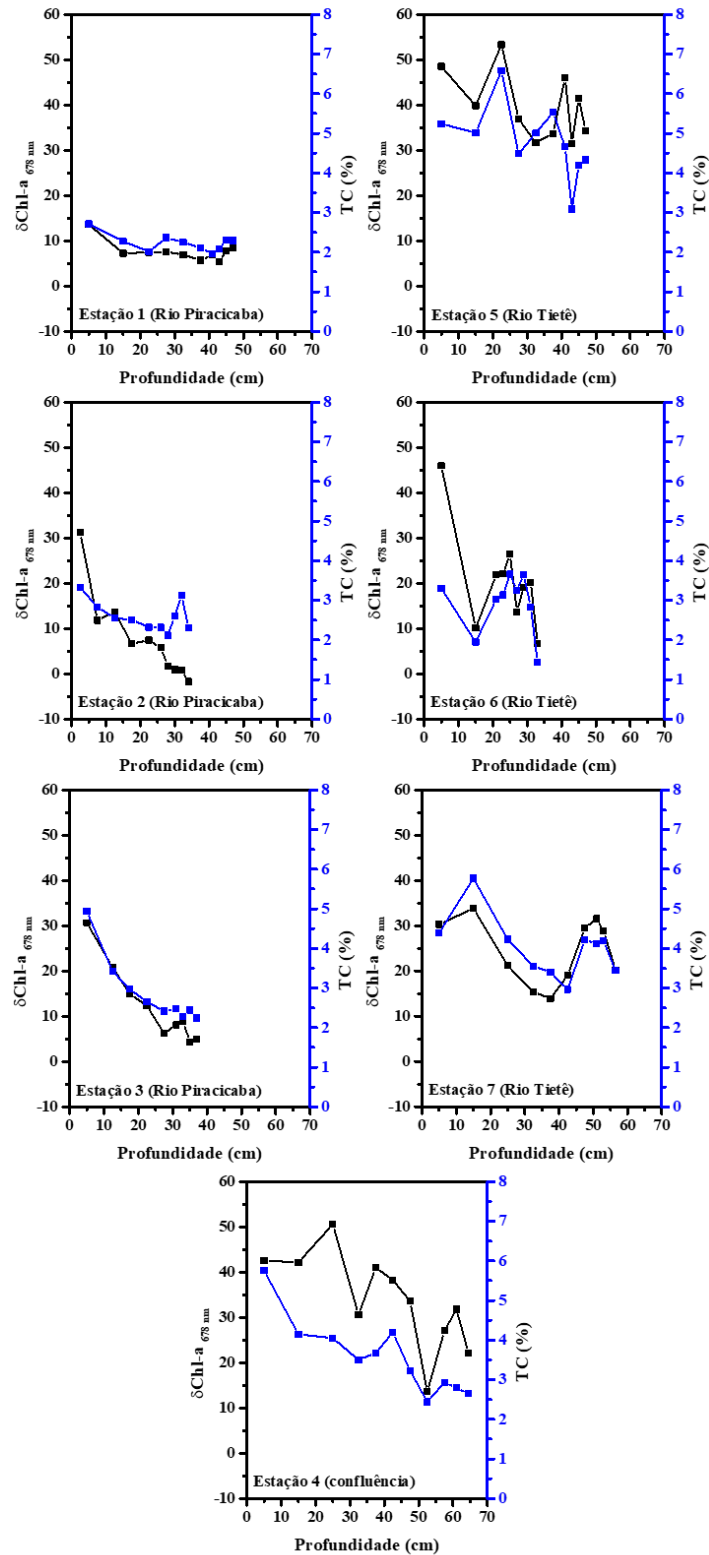
Fonte: Autoria própria.

Considerando a dificuldade de realizar a deconvolução espectral para calcular as áreas individuais das bandas da MO e Chl-a no espectro LIFS, visto que as bandas de Chl-a e MO se sobrepõem, a primeira derivada foi escolhida como técnica de processamento dos espectros. As Figuras 40c e 40d mostram a primeira derivada de 450 a 893 nm das amostras de sedimento do Rio Piracicaba (estação 2) e do Rio Tietê (estação 5), respectivamente, em três diferentes profundidades. A primeira derivada como técnica de processamento dos espectros permitiu a individualização dos sinais da MO e Chl-a, eliminando o efeito de sobreposição das bandas. Este tratamento de sinal dos espectros LIFS pode permitir uma análise semiquantitativa em grande escala do conteúdo de Chl-a em sedimentos de rios eutrofizados, o que pode ser uma boa ferramenta para monitoramento ambiental.

A distribuição da taxa de variação máxima da primeira derivada da banda de clorofila a em 678 nm ( $\delta\text{Chl-a}_{678}$ ) nos testemunhos de sedimentos do Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3), na

região de confluência (estação 4) e no Rio Tietê (estações 5, 6 e 7) são mostrados na Figura 41 junto com a distribuição de TC. Nas estações de coleta localizadas no Rio Piracicaba (estações 1, 2 e 3), a maior  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  foi encontrado na camada superior dos testemunhos de sedimento e diminuiu em direção às camadas mais profundas. A  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  para as estações 1, 2 e 3 variou de 5,37 a 13,63 (CV = 0,30), de 1,68 a 31,26 (CV = 1,22) e de 4,39 a 30,69 (CV = 0,70), respectivamente. As distribuições da  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  nos testemunhos de sedimentos da região da confluência e o Rio Tietê foram diferentes do Rio Piracicaba. Na região da confluência, a  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  variou de 13,60 a 50,60 (CV = 0,31), com maior valor na profundidade de 25,0 cm. A  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  para as estações 5, 6 e 7 variou de 31,55 a 53,36 (CV = 0,19), de 6,75 a 46,02 (CV = 0,55) e de 13,91 a 33,87 (CV = 0,30), com os maiores valores nas profundidades de 22,5; 5,0 e 15,0 cm, respectivamente. A distribuição da  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  nos testemunhos de sedimentos com base nos métodos LIFS desenvolvidos apresentou um comportamento comparável à distribuição TC em todas as estações de coleta. A análise de regressão encontrou relações positivas entre a distribuição da  $\delta\text{Chl-a}_{678}$  e a distribuição do TC ao longo dos testemunhos de sedimentos das estações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram 0,84; 0,61; 0,96; 0,76; 0,61; 0,61 e 0,78, respectivamente. Essas relações positivas, que variam de fortes a muito fortes, sugerem que o acúmulo de C pode estar relacionado a Chl-a (MO fresca).

Figura 41 – Distribuição da taxa de variação máxima da primeira derivada da banda de clorofila a em 678 nm ( $\delta\text{Chl-a}_{678\text{ nm}}$ ) ao longo dos testemunhos de sedimento das estações de coleta.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.3.2.4 Implicações Ambientais

A presença de Chl-a foi observada nos sedimentos de ambos os rios estudados. No entanto, o Rio Tietê apresentou maior conteúdo de Chl-a do que o Rio Piracicaba. A quantidade mais significativa de nutrientes no Rio Tietê é causada pelo seu curso, abrangendo áreas urbanas e algumas fazendas produtivas no meio rural. Este grande aporte de nutrientes leva ao crescimento excessivo de algas e macrófitas aquáticas, causando eutrofização e deposição de Chl-a nos sedimentos. Apesar do elevado conteúdo de P em ambos os rios, como mostrado na seção 3.3.2, a concentração média de TP foi maior no Rio Tietê ( $4316,16 \pm 1062,63 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ) do que no Rio Piracicaba ( $1800,17 \pm 696,82 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$ ). Normalmente, TP, nitrogênio total, demanda química e bioquímica de oxigênio, disco de Secchi, concentração de Chl-a e biomassa fitoplanctônica descrevem o estado de eutrofização em corpos d'água (DU *et al.*, 2019). No entanto, o conteúdo de Chl-a pode resultar do aumento da produção primária e do processo de eutrofização, portanto sua medição direta pode mostrar o grau de eutrofização dos rios.

A CLSM se mostrou uma ferramenta eficiente para a caracterização de Chl-a presente em sedimentos. Essas análises inéditas mostraram que o Chl-a tem maior afinidade e está fortemente ligado à fração mineral do sedimento, ficando menos disponível para ser extraído em solução aquosa. Portanto, a interação de Chl-a com partículas minerais de sedimentos sugere que os sedimentos de rios eutrofizados são um sumidouro de Chl-a e podem representar um reservatório de C nos corpos aquáticos. A menor solubilidade em água e a resiliência em partículas minerais mostram estabilidade na ligação de Chl-a e partículas minerais. A associação organomineral implica maior energia de ligação entre a Chl-a e o mineral, termodinamicamente desfavorável para a assimilação de microrganismo do que uma Chl-a não-ligada ou livre. Além disso, com base na interação de Chl-a com a fração mineral, a análise de testemunhos de sedimentos permite avaliar a história de eutrofização de um rio, cuja presença de Chl-a em profundidade pode sugerir uma deposição antiga.

Além disso, este estudo demonstrou a aplicação inovadora do LIFS combinado com a primeira derivada como uma técnica para processar os espectros e semiquantificar Chl-a em sedimentos em grande escala. Esta técnica permite a análise direta da amostra de sedimento sem o uso de reagentes. Assim, o método proposto para semiquantificar Chl-a em sedimentos está ao alcance financeiro dos órgãos responsáveis pela preservação e restauração da qualidade dos ecossistemas aquáticos para verificar a eutrofização de rios, permitindo amostragem em diversos pontos para monitoramento e mapeamento do estado dos corpos d'água.

### **4.3.3 Considerações parcial**

Este estudo mostrou pela primeira vez que CLSM e LIFS podem fornecer análises diretas de Chl-a em sedimentos e têm o potencial de superar as desvantagens associadas ao procedimento de extração. A CLSM se mostrou uma ferramenta eficiente para obter informações sobre a oxidação da Chl-a em sedimentos e sua interação com as partículas minerais. Como a avaliação do conteúdo de Chl-a nos sedimentos pode refletir a eutrofização dos corpos aquáticos, o LIFS combinado com a primeira derivada dos espectros demonstrou ser uma ferramenta inovadora e rápida para análise semiquantitativa do conteúdo de Chl-a em sedimentos quando comparado com a CLSM, permitindo inferir o estado de eutrofização de corpos aquáticos. Além disso, os resultados mostraram que a resiliência Chl-a pode não estar exclusivamente relacionada às condições anóxicas dos sedimentos, mas também às interações organominerais que podem restringir a acessibilidade microbiana.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

A técnica LIBS demonstrou grande potencial para ser utilizada no monitoramento de ecossistemas aquáticos no que concerne ao grau de eutrofização e os níveis de PTEs (Cr, Cu e Ni) em testemunhos de sedimentos. Os métodos desenvolvidos empregando SP e DP LIBS apresentaram LOD de  $709 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $349 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Sendo assim, os métodos possuem sensibilidade satisfatória para determinação de P nos sedimentos, visto que, os LODs dos métodos ficaram abaixo de  $750 \text{ mg kg}^{-1}$ , o qual é considerado pelas leis brasileiras como o valor máximo de origem natural. Além disso, as determinações se mostraram precisas e aceitáveis para medidas de amostras sem preparação, sendo encontrados erro percentual médio para as curvas de calibração de 12% e 11% para SP e DP LIBS, respectivamente, e para as curvas de validação de 14% e 10% para SP e DP LIBS, respectivamente. Contudo, para a determinação de Cr, Cu e Ni em sedimentos é necessário a utilização de um sistema DP LIBS, o qual possui sensibilidade maior quando comparado com o SP LIBS, uma vez que, baixas concentrações dos PTEs são capazes de causar danos ao meio ambientais e oferecer riscos à saúde pública. O melhor modelo desenvolvido para Cr foi empregando a compatibilização de matriz (CM) e para Cu e Ni foi empregando a padronização interna (PI). Estes modelos apresentaram RMSEV de  $7,54 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $14,53 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $8,29 \text{ mg kg}^{-1}$  para Cr, Cu e Ni foi, respectivamente. Portanto, os modelos possuem sensibilidade e precisão adequada para a quantificação dos PTEs avaliados, visto que, de acordo com a legislação brasileira a concentração inferior de TEL para Cr, Cu e Ni é  $< 37,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $< 35,7 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $< 18 \text{ mg kg}^{-1}$ .

A avaliação das propriedades ópticas e da estabilidade da MO extraída dos sedimentos por meio da EEM e da supressão de fluorescência, respectivamente, permitiram inferir sobre sua composição, origem e capacidade de complexar ou liberar esse PTEs. Os resultados sugerem que a EOMSed do Rio Piracicaba é mais aromática e de origem autóctone e alóctone derivada da MO do solo, enquanto do Rio Tietê é predominantemente antropogênica. Com os ensaios de complexação entre a EOMSed e a Cu(II), foi possível inferir que as frações aromáticas do Rio Piracicaba, podem interagir mais com o íon metálico do que o Rio Tietê, o qual apresentou baixa capacidade de complexação (CC). A região de confluência revelou informações sobre ambas as bacias hidrográficas que a forma, que provavelmente são características do rio a jusante. De acordo com os resultados obtidos para a confluência, pode-se inferir que a Bacia do Tietê aporta de maneira mais negativa a jusante.

Além da concentração de TP nos sedimentos, o monitoramento da fluorescência da Chl-a nos sedimentos mostrou ser uma ferramenta eficiente para avaliar o grau de eutrofização de

rios. A CLSM permitiu verificar que a Chl-a tem maior afinidade e é mais preservada e menor oxidada na fração mineral do sedimento, sugerindo que sedimentos são um sumidouro de Chl-a e podem representar um reservatório de C nos corpos aquáticos. A LIFS combinada com a primeira derivada dos espectros mostrou ser capaz de semiquantificar a Chl-a em sedimentos sem o uso de reagentes químicos, permitindo inferir sobre o grau de eutrofização dos rios estudados. O método desenvolvido tem grande potencial para ser aplicado em larga escala porque não usa reagentes químicos e as análises são de baixo custo.

A combinação dos métodos desenvolvidos baseados em técnicas fotônicas mostrou ser eficiente para o monitoramento de ecossistemas aquáticos. Através da análise de sedimentos foi possível avaliar o grau de eutrofização de rios por meio do conteúdo de TP e Chl-a, os riscos ecológicos e nível de poluição causada por PTEs, as interações da MO e Chl-a com a fração mineral e diferenciar a composição e origem da MO mais reativa. Contudo, como os sedimentos são ambientes dinâmicos, perturbações naturais ou antropogênicas podem causar seu revolvimento, por isso seria interessante realizar a datação dos sedimentos por  $^{14}\text{C}$  ou  $^{210}\text{Pb}$ , visto que a profundidade não é linear com o tempo. Também pode-se pensar em desenvolver métodos para o monitoramento de ambientes aquáticos a partir da análise de materiais em suspensão na água, principalmente por causa da facilidade de amostragem quando comparada com sedimentos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHIM, G. M. S.; PARKER, R. J. Assessment of heavy metal enrichment factors and the degree of contamination in marine sediments from Tamaki Estuary, Auckland, New Zealand. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 136, n. 1, p. 227–238, 2007.
- AGUILERA, J. A.; ARAGÓN, C. Characterization of laser-induced plasmas by emission spectroscopy with curve-of-growth measurements. Part II: effect of the focusing distance and the pulse energy. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 63, n. 7, p. 793–799, 2008.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.
- ANDERSON, D. M.; GLIBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. M. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. **Estuaries**, Port Republic, v. 25, n. 4, p. 704–726, 2002.
- ANDRADE, D. F.; PEREIRA-FILHO, E. R. Direct determination of contaminants and major and minor nutrients in solid fertilizers using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 41, p. 7890–7898, 2016.
- ANDRADE, D. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; AMARASIRIWARDENA, D. Current trends in laser-induced breakdown spectroscopy: a tutorial review. **Applied Spectroscopy Reviews**, Philadelphia, v. 56, n. 2, p. 98–114, 2021.
- ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N.; TOBIAS, R. D. **Optimum experimental designs, with SAS**. New York: Oxford University Press, 2007.
- AUSTRIA, E. S.; FUENTES, E. M.; NUESCA, G. M.; LAMORENA, R. B. Laser-induced breakdown spectroscopy for the quantitative analysis of metals in sediments using natural zeolite matrix. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 136, p. 1–7, 2017.
- AUSTRIA, E. S.; NUESCA, G. M.; LAMORENA, R. B. Spectral fitting approach for the determination of enrichment and contamination factors in mining sediments using laser-induced breakdown spectroscopy. **Environmental Science and Pollution Research**, Washington, v. 25, p. 16620–16628, 2018.
- BABOS, D. V.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Calibration strategies to overcome matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy: direct calcium and phosphorus determination in solid mineral supplements. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 155, p. 90–98, 2019.



- BABOS, D. V.; VIRGILIO, A.; COSTA, V. C.; DONATI, G. L.; PEREIRA-FILHO, E. R. Multi-energy calibration (MEC) applied to laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 33, n. 10, p. 1753–1762, 2018.
- BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 4–9, 2001.
- BARAN, A.; TARNAWSKI, M.; KONIARZ, T.; SZARA, M. Content of nutrients, trace elements, and ecotoxicity of sediment cores from Rożnów reservoir (Southern Poland). **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 41, n. 6, p. 2929–2948, 2019.
- BARBINI, R.; COLAO, F.; LAZIC, V.; FANTONI, R.; PALUCCI, A.; ANGELONE, M. On board LIBS analysis of marine sediments collected during the XVI Italian campaign in Antarctica. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 57, n. 7, p. 1203–1218, 2002.
- BAKIK, S. K.; BRAMHA, S.; BASTIA, T. K.; BEHERA, D.; MOHANTY, PRATAP KUMAR; RATH, P. Distribution of geochemical fractions of phosphorus and its ecological risk in sediment cores of a largest brackish water lake, South Asia. **International Journal of Sediment Research**, Beijing, v. 34, n. 3, p. 251–261, 2019.
- BELDJILALI, S.; YIP, W. L.; HERMANN, J.; BABA-HAMED, T.; BELASRI, A. Investigation of plasmas produced by laser ablation using single and double pulses for food analysis demonstrated by probing potato skins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 7, p. 2173–2183, 2011.
- BENTO, L. R.; CONSTANTINO, I. C.; TADINI, A. M.; MELO, C. A.; FERREIRA, O. P.; MOREIRA, A. B.; BISINOTI, M. C. Chemical and spectroscopic characteristics of Anthrosol (Amazonian Dark Earth) and surrounding soil from the Brazilian Amazon Forest: evaluation of mineral and organic matter content by depth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1623–1634, 2020.
- BERNARDO, N.; WATANABE, F.; RODRIGUES, T.; ALCÂNTARA, E. Evaluation of the suitability of MODIS, OLCI and OLI for mapping the distribution of total suspended matter in the Barra Bonita Reservoir (Tietê River, Brazil). **Remote Sensing Applications: society and environment**, Amsterdam, v. 4, p. 68–82, 2016.
- BHERING, A. P.; ANTUNES, I. M. H. R.; MARQUES, E. A. G.; DE PAULA, R. S. Geological and hydrogeological review of a semi-arid region with conflicts to water availability (southeastern Brazil). **Environmental Research**, San Diego, v. 202, p. 111756, 2021.
- BING, H.; ZHOU, J.; WU, Y.; WANG, X.; SUN, H.; LI, R. Current state, sources, and potential risk of heavy metals in sediments of Three Gorges Reservoir, China. **Environmental Pollution**, Kidlington, v. 214, p. 485–496, 2016.
- BLOESCH, J. Sediments of aquatic ecosystems. *In*: LIKENS, G. E. (ed.). **ENCYCLOPEDIA of Inland Waters**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 479–490.

BOGUTA, P.; PIECZYWEK, P. M.; SOKOŁOWSKA, Z. A comparative study of the application of fluorescence excitation-emission matrices combined with parallel factor analysis and nonnegative matrix factorization in the analysis of Zn complexation by humic acids. **Sensors**, Basel, v. 16, n. 10, 2016.

BOGUTA, P.; SOKOŁOWSKA, Z. Interactions of Zn(II) ions with humic acids isolated from various type of soils. Effect of pH, Zn concentrations and humic acids chemical properties. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1–20, 2016.

BOGUTA, P.; SOKOŁOWSKA, Z. Zinc binding to fulvic acids: assessing the impact of pH, metal concentrations and chemical properties of fulvic acids on the mechanism and stability of formed soluble complexes. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 6, p. 1297, 2020.

BOON, A. R.; DUINEVELD, G. C.A. Chlorophyll a as a marker for bioturbation and carbon flux in southern and central North Sea sediments. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf Luhe, v. 162, p. 33–43, 1998.

BORISOVER, M.; LAOR, Y.; PARPAROV, A.; BUKHANOVSKY, N.; LADO, M. Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin. **Water Research**, Kidlington, v. 43, n. 12, p. 3104–3116, 2009.

BOYD, T. J.; WOLGAST, D. M.; RIVERA-DUARTE, I.; HOLM-HANSEN, O.; HEWES, C. D.; ZIRINO, A. CHADWICK, D. B. Effects of dissolved and complexed copper on heterotrophic bacterial production in San Diego Bay. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, n. 3, p. 353–366, 2005.

BRAILSFORD, F. L.; GLANVILLE, H. C.; GOLYSHIN, P. N.; JOHNES, P. J.; YATES, C. A.; JONES, D. L. Microbial uptake kinetics of dissolved organic carbon (DOC) compound groups from river water and sediments. **Scientific Reports**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 11229, 2019.

BRAMORSKI, J. **Avaliação da qualidade de sedimentos dos rios Tietê e Piracicaba nos seus compartimentos de entrada no reservatório de Barra Bonita, SP**. 2004, 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 454 de 1° de novembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 de novembro de 2012, Seção 1, p. 66–69.

BRO, R.; KIERS, H. A. L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. **Journal of Chemometrics**, Hoboken, v. 17, n. 5, p. 274–286, 2003.

BRYM, A.; PAERL, H. W.; MONTGOMERY, M. T.; HANDSEL, L. T.; ZIERVOGEL, K.; OSBURN, C. L. Optical and chemical characterization of base-extracted particulate organic matter in coastal marine environments. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 162, p. 96–113, 2014.

BUCHMAN, M.F. **Screening quick reference tables (SQuiRTs)**. Seattle: United States. National Ocean Service. Office of Response and Restoration Division, 2008. p. 34. (NOAA OR&R Report 08-1).

BURDIGE, D. J. Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? **Chemical Reviews**, Washington, v. 107, n. 2, p. 467–485, 2007.

BURONE, L.; MUNIZ, P.; PIRES-VANIN, A. M. S.; RODRIGUES, M. Spatial distribution of organic matter in the surface sediments of Ubatuba Bay (Southeastern – Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 1, p. 77–90, 2003.

CABALIN, L. M.; LASERNA, J. J. Experimental determination of laser induced breakdown thresholds of metals under nanosecond Q-switched laser operation. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 53, n. 5, p. 723–730, 1998.

CAPELLETTI, R. Luminescence. *In*: BASSANI, F.; LIEDL, G. L.; WYDER, P. (ed.). **Encyclopedia of condensed matter physics**. New York: Academic Press, 2005. p. 178–189.

CASTILLO, M. M. Suspended sediment, nutrients, and chlorophyll in tropical floodplain lakes with different patterns of hydrological connectivity. **Limnologica**, Munich, v. 82, p. 125767, 2020.

CASTLE, B. C.; TALABARDON, K.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Variables influencing the precision of laser-induced breakdown spectroscopy measurements. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 52, n. 5, p. 649–657, 1998.

CASTRO, J. P.; PEREIRA-FILHO, E. R. Twelve different types of data normalization for the proposition of classification, univariate and multivariate regression models for the direct analyses of alloys by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 31, n. 10, p. 2005–2014, 2016.

CETESB. **Relatório anual de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo 2017**. São Paulo: CETESB, 2018. (Relatório técnico).

CHEN, H.; CHEN, R.; TENG, Y.; WU, J. Contamination characteristics, ecological risk and source identification of trace metals in sediments of the Le'an River (China). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 125, p. 85–92, 2016.

CHEN, N.; BIANCHI, T. S.; BLAND, J. M. Implications for the role of pre- versus post-depositional transformation of chlorophyll- a in the Lower Mississippi River and Louisiana shelf. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 81, p. 37–55, 2003.

CHEN, P.; PAN, D.; MAO, Z.; TAO, B. Detection of water quality parameters in Hangzhou Bay using a portable laser fluorometer. **Marine Pollution Bulletin**, Kidlington, v. 93, n. 1–2, p. 163–171, 2015.

CHEN, S.; CHEN, Y.; LIU, J.; ZHANG, J.; WU, A. Vertical variation of phosphorus forms in core sediments from Dongping Lake, China. **Procedia Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 10, p. 1797–1801, 2011.

CHEN, Z.; ZHU, Z.; SONG, J.; LIAO, R.; WANG, Y.; LUO, X.; NIE, D.; LEI, Y.; SHAO, Y.; YANG, W. Linking biological toxicity and the spectral characteristics of contamination in seriously polluted urban rivers. **Environmental Sciences Europe**, Heidelberg, v. 31, n. 1, p. 1–10, 2019.

CHOI, Y.; KIM, M.; HA, S. Y.; HAN, G. M.; YIM, U. H.; JUNG, J. H. Sediment quality assessment combining chemical and biological (non) target analysis. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 238, p. 105883, 2021.

CIUCCI, A.; PALLESCHI, V.; RASTELLI, S.; BARBINI, R.; COLAO, F.; FANTONI, R.; PALUCCI, A.; RIBEZZO, S.; VAN DER STEEN, H. J.L. Trace pollutants analysis in soil by a time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy technique. **Applied Physics B: lasers and optics**, Heidelberg, v. 63, n. 2, p. 185–190, 1996.

COBLE, P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 325–346, 1996.

COLE, J. J.; PRAIRIE, Y. T.; CARACO, N. F.; MCDOWELL, W. H.; TRANVIK, L. J.; STRIEGL, R. G.; DUARTE, C. M.; KORTELAJINEN, P.; DOWNING, J. A.; MIDDELBURG, J. J.; MELACK, J. Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. **Ecosystems**, New York, v. 10, n. 1, p. 171–184, 2007.

COLETTA, V. C.; REZENDE, C. A.; DA CONCEIÇÃO, F. R.; POLIKARPOV, I.; GUIMARÃES, F. E. G. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.

CORSI, M.; CRISTOFORETTI, G.; HIDALGO, M.; LEGNAIOLI, S.; PALLESCHI, V.; SALVETTI, A.; TOGNONI, E.; VALLEBONA, C. Double pulse, calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy: a new technique for in situ standard-less analysis of polluted soils. **Applied Geochemistry**, Kidlington, v. 21, n. 5, p. 748–755, 2006.

COSTA, V. C.; DOS SANTOS FERREIRA, S.; SANTOS, L. N.; SPERANÇA, M. A.; DA SILVA, C. SANTOS; SODRÉ, G. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Qualitative and quantitative analysis of soils using laser-induced breakdown spectroscopy and chemometrics tools. **Journal of Applied Spectroscopy**, New York, v. 87, n. 2, p. 378–386, 2020.

COSTA, V. C.; AUGUSTO, A. S.; CASTRO, J. P.; MACHADO, R. C.; ANDRADE, D. F.; BABOS, D. V.; SPERANÇA, M. A.; GAMELA, R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R. Laser Induced-Breakdown Spectroscopy (Libs): histórico, fundamentos, aplicações e potencialidades. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 527–545, 2019.

COSTA, V. C.; BABOS, D. V.; CASTRO, J. P.; ANDRADE, D. F.; GAMELA, R. R.; MACHADO, R. C.; SPERANCA, M. A.; ARAUJO, A. S.; GARCIA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Calibration strategies applied to laser-induced breakdown spectroscopy: a critical review of advances and challenges. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 31, n. 12, p. 2439–2451, 2020.

COSTA, V. C.; BABOS, D. V.; AQUINO, F. W. B.; VIRGÍLIO, A.; AMORIM, F. A. C.; PEREIRA-FILHO, E. R. Direct determination of Ca, K and Mg in Cassava Flour Samples by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Food Analytical Methods**, New York, v. 11, n. 7, p. 1886–1896, 2018.

CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2013. 302 p.

CRUZ, B. B.; MANFRÉ, L. A.; RICCI, D. S.; BRUNORO, D.; APPOLINARIO, L.; QUINTANILHA, J. A. Environmental fragility framework for water supply systems: a case study in the Paulista Macro Metropolis area (SE Brazil). **Environmental Earth Sciences**, New York, v. 76, n. 12, p. 441, 2017.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 105–126, 1999.

DA SILVA, A. R.; DO RÊGO, E. R.; CECON, P. R. Tamanho de amostra para caracterização morfológica de frutos de pimenteira. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 29, n. 1, p. 125–129, 2011.

DE CARVALHO, G. G. A.; SANTOS, D.; NUNES, L. C.; GOMES, M. S.; LEME, F. O.; KRUG, F. J. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 74–75, p. 162–168, 2012.

DE GIACOMO, A.; GAUDIUSO, R.; KORAL, C.; DELL'AGLIO, M.; DE PASCALE, O. Nanoparticle-enhanced laser-induced breakdown spectroscopy of metallic samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 21, p. 10180–10187, 2013.

DE MORAIS, C. P.; BARROS, A. I.; SANTOS JÚNIOR, D.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; SENESI, G. S.; GOMES NETO, J. A.; FERREIRA, E. C. Calcium determination in biochar-based fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy using sodium as internal standard. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 134, p. 370–373, 2017.

DE MORAIS, C. P.; TADINI, A. M.; BENTO, L. R.; OURSEL, B.; GUIMARAES, F. E. G.; MARTIN-NETO, L.; MOUNIER, S.; MILORI, D. M. B. P. Assessing extracted organic matter quality from river sediments by elemental and molecular characterization: application to the Tietê and Piracicaba rivers (São Paulo, Brazil). **Applied Geochemistry**, Kidlington, v. 131, p. 105049, 2021a.

DE MORAIS, C. P.; NICOLODELLI, G.; MITSUYUKI, M. C.; SILVA, K. S.G.; MAUAD, F. F.; MOUNIER, S.; MILORI, D. M. B. P. Total phosphorus determination in eutrophic tropical river sediments by laser-induced breakdown spectroscopy techniques. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 77–83, 2021b.

DE MORAIS, C. P.; BARROS, A. I.; BECHLIN, M. A.; SILVA, T. V.; SANTOS JÚNIOR, D.; SENESI, G. S.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A.; GOMES NETO, J. A.; FERREIRA, E. C. Laser-induced breakdown spectroscopy determination of K in biochar-based fertilizers in the presence of easily ionizable element. **Talanta**, Amsterdam, v. 188, p. 199–202, 2018.

DEBNATH, A.; SINGH, P. K.; SHARMA, Y. C. Metallic contamination of global river sediments and latest developments for their remediation. **Journal of Environmental Management**, London, v. 298, p. 113378, 2021.

DIWAKAR, P. K.; HARILAL, S. S.; FREEMAN, J. R.; HASSANEIN, A. Role of laser pre-pulse wavelength and inter-pulse delay on signal enhancement in collinear double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 87, p. 65–73, 2013.

DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ, H.; MIHOČOVÁ, S.; CHOVANEC, P.; PAVLOVSKÝ, J. Potential ecological risk and human health risk assessment of heavy metal pollution in industrial affected soils by coal mining and metallurgy in Ostrava, Czech Republic. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 16, n. 22, p. 4495, 2019.

DONOFRIO, R L. Display. *In*: GUENTHER, R. D. (ed.). **Encyclopedia of modern optics**. New York: Academic Press, 2005. p. 366–376.

DOS SANTOS, M. A.; ROSA, L. P.; SIKAR, B.; SIKAR, E.; DOS SANTOS, E. O. Gross greenhouse gas fluxes from hydro-power reservoir compared to thermo-power plants. **Energy Policy**, Kidlington, v. 34, n. 4, p. 481–488, 2006.

DU, H.; CHEN, Z.; MAO, G.; CHEN, L.; CRITTENDEN, J.; LI, R. Y. M.; CHAI, L. Evaluation of eutrophication in freshwater lakes: a new non-equilibrium statistical approach. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 102, p. 686–692, 2019.

DU, Y. X.; LU, Y. H.; ROEBUCK, J. A.; LIU, D.; CHEN, F. Z.; ZENG, Q. F.; XIAO, K.; HE, H.; LIU, Z. W.; ZHANG, Y. L.; JAFFÉ, R. Direct versus indirect effects of human activities on dissolved organic matter in highly impacted lakes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 752, p. 141839, 2021.

DUARTE, C. M. Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. **Ophelia**, Stenstrup, v. 41, n. 1, p. 87–112, 1995.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” - a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

DUNGAIT, J. A. J.; HOPKINS, D. W.; GREGORY, A. S.; WHITMORE, A. P. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. **Global Change Biology**, Oxon, v. 18, p. 1781–1796, 2012.

DUPONCHEL, L.; BOUSQUET, B.; PELASCINI, F.; MOTTO-ROS, V. Should we prefer inverse models in quantitative LIBS analysis? **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 35, n. 4, p. 794–803, 2020.

DURAKOVIC, B. Design of experiments application, concepts, examples: state of the art. **Periodicals of Engineering and Natural Sciences**, Ilidza, v. 5, n. 3, p. 421–439, 2017.

EBADI, A. G.; HISORIEV, H. Physicochemical characterization of sediments from Tajan river basin in the northern Iran. **Toxicological and Environmental Chemistry**, Abingdon, v. 100, n. 5–7, p. 540–549, 2018.

EDZWALD, J.K.; TOBIASON, J.E. **Water quality & treatment: a handbook on drinking water**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2011.

EMENIKE, P. G. C.; TENEBE, I. T.; NERIS, J. B.; OMOLE, D. O.; AFOLAYAN, O.; OKEKE, C. U.; EMENIKE, I. K. An integrated assessment of land-use change impact, seasonal variation of pollution indices and human health risk of selected toxic elements in sediments of River Atuwara, Nigeria. **Environmental Pollution**, Kidlington, v. 265, p. 114795, 2020.

ENGEL, M. H.; MACKO, S. A. **Organic geochemistry: principles and applications**. New York: Springer Science & Business Media, 2013.

FANTONI, R.; CANEVE, L.; COLAO, F.; FORNARINI, L.; LAZIC, V.; SPIZZICHINO, V. Methodologies for laboratory Laser Induced Breakdown Spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis—a review. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 63, n. 10, p. 1097–1108, 2008.

FAVARO, D. I.T.; ROCHA, F. R.; ANGELINI, M.; A HENRIQUES, H. R.; SOARES, J. S.; SILVA, P. S.C.; OLIVEIRA, S. M.B. Metal and trace element assessments of bottom sediments from medium Tietê River basin, Sao Paulo State, Brazil: part II. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 316, n. 2, p. 805–818, 2018.

FERREIRA, E. C.; MILORI, D. M. B. P.; FERREIRA, E. J.; DOS SANTOS, L. M.; MARTIN-NETO, L.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for multielemental determination in soils under sewage sludge application. **Talanta**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 435–440, 2011.

FUNKEY, C. P.; CONLEY, D. J.; STEDMON, C. A. Sediment alkaline-extracted organic matter (AEOM) fluorescence: an archive of Holocene marine organic matter origins. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 676, p. 298–304, 2019.

GAO, X.; LI, P. Concentration and fractionation of trace metals in surface sediments of intertidal Bohai Bay, China. **Marine Pollution Bulletin**, Kidlington, v. 64, n. 8, p. 1529–1536, 2012.

GAUTIER, C.; FICHET, P.; MENUT, D.; LACOUR, J. L.; L'HERMITE, D.; DUBESSY, J. Quantification of the intensity enhancements for the double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy in the orthogonal beam geometry. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 60, n. 2, p. 265–276, 2005.

GHAJ, R.; HERNANDEZ, C. M.; PICAZO, A.; MIZUNO, C. M.; ININBERGS, K.; DÍEZ, B.; VALAS, R.; DUPONT, C. L.; MCMAHON, K. D.; CAMACHO, A.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Metagenomes of mediterranean coastal lagoons. **Scientific Reports**, Berlin, v. 2, p. 1–13, 2012.

GONDAL, M. A.; HUSSAIN, T.; YAMANI, Z. H.; BAIG, M. A. The role of various binding materials for trace elemental analysis of powder samples using laser-induced breakdown spectroscopy. **Talanta**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 642–649, 2007.

GOUEGUEL, C.; LAVILLE, S.; VIDAL, F.; SABSABI, M.; CHAKER, M. Investigation of resonance-enhanced laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of aluminium alloys. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 25, n. 5, p. 635–644, 2010.

GUIGUE, J.; MATHIEU, O.; LÉVÊQUE, J.; MOUNIER, S.; LAFFONT, R.; MARON, P. A.; NAVARRO, N.; CHATEAU, C.; AMIOTTE-SUCHET, P.; LUCAS, Y. A Comparison of extraction procedures for water-extractable organic matter in soils. **European Journal of Soil Science**, Chichester, v. 65, n. 4, p. 520–530, 2014.

GUO, X. J.; YUAN, D. H.; LI, Q.; JIANG, J. Y.; CHEN, F. X.; ZHANG, H. Spectroscopic techniques for quantitative characterization of Cu (II) and Hg (II) complexation by dissolved organic matter from lake sediment in arid and semi-arid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 85, p. 144–150, 2012.

HACKLEY, P. C.; JUBB, A. M.; BURRUSS, R. C.; BEAVEN, A. E. Fluorescence spectroscopy of ancient sedimentary organic matter via confocal laser scanning microscopy (CLSM). **International Journal of Coal Geology**, Amsterdam, v. 223, n. February, p. 103445, 2020.

HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part I: review of basic diagnostics and plasmaparticle interactions: still-challenging issues within the analytical plasma community. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 64, n. 12, 2010.

HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: review of instrumental and methodological approaches to material analysis and applications to different fields. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 66, n. 4, p. 347–419, 2012.

HAKANSON, L. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. **Water Research**, Kidlington, v. 14, n. 8, p. 975–1001, 1980.

HAN, D.; JOE, Y. J.; RYU, J. S.; UNNO, T.; KIM, G.; YAMAMOTO, M.; PARK, K.; HUR, H. G.; LEE, J. H.; NAM, S. I. Application of laser-induced breakdown spectroscopy to Arctic sediments in the Chukchi Sea. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 146, p. 84–92, 2018.

HE, J.; YANG, Y.; CHRISTAKOS, G.; LIU, Y.; YANG, X. Assessment of soil heavy metal pollution using stochastic site indicators. **Geoderma**, Amsterdam, v. 337, n. 1, p. 359–367, 2019.

HE, Z.; XU, S.; ZHAO, Y.; PAN, X. Methane emissions from aqueous sediments are influenced by complex interactions among microbes and environmental factors: a modeling study. **Water Research**, Kidlington, v. 166, p. 115086, 2019.

HENRICHS, S. M. Early diagenesis of organic matter in marine sediments: progress and perplexity. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 1–3, p. 119–149, 1992.



HERMAN, I. P. Photoluminescence. *In*: HERMAN, I. P. **Optical diagnostics for thin film processing**. New York: Academic Press, 1996. p. 619–636.

HOU, J.; ZHANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; MA, W.; DONG, L.; YIN, W.; XIAO, L.; JIA, S. Mechanisms and efficient elimination approaches mechanisms and efficient elimination approaches of self-absorption in LIBS. **Plasma Science and Technology**, Bristol, v. 21, n. 3, p. 034016, 2019.

HULTHE, G.; HULTH, S.; HALL, P. O. J. Effect of oxygen on degradation rate of refractory and labile organic matter in continental margin sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Kidlington, v. 62, n. 8, p. 1319–1328, 1998.

KAUSHAL, S.; BINFORD, M. W. Relationship between C:N ratios of lake sediments, organic matter sources, and historical deforestation in Lake Pleasant, Massachusetts, USA. **Journal of Paleolimnology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 439–442, 1999.

KESHAVARZI, A.; KUMAR, V. Ecological risk assessment and source apportionment of heavy metal contamination in agricultural soils of Northeastern Iran. **International Journal of Environmental Health Research**, Oxon, v. 29, n. 5, p. 544–560, 2019.

KINDLER, R.; SIEMENS, J.; KAISER, K.; WALMSLEY, D. C.; BERNHOFER, C.; BUCHMANN, N.; CELLIER, P.; EUGSTER, W.; GLEIXNER, G.; GRUNWALD, T.; HEIM, A.; IBROM, A.; JONES, S. K.; JONES, M.; KLUMPP, K.; KUTSCH, W.; LARSEN, K. S.; LEHUGER, S.; LOUBET, B.; MCKENZIE, R.; MOORS, E.; OSBORNE, B.; PILEGAARD, K.; REBMANN, C.; SAUNDERS, M.; SCHMIDT, M. W. I.; SCHRUMPF, M.; SEYFFERTH, J.; SKIBA, U.; SOUSSANA, J. F.; SUTTON, M. A.; TEFS, C.; VOWINCKEL, B.; ZEEMAN, M. J.; KAUPENJOHANN, M. Dissolved carbon leaching from soil is a crucial component of the net ecosystem carbon balance. **Global Change Biology**, Oxon, v. 17, n. 2, p. 1167–1185, 2011.

KLEBER, M.; LEHMANN, J. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. **Journal of Environmental Quality**, Hoboken, v. 48, n. 2, p. 207–216, 2019.

KOTHAWALA, D.; MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A.; WEYHENMEYER, G. A.; TRANVIK, L. J. Inner filter correction of dissolved organic matter fluorescence. **Limnology and Oceanography: methods**, Hoboken, v. 11, p. 616–630, 2013.

KOWALCZUK, P.; DURAKO, M. J.; YOUNG, H.; KAHN, A. E.; COOPER, W. J.; GONSIOR, M. Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: interannual variability. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 113, n. 3–4, p. 182–196, 2009.

KOWALEWSKA, G. Algal pigments in sediments as a measure of eutrophication in the Baltic environment. **Quaternary International**, Kidlington, v. 130, n. 1, p. 141–151, 2005.

KRUTCHKOFF, R. G. Classical and inverse regression methods of calibration. **Technometrics**, Alexandria, v. 9, n. 3, p. 425–439, 1967.

KUBO, A.; KANDA, J. Coastal urbanization alters carbon cycling in Tokyo Bay. **Scientific Reports**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

KUMWIMBA, M. N.; ZHU, B.; SUANON, F.; MUYEMBE, D. K.; DZAKPASU, M. Long-term impact of primary domestic sewage on metal/loid accumulation in drainage ditch sediments, plants and water: implications for phytoremediation and restoration. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 581–582, p. 773–781, 2017.

KUREK, M. R.; HARIR, M.; SHUKLE, J. T.; SCHROTH, A. W.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; DRUSCHEL, G. K. Chemical fractionation of organic matter and organic phosphorus extractions from freshwater lake sediment. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1130, p. 29–38, 2020.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer Science & Business Media, 2013.

LAWAETZ, A. J.; STEDMON, C. A. Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 63, n. 8, p. 936–940, 2009.

LAZIC, V.; BARBINI, R.; COLAO, F.; FANTONI, R.; PALUCCI, A. Self-absorption model in quantitative laser induced breakdown spectroscopy measurements on soils and sediments. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 56, n. 6, p. 807–820, 2001.

LAZIC, V.; COLAO, F.; FANTONI, R.; SPIZZICHINO, V.; JOVIĆEVIĆ, S. Underwater sediment analyses by laser induced breakdown spectroscopy and calibration procedure for fluctuating plasma parameters. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 62, n. 1, p. 30–39, 2007.

LEHMANN, J.; HANSEL, C. M.; KAISER, C.; KLEBER, M.; MAHER, K.; MANZONI, S.; NUNAN, N.; REICHSTEIN, M.; SCHIMEL, J. P.; TORN, M. S.; WIEDER, W. R.; KÖGEL-KNABNER, I. Persistence of soil organic carbon caused by functional complexity. **Nature Geoscience**, Berlin, v. 13, n. 8, p. 529–534, 2020.

LEITE, M. S. O.; PETERNELLI, L. A.; BARBOSA, M. H. P.; CECON, P. R.; CRUZ, C. D. Sample size for full-sib family evaluation in sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1562–1574, 2009.

LINDEMAN, R. H.; MERENDA, P. F.; GOLD, R. Z. **Introduction to bivariate and multivariate analysis**. Glenview: Scott Foresman & Co, 1980.

LIU, L.; HUANG, X.; LI, S.; LU, Y.; CHEN, K.; JIANG, L.; SILVAIN, J. F.; LU, Y. F. Laser-induced breakdown spectroscopy enhanced by a micro torch. **Optics Express**, Washington, v. 23, n. 11, p. 15047, 2015.

LIU, X.; MILLERO, F. J. The solubility of iron in seawater. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 43–54, 2002.

LIU, Y.; BAUDELET, M.; RICHARDSON, M. Elemental analysis by microwave-assisted laser-induced breakdown spectroscopy: evaluation on ceramics. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 25, n. 8, p. 1316–1323, 2010.

LONG, E. R.; MACDONALD, D. D. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. **Human and Ecological Risk Assessment**, Philadelphia, v. 4, n. 5, p. 1019–1039, 1998.

LORÉN, N.; LANGTON, M.; HERMANSSON, A. M. Confocal fluorescence microscopy (CLSM) for food structure characterisation. *In*: McClements, J. (ed.). **Understanding and controlling the microstructure of complex foods**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 232–260.

LUPINACCI, C. M.; DA CONCEIÇÃO, F. T.; SIMON, A. L. H.; PEREZ FILHO, A. Land use changes due to energy policy as a determining factor for morphological processes in fluvial systems in São Paulo State, Brazil. **Earth Surface Processes and Landforms**, Hoboken, v. 42, n. 14, p. 2402–2413, 2017.

MACHADO, R. C.; ANDRADE, D. F.; BABOS, D. V.; CASTRO, J. P.; COSTA, V. C.; SPERANÇA, M. A.; GARCIA, J. A.; GAMELA, R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R. Solid sampling: advantages and challenges for chemical element determination - a critical review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 35, n. 1, p. 54–77, 2020.

MANCIULEA, A.; BAKER, A.; LEAD, J. R. A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles. **Chemosphere**, Kidlington, v. 76, n. 8, p. 1023–1027, 2009.

MARANGONI, B. S.; SILVA, K. S. G.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; CABRAL, J. S.; VILLAS-BOAS, P. R.; SILVA, C. S.; TEIXEIRA, P. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; BENITES, V. M.; MILORI, D. M. B. Phosphorus quantification in fertilizers using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): a methodology of analysis to correct physical matrix effects. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 78–82, 2016.

MARKECHOVÁ, D.; TOMKOVÁ, M.; SÁDECKÁ, J. Fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy and parallel factor analysis in drinking water treatment: a review. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 22, n. 5, p. 1289–1295, 2013.

MASON, R. L.; GUNST, R. F.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2003.

MCKNIGHT, D. M.; BOYER, E. W.; WESTERHOFF, P. K.; DORAN, P. T.; KULBE, T.; ANDERSEN, D. T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. **Limnology and Oceanography**, Hoboken, v. 46, n. 1, p. 38–48, 2001.

MENEGATTI, C. R.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; DA SILVA, O. A.; FILHO, H. J. I.; VILLAS BOAS, P. R.; MARANGONI, B. S.; MILORI, D. M. B. P. Semiquantitative analysis of mercury in landfill leachates using double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied Optics**, Washington, v. 56, n. 13, p. 3730–3735, 2017.

MEYERS, P. A. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 114, n. 3–4, p. 289–302, 1994.

MILORI, D. M. B. P.; VILLAS-BOAS, P. R.; NICOLODELLI, G.; MAGALHÃES, A. B.; CABRAL, J.; MARANGONI, B.; SEGNINI, A.; H., TENCA. M. M.; MARTIN-NETO, L. Aplicações agroambientais das técnicas fotônicas. *In*: NAIME, J. D. M.; MATTOSO, L. H. C.; DA SILVA, W. T. L.; CRUVINEL, P. E.; MARTIN-NETO, L.; CRESTANA, S. (ed.). **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. São Carlos: Embrapa Instrumentação-Livro científico, 2014. p. 47–75.

MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, Hoboken, v. 70, n. 1, p. 57–63, 2006.

MIZIOLEK, A. W.; PALLESCHI, V.; SCHECHTER, I. **Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): fundamentals and applications**. New York: Cambridge University Press, 2006.

MŁYNARCZYK, N.; BARTOSZEK, M.; POLAK, J.; SUŁKOWSKI, W. W. Forms of phosphorus in sediments from the Goczałkowice Reservoir. **Applied Geochemistry**, Kidlington, v. 37, p. 87–93, 2013.

MOBED, J. J.; HEMMINGSEN, S. L.; AUTRY, J. L.; MCGOWN, L. B. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 30, n. 10, p. 3061–3065, 1996.

MOLL, M.; SCHLANGES, M.; BORNATH, T.; KRAINOV, V. P. Inverse bremsstrahlung heating beyond the first Born approximation for dense plasmas in laser fields. **New Journal of Physics**, Bristol, v. 14, 2012.

MORTATTI, J.; DE OLIVEIRA, H.; DE MORAES, G. M.; VENDRAMINI, D.; FERNANDES, A. M. Distribution of heavy metals in the geochemical phases of sediments from the Tietê River, Brazil. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Oxon, v. 25, n. 3, p. 194–200, 2013.

MORTATTI, J.; MORAES, G. M.; PROBST, J. L. Heavy metal distribution in recent sediments along the Tietê River basin (São Paulo, Brazil). **Geochemical Journal**, Tokyo, v. 46, n. 1, p. 13–19, 2012.

MOUNIER, S.; ZHAO, H.; GARNIER, C.; REDON, R. Copper complexing properties of dissolved organic matter: PARAFAC treatment of fluorescence quenching. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 107–116, 2011.

MULLER, G. Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. **Geojournal**, Dordrecht, v. 2, p. 108–118, 1969.

MULLER, M.; JIMENEZ, J.; ANTONINI, M.; DUDAL, Y.; LATRILLE, E.; VEDRENNE, F.; STEYER, J. P.; PATUREAU, D. Combining chemical sequential extractions with 3D fluorescence spectroscopy to characterize sludge organic matter. **Waste Management**, Kidlington, v. 34, n. 12, p. 2572–2580, 2014.

MURDOCH, A.; MACKNIGHT, S. (ed.). **Handbook of techniques for aquatic sediments sampling**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A.; GRAEBER, D.; BRO, R. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Analytical Methods*, Cambridge, v. 5, n. 23, p. 6557–6566, 2013.

MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A.; WENIG, P.; BRO, R. OpenFluor - an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Analytical Methods*, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 658–661, 2014.

MURPHY, K. R.; BRO, R.; STEDMON, C. A. Chemometric analysis of organic matter fluorescence. *In*: COBLE, P. G.; LEAD, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M.; SPENCER, R. G. (ed.). **Aquatic organic matter fluorescence**. New York: Cambridge University Press, 2014. p. 339–375.

MUSAZZI, S.; PERINI, U. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: theory and applications**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.

NAKAMURA, S.; ITO, Y.; SONE, K.; HIRAGA, H.; KANEKO, K. I. Determination of an iron suspension in water by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy with two sequential laser pulses. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 68, n. 17, p. 2981–2986, 1996.

NASSEF, O. A.; ELSAYED-ALI, H. E. Spark discharge assisted laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy*, Kidlington, v. 60, n. 12, p. 1564–1572, 2005.

NERIS, J. B.; MONTALVÁN OLIVARES, D. M.; VELASCO, F. G.; LUZARDO, F. H. M.; CORREIA, L. O.; GONZÁLEZ, L. N. HHRISK: A code for assessment of human health risk due to environmental chemical pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, San Diego, v. 170, p. 538–547, 2019.

NERIS, J. B.; MONTALVÁN OLIVARES, D. M.; SANTANA, C. S.; EMENIKE, P. C.; VELASCO, F. G.; ANDRADE, S. F. R.; PARANHOS, C. M. HERisk: An improved spatio-temporal human health risks assessment software. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 772, p. 145044, 2021.

NICOLODELLI, G.; VILLAS-BOAS, P. R.; MENEGATTI, C. R.; SENESI, G. S.; MAGALHÃES, D. V.; SOUZA, D.; MILORI, D. M. B. P. MARANGONI, B. S. Determination of Pb in soils by double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy assisted by continuum wave-diode laser-induced fluorescence. *Applied Optics*, Washington, v. 57, n. 28, p. 8366, 2018.

NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; RANULFI, A. C.; MARANGONI, B. S.; WATANABE, A.; BENITES, V. M.; DE OLIVEIRA, P. P. A.; VILLAS-BOAS, P.; MILORI, D. M. B. P. Double-pulse laser induced breakdown spectroscopy in orthogonal beam geometry to enhance line emission intensity from agricultural samples. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v. 133, p. 272–278, 2017.

NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; PERAZZOLI, I. L. O.; MARANGONI, B. S.; BENITES, V. M.; MILORI, D. M. B. P. Double pulse laser induced breakdown spectroscopy: A potential tool for the analysis of contaminants and macro/micronutrients in organic mineral fertilizers. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 565, p. 1116–1123, 2016.

NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; ROMANO, R. A.; PERAZZOLI, I. L. O.; MILORI, D. M. B. P. Signal enhancement in collinear double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy applied to different soils. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 111, p. 23–29, 2015.

NIXON, S. W. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. **Ophelia**, Stenstrup, v. 41, n. 1, p. 199–219, 1995.

NOLL, R. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: fundamentals and applications**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.

OLK, D. C.; BLOOM, P. R.; PERDUE, E. M.; MCKNIGHT, D. M.; CHEN, Y.; FARENHORST, A.; SENESI, N.; CHIN, Y. P.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; HERTKORN, N.; HARIR, M. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters. **Journal of Environmental Quality**, Hoboken, v. 48, p. 217–232, 2019.

OSBURN, C. L.; WIGDAHL, C. R.; FRITZ, S. C.; SAROS, J. E. Dissolved organic matter composition and photoreactivity in prairie lakes of the U.S. Great Plains. **Limnology and Oceanography**, Hoboken, v. 56, n. 6, p. 2371–2390, 2011.

OSBURN, C. L.; DEL VECCHIO, R.; BOYD, T. J. Physicochemical effects on dissolved organic matter fluorescence in natural waters. *In*: COBLE, P. G.; LEAD, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M.; SPENCER, R. G. (ed.). **Aquatic organic matter fluorescence**. New York: Cambridge University Press, 2014. p. 233–277.

PASQUINI, C.; CORTEZ, J.; SILVA, L. M. C.; GONZAGA, F. B. Laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 463, 2007.

PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer Science & Business Media, 2006.

PEREIRA, T. S.; MOREIRA, Í. T. A.; DE OLIVEIRA, O. M. C.; RIOS, M. C.; FILHO, W. A. C. S.; DE ALMEIDA, M.; DE CARVALHO, G. C. Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, Kidlington, v. 99, n. 1–2, p. 166–177, 2015.

PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 9, p. 1061–1071, 2018.

PIETRZYK, D. J.; FRANK, C. W. **Analytical chemistry**. 2. ed. New York: Academic Press, 1979. p. 466–475.

PITTA, E.; ZERI, C. The impact of combining data sets of fluorescence excitation - emission matrices of dissolved organic matter from various aquatic sources on the information retrieved by PARAFAC modeling. **Spectrochimica Acta - Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 258, p. 119800, 2021.

POPOV, A. M.; COLAO, F.; FANTONI, R. Spatial confinement of laser-induced plasma to enhance LIBS sensitivity for trace elements determination in soils. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 25, n. 6, p. 837–848, 2010.

POSSINGER, A. R.; ZACHMAN, M. J.; ENDERS, A.; LEVIN, B. D. A.; MULLER, D. A.; KOURKOUTIS, L. F.; LEHMANN, J. Organo–organic and organo–mineral interfaces in soil at the nanometer scale. **Nature Communications**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020.

POURRET, O.; HURSTHOUSE, A. It's time to replace the term “heavy metals” with “potentially toxic elements” when reporting environmental research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Basel, v. 16, n. 22, 2019.

PROJETO MapBiomias - Mapeamento da superfície de água no Brasil. **A dinâmica da superfície de água do território brasileiro**. São Paulo, 2021. Disponível em: [https://mapbiomas-br-site.s3.amazonaws.com/MapBiomias\\_Água\\_Agosto\\_2021\\_22082021\\_OK\\_v2.pdf](https://mapbiomas-br-site.s3.amazonaws.com/MapBiomias_Água_Agosto_2021_22082021_OK_v2.pdf). Acesso em: 26 ago. 2021.

QINGJIE, G.; JUN, D.; YUNCHUAN, X.; QINGFEI, W.; LIQIANG, Y. Calculating pollution indices by heavy metals in ecological geochemistry assessment and a case study in Parks of Beijing. **Journal of China University of Geosciences**, Wuhan, v. 19, n. 3, p. 230–241, 2008.

RADZIEMSKI, L.; CREMERS, D. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 87, p. 3–10, 2013.

RADZIEMSKI, L. J. From LASER to LIBS, the path of technology development. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, Kidlington, v. 57, n. 7, p. 1109–1113, 2002.

RASHID, B.; AHMED, R.; ALI, R.; BAIG, M. A. A comparative study of single and double pulse of laser induced breakdown spectroscopy of silver. **Physics of Plasmas**, Melville, v. 18, n. 7, 2011.

REDON, R.; MOUNIER, S. **Progmeef**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <http://woms18.univ-tln.fr/progmeef/>

REYNOLDS, C. S.; DAVIES, P. S. Sources and bioavailability of phosphorus fractions in freshwaters: a British perspective. **Biological Reviews**, Hoboken, v. 76, n. 1, p. 27–64, 2001.

ROCHA, F. R.; SILVA, P. S. C.; CASTRO, L. M.; BORDON, I. C. C. L.; OLIVEIRA, S. M. B.; FÁVARO, D. I. T. NAA and XRF technique bottom sediment assessment for major and trace elements: Tietê River, São Paulo State, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 306, n. 3, p. 655–665, 2015.

ROCHA, P. S.; AZAB, E.; SCHMIDT, B.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 73, n. 4, p. 550–558, 2010.

ROCHA, P. S.; BERNECKER, C.; STRECKER, R.; MARIANI, C. F.; POMPÊCO, M. L. M.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 74, n. 7, p. 1951–1959, 2011.

RODRIGUES, T.; ALCÂNTARA, E.; ROTTA, L.; BERNARDO, N.; WATANABE, F. An investigation into the relationship between light absorption budget and trophic status in inland waters. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 115, p. 106410, 2020.

ROMERA, J. P. R.; BARSANELLI, P. L.; PEREIRA, F. M. V. Expedient prediction of fiber content in sugar cane: an analytical possibility with LIBS and chemometrics. **Fuel**, Kidlington, v. 166, p. 473–476, 2016.

ROSOLEN, V.; DE-CAMPOS, A. B.; GOVONE, J. S.; ROCHA, C. Contamination of wetland soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas Gerais, Brazil). **Catena**, Amsterdam, v. 128, p. 203–210, 2015.

RYAN, D. K.; WEBER, J. H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 54, n. 6, p. 986–990, 1982.

RYDBERG, J.; COOKE, C. A.; TOLU, J.; WOLFE, A. P.; VINEBROOKE, R. D. An assessment of chlorophyll preservation in lake sediments using multiple analytical techniques applied to the annually laminated lake sediments of Nylandssjön. **Journal of Paleolimnology**, Dordrecht, v. 64, n. 4, p. 379–388, 2020.

SAHU, K. C.; PRUSTY, B. G.; GODGUL, G. Metal contamination due to mining and milling activities at the Zawar zinc mine, Rajasthan, India. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 112, n. 3–4, p. 293–307, 1994.

SANCHINI, N.; GROSJEAN, M. Quantification of chlorophyll a, chlorophyll b and pheopigments a in lake sediments through deconvolution of bulk UV–VIS absorption spectra. **Journal of Paleolimnology**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 243–256, 2020.

SCAFFIDI, J.; ANGEL, S. M.; CREMERS, D. A. Emission enhancement mechanisms in dual-pulse LIBS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 24–32, 2006.

SCHORER, M.; EISELE, M. Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 99, p. 651–659, 1997.

SENESI, G. S.; DELL'AGLIO, M.; GAUDIUSO, R.; DE GIACOMO, A.; ZACCONE, C.; DE PASCALE, O.; MIANO, T. M.; CAPITELLI, M. Heavy metal concentrations in soils as determined by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), with special emphasis on chromium. **Environmental Research**, San Diego, v. 109, n. 4, p. 413–420, 2009.



SENESI, G. S.; MARTIN-NETO, L.; VILLAS-BOAS, P. R.; NICOLODELLI, G.; MILORI, D. M. B. P. Laser-based spectroscopic methods to evaluate the humification degree of soil organic matter in whole soils: a review. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 18, n. 4, p. 1292–1302, 2018.

SENESI, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, Philadelphia, v. 152, n. 4, p. 259–271, 1991.

SHUTOVA, Y.; BAKER, A.; BRIDGEMAN, J.; HENDERSON, R. K. Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths. **Water Research**, Kidlington, v. 54, p. 159–169, 2014.

SILVA, L. S.; CONSTANTINO, I. C.; BENTO, L. R.; TADINI, A. M.; BISINOTI, M. C.; BOSCOLO, M.; FERREIRA, O. P.; MOUNIER, S.; PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; CORNÉLIO, M. L.; MOREIRA, A. B. Humic extracts from hydrochar and Amazonian Anthrosol: molecular features and metal binding properties using EEM-PARAFAC and 2D FTIR correlation analyses. **Chemosphere**, Kidlington, v. 256, p. 1–12, 2020.

SINGH, J. P.; THANKUR, S. N. **Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.

SIRE, J.; KLAVINS, M.; KREISMANIS, J.; JANSONE, S. Impact of the process of isolating humic acids from peat on their properties. **Canadian Journal of Civil Engineering**, Ottawa, v. 36, n. 2, p. 345–355, 2009.

SMITH, W. S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O. Environmental gradient in reservoirs of the medium and low Tietê River: limnological differences through the habitat sequence. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 26, n. 1, p. 73–88, 2014.

STASIUK, L. D.; SANEI, H. Characterization of diatom-derived lipids and chlorophyll within Holocene laminites, Saanich Inlet, British Columbia, using conventional and laser scanning fluorescence microscopy. **Organic Geochemistry**, Kidlington, v. 32, n. 12, p. 1417–1428, 2001.

SUMMERHAYES, C. P.; KROON, D.; ROSELL-MELÉ, A.; JORDAN, R. W.; SCHRADER, H. J.; HEARN, R.; VILLANUEVA, J.; GRIMALT, J. O.; EGLINTON, G. Variability in the Benguela current upwelling system over the past 70,000 years. **Progress in Oceanography**, Kidlington, v. 35, n. 3, p. 207–251, 1995.

SUN, M. Y.; LEE, C.; ALLER, R. C. Anoxic and oxic degradation of <sup>14</sup>C-labeled chloropigments and a <sup>14</sup>C-labeled diatom in Long Island Sound sediments. **Limnology and Oceanography**, Hoboken, v. 38, n. 7, p. 1438–1451, 1993.

SZYMCZAK-ZYŁA, M.; KOWALEWSKA, G.; LOUDA, J. W. Chlorophyll-a and derivatives in recent sediments as indicators of productivity and depositional conditions. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 1–4, p. 39–48, 2011.

TADINI, A. M.; XAVIER, A. A. P.; MILORI, D. M. B. P.; OLIVEIRA, P. P. A.; PEZZOPANE, J. R.; BERNARDI, A. C. C.; MARTIN-NETO, L. Evaluation of soil organic matter from integrated production systems using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 211, p. 105001, 2021.

TADINI, A. M.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; ISHIDA, D. A.; MONTES, C. R.; LUCAS, Y.; MOUNIER, S.; GUIMARÃES, F. E. G.; MILORI, D. M. B. P. Soil organic matter in podzol horizons of the Amazon region: humification, recalcitrance, and dating. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 613–614, p. 160–167, 2018.

THOMAZ, S. M.; PEREIRA, G.; PAGIORO, T. A. Microbial respiration and chemical composition of different sediment fractions in waterbodies of the upper Paraná River floodplain, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 277–286, 2001.

THRANE, J. E.; KYLE, M.; STRIEBEL, M.; HAANDE, S.; GRUNG, M.; ROHRLACK, T.; ANDERSEN, T. Spectrophotometric analysis of pigments: a critical assessment of a high-throughput method for analysis of algal pigment mixtures by spectral deconvolution. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1–24, 2015.

TIVET, F.; SÁ, J. C. M.; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BRIEDIS, C.; LETOURMY, P.; PINHEIRO, L. A.; BORSZOWSKI, P. R.; HARTMAN, D. C. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, Amsterdam, v. 207–208, n. 1, p. 71–81, 2013.

TUCKER, S. A.; AMSZI, V. L.; ACREE, W. E. The modern student laboratory : fluorescence spectroscopy primary and secondary inner filtering effect of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> on fluorescence emission intensities of quinine sulfate. **Journal of Chemical Education**, Washington, v. 69, n. 1, p. A8, 1992.

ULLAH, R.; MUHAMMAD, S.; JADOON, I. A. K. Potentially harmful elements contamination in water and sediment: evaluation for risk assessment and provenance in the northern Sulaiman fold belt, Baluchistan, Pakistan. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 147, p. 1155–1162, 2019.

USEPA. **Method 6010C (SW-846)**: inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry. Washington, DC: USEPA Office of Water, 2000.

USEPA. **Method 3051A (SW-846)**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, and oils. Washington, DC: USEPA Office of Water, 2007.

VADILLO, J. M.; FERNÁNDEZ ROMERO, J. M.; RODRÍGUEZ, C.; LASERNA, J. J. Effect of plasma shielding on laser ablation rate of pure metals at reduced pressure. **Surface and Interface Analysis**, Hoboken, v. 27, n. 11, p. 1009–1015, 1999.

VERES, D. S. A comparative study between loss on ignition and total carbon analysis on mineralogenic sediments. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai Geologia**, Cluj-Napoca, v. 47, n. 1, p. 171–182, 2002.

- VIEIRA, A. L.; SILVA, T. V.; DE SOUSA, F. S. I.; SENESI, G. S.; SANTOS JÚNIOR, D.; FERREIRA, E. C.; GOMES NETO, J. A. Determinations of phosphorus in fertilizers by spark discharge-assisted laser-induced breakdown spectroscopy. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 139, p. 322–326, 2018.
- VILLANUEVA, J.; HASTINGS, D. W. A century-scale record of the preservation of chlorophyll and its transformation products in anoxic sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Kidlington, v. 64, n. 13, p. 2281–2294, 2000.
- WACHTER, J. R.; CREMERS, D. A. Determination of uranium in solution using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 41, n. 6, p. 1042–1048, 1987.
- WALKER, S. A.; AMON, R. M. W.; STEDMON, C. A. Variations in high-latitude riverine fluorescent dissolved organic matter: a comparison of large Arctic rivers. **Journal of Geophysical Research: biogeosciences**, Hoboken, v. 118, n. 4, p. 1689–1702, 2013.
- WEISHAAR, J. L.; FRAM, M. S.; FUJII, R.; MOPPER, K. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 37, p. 4702–4708, 2003.
- WEN, S.; WANG, H.; WU, T.; YANG, J.; JIANG, X.; ZHONG, J. Vertical profiles of phosphorus fractions in the sediment in a chain of reservoirs in North China: implications for pollution source, bioavailability, and eutrophication. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 704, p. 135318, 2020.
- YAMASHITA, Y.; JAFFÉ, R.; MAIE, N.; TANOUE, E. Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). **Limnology and Oceanography**, Hoboken, v. 53, n. 5, p. 1900–1908, 2008.
- YAMASHITA, Y.; SCINTO, L. J.; MAIE, N.; JAFFÉ, R. Dissolved organic matter characteristics across a subtropical Wetland's Landscape: application of optical properties in the assessment of environmental dynamics. **Ecosystems**, New York, v. 13, n. 7, p. 1006–1019, 2010a.
- YAMASHITA, Y.; CORY, R. M.; NISHIOKA, J.; KUMA, K.; TANOUE, E.; JAFFÉ, R. Fluorescence characteristics of dissolved organic matter in the deep waters of the Okhotsk Sea and the northwestern North Pacific Ocean. **Deep-Sea Research Part II: topical studies in oceanography**, Kidlington, v. 57, n. 16, p. 1478–1485, 2010b.
- YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 145–156, 2005.
- YU, K.; ZHAO, Y.; HE, Y.; HE, D. Response surface methodology for optimizing LIBS testing parameters: a case to conduct the elemental contents analysis in soil. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 195, p. 103891, 2019.

YUAN, S.; TANG, H.; XIAO, Y.; XIA, Y.; MELCHING, C.; LI, Z. Phosphorus contamination of the surface sediment at a river confluence. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 573, p. 568–580, 2019.

ZANG, X.; VAN HEEMST, J. D. H.; DRIA, K. J.; HATCHER, P. G. Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. **Organic Geochemistry**, Kidlington, v. 31, n. 7–8, p. 679–695, 2000.

ZEPP, R. G.; SHELDON, W. M.; MORAN, M. A. Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 89, n. 1–4, p. 15–36, 2004.

ZHANG, G.; BAI, .; ZHAO, Q.; LU, Q.; JIA, J.; WEN, X. Heavy metals in wetland soils along a wetland-forming chronosequence in the Yellow River Delta of China: levels, sources and toxic risks. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 69, p. 331–339, 2016.

ZHANG, L.; LIU, H.; PENG, Y.; ZHANG, Y.; SUN, Q. Characteristics and significance of dissolved organic matter in river sediments of extremely water-deficient basins: a Beiyun River case study. **Journal of Cleaner Production**, Kidlington, v. 277, p. 123063, 2020.

ZWINKELS, J. C.; DEROSE, P. C.; LELAND, J. E. Spectral fluorescence measurements. *In*: EXPERIMENTAL methods in the physical sciences. New York: Academic Press, 2014. v. 46, p. 221–290.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A – Avaliações de risco ecológico

Tabela 1A – Equações usadas para realizar as avaliações de risco ecológico.

Descrição	Equação	Avaliação de risco ecológico	Parâmetros usados	Referência
<b>Índices de poluição simples</b>				
Fator de contaminação ( <i>CF</i> )	$CF = \frac{C}{C_{ref}}$		<i>C</i> = Concentração de espécies químicas na matriz (mg kg <sup>-1</sup> ); <i>C<sub>ref</sub></i> = Concentração de fundo de espécies químicas (mg kg <sup>-1</sup> ).	Keshavarzi e Kumar (2019)
Índice de geoacumulação ( <i>I<sub>geo</sub></i> )	$I_{geo} = \log_2 \left[ \frac{C}{1.5 \cdot C_{ref}} \right]$			Muller (1969)
Fator de enriquecimento ( <i>EF</i> )	$EF = \frac{(C/C_{ref})}{(C_{Fe}/C_{Fe,ref})}$		<i>C<sub>Fe</sub></i> = Concentração de espécies químicas de referência (Fe) no sedimento (mg kg <sup>-1</sup> ); <i>C<sub>Fe,ref</sub></i> = Concentração de fundo de espécies químicas de referência (Fe) no sedimento (mg kg <sup>-1</sup> ).	Emenike et al. (2020)
<b>Índices de poluição combinados</b>				
Grau modificado de contaminação ( <i>mCd</i> )	$mCd = \sum_{j=1}^n CF_j$		<i>CF<sub>j</sub></i> = Fator de contaminação da matriz devido à espécie química j; <i>n</i> = Número de espécies químicas.	Hakanson (1980)
Índice de poluição de limiar integrado ( <i>IPI<sub>Th</sub></i> )	$IPI_{Th} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n \left( \frac{C}{C_{TL}} \right)_j$		<i>C<sub>TL</sub></i> = Valor de referência estabelecido pela legislação nacional para a espécie química j (mg kg <sup>-1</sup> ).	Qingjie et al. (2008) e He et al. (2019)
Índice de carga de poluição ( <i>PLI</i> )	$PLI = \sqrt[n]{\prod_{j=1}^n CF_j}$			Doležalová Weissmannová et al. (2019)
Índice de risco ecológico potencial ( <i>PERI</i> )	$PERI = \sum_{j=1}^n T_{r,j} \cdot CF_j$		<i>T<sub>r,j</sub></i> = Fator de resposta tóxica da espécie química j.	Emenike et al. (2020)
Quociente de nível de efeito provável médio ( <i>m-PEL-q</i> )	$m - PEL - q = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n \left( \frac{C}{PEL} \right)_j$		<i>PEL</i> = Nível de efeito provável (mg kg <sup>-1</sup> ).	Gao e Li (2012)
Índice de risco tóxico ( <i>TRI</i> )	$TRI = \sum_{j=1}^n \sqrt{\frac{\left( \frac{C}{PEL} \right)_j^2 + \left( \frac{C}{TEL} \right)_j^2}{2}}$		<i>TEL</i> = Limite de efeito de limiar (mg kg <sup>-1</sup> ).	Zhang et al. (2016)

Fonte: Autoria própria.

## APÊNDICE B – Índices ecológicos e avaliação da poluição usando SQGs

Tabela 2A – Parâmetros e valores de referência usados para o cálculo dos índices ecológicos e avaliação da poluição usando SQGs.

Parâmetros	Estação	Cr	Cu	Fe	Ni
$C_{ref}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) a	1	1,00 <sup>b</sup>	10,50	9633,25	5,83
	2	1,00 <sup>b</sup>	10,67	9103,67	8,50
	3	1,00 <sup>b</sup>	11,00	6871,00	10,75
	4	1,00 <sup>b</sup>	12,67	9760,33	17,00
	5	1,00 <sup>b</sup>	4,00	10486,71	21,73
	6	1,00 <sup>b</sup>	4,71	10854,71	23,41
	7	1,00 <sup>b</sup>	6,25	6465,25	24,95
$C_{TL}$ (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>		37,30	35,70	n.d.	18,00
$T_r$ <sup>d</sup>		2,00	5,00	n.d.	5,00
TEL (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>e, f</sup>		37,30	35,70	n.d.	18,00
PEL (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>e, g</sup>		90,00	197,00	n.d.	36,00

n.d. - não determinado; <sup>a</sup> Valores retirados de Bramorski (2004); <sup>b</sup> limite de quantificação (LOQ) apresentado em Bramorski (2004) foi utilizado uma vez que as concentrações de Cr fornecidas por esta referência estavam todas abaixo do valor do LOQ; <sup>c</sup> Valores retirados do BRASIL (2012); <sup>d</sup> Valores retirados de Hakanson (1980) e Ullah et al. (2019); <sup>e</sup> Valores retirados de Buchman (2008); <sup>f</sup> Mesmos valores do Nível 1 (Limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota) definidos pelas diretrizes do BRASIL (2012); <sup>g</sup> Mesmos valores do Nível 2 (Limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota) definidos pelas diretrizes do BRASIL (2012).

Fonte: Autoria própria.

### APÊNDICE C – Classificação de riscos ecológicos e poluição ambiental

Tabela 3A – Classificação de riscos ecológicos e poluição ambiental.

<b>Categoria</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Nível de contaminação</b>	Não poluído	Baixo a moderadamente poluído	Moderadamente poluído	Moderadamente a fortemente poluído	Fortemente poluído	Fortemente a extremamente poluído	Extremamente poluído
<i>I<sub>geo</sub></i> <sup>a</sup>	≤ 0	0 – 1	1 – 2	2 – 3	3 – 4	4 – 5	≥ 5
<i>EF</i> <sup>a</sup>	< 1	1 – 3	3 – 5	5 – 10	10 – 25	25 – 50	> 50
<i>mC<sub>d</sub></i> <sup>b</sup>	< 1,5	1,5 – 2,0	2,0 – 4,0	4,0 – 8,0	8,0 – 16,0	16,0 – 32,0	≥ 32,0
<i>IPI<sub>Th</sub></i> <sup>c</sup>	–	≤ 1	1 – 2	–	2 – 5	–	> 5
<b>Categoria</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
<b>Risco</b>	Insignificante	Baixo	Moderado	Considerável	Alto	Extremo	
<i>PERI</i> <sup>d</sup>	–	< 150	150 – 300	–	300 – 600	≥ 600	
<i>TRI</i> <sup>f</sup>	≤ 5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	≥ 20	–	
<b>Categoria</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>			
<b>Probabilidade de ser tóxico</b>	10%	25%	50%	76%			
<i>m-PEL-q</i> <sup>e</sup>	< 0,10	0,11 – 1,50	1,51 – 2,30	> 2,30			
<b>Categoria</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>				
<b>Nível de contaminação</b>	Não poluído	Níveis básicos de poluição		Poluído			
<i>PLI</i> <sup>d</sup>	< 1,0	= 1,0		> 1,0			

<sup>a</sup> Keshavarzi e Kumar (2019); <sup>b</sup> Abraham e Parker (2007); <sup>c</sup> He et al. (2019); <sup>d</sup> Emenike et al. (2020); <sup>e</sup> Long e MacDonald (1998); <sup>f</sup> Zhang et al. (2016).

Fonte: Autoria própria.

**APÊNDICE D – Qualidade do sedimento de acordo com SQGs****Tabela 4A – Qualidade do sedimento de acordo com SQGs**

<b>Concentração (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>
Média	45,52	66,08	35,49
Mínimo	33,27	30,25	18,23
Máximo	56,84	123,63	63,93
<b>Avaliação da qualidade do sedimento</b>			
% de amostras < TEL	14,3	28,6	0,0
% de amostras entre TEL e PEL	85,7	71,4	57,1
% de amostras > PEL	0,0	0,0	42,9

Nenhum valor de SQGs padrão estava disponível para Fe.

**Fonte:** Autoria própria.



**APÊNDICE E – Valores de índices combinados em cada ponto de amostragem**

**Tabela 5A** – Valores de índices combinados em cada ponto de amostragem.

<b>Estação</b>	<b><i>PLI</i></b>	<b><i>mC<sub>d</sub></i></b>	<b><i>PERI</i></b>	<b><i>IPI<sub>Th</sub></i></b>	<b><i>m-PEL-q</i></b>	<b><i>TRI</i></b>
1	7,49	14,85	125,61	1,09	0,40	2,47
2	6,07	12,22	101,63	0,97	0,37	2,22
3	7,96	15,73	124,82	1,28	0,48	2,92
4	6,82	13,51	115,46	1,63	0,65	3,75
5	12,53	23,28	277,83	2,82	1,00	6,41
6	7,13	13,86	159,45	1,60	0,53	3,61
7	11,06	21,00	208,54	2,38	0,83	5,38

**Fonte:** Autoria própria.

**APÊNDICE F – Características da matéria orgânica extraída dos sedimentos**

**Tabela 6A** – Concentração média de carbono orgânico não-purgável (NPOC) e nitrogênio orgânico total (TON), rendimento de extração alcalina, razão molar NPOC/TON e absorvância ultravioleta específica a 254 nm (SUVA<sub>254</sub>) da matéria orgânica extraída de sedimentos para todas as amostras de sedimentos.

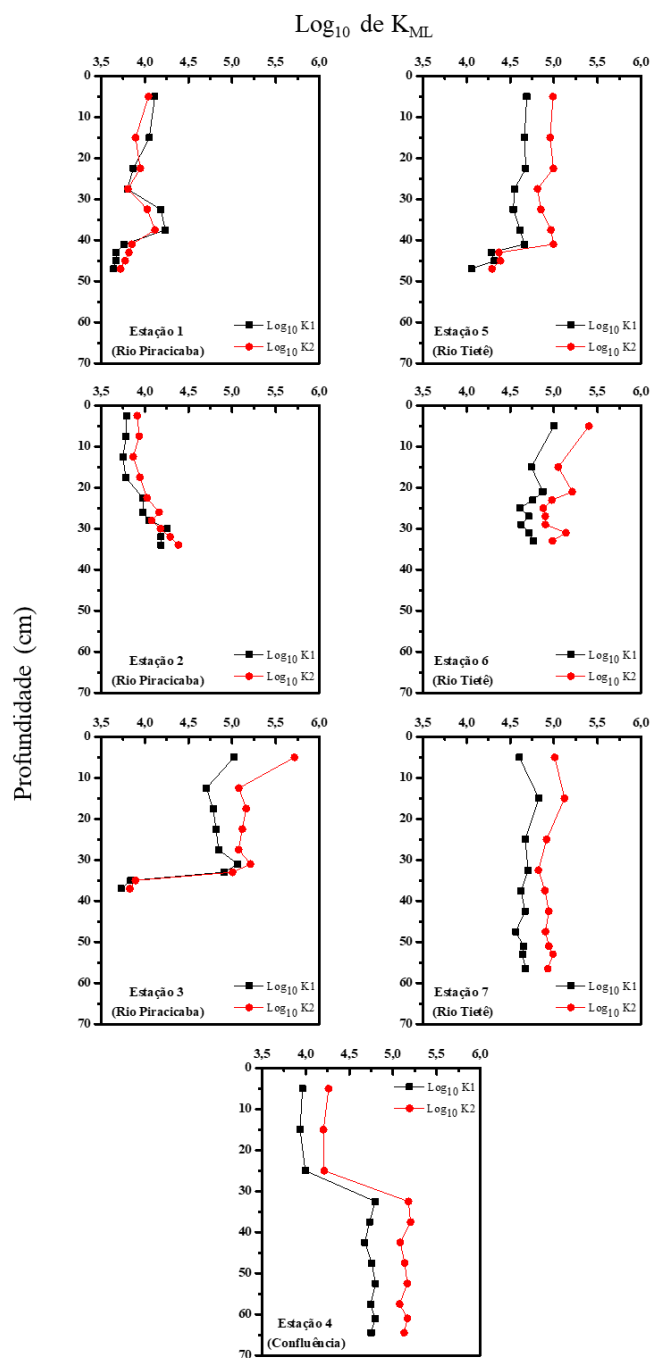
Estação	Profundidade (cm)	NPOC (mg C g <sup>-1</sup> )	TON (mg N g <sup>-1</sup> )	Rendimento de extração (%)	Razão molar NPOC/TON	SUVA <sub>254</sub> (L mg <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> )
1	5,0	8,12±0,02	1,05±0,01	29,88 ± 2,33	6,63 ± 0,0002	6,94 ± 0,02
	15,0	8,15±0,03	1,05±0,01	35,84 ± 0,55	6,63 ± 0,0002	6,80 ± 0,03
	22,5	9,12±0,03	1,15±0,01	45,23 ± 11,12	6,81 ± 0,0003	6,67 ± 0,03
	27,5	10,28±0,02	1,32±0,00	43,42 ± 1,02	6,67 ± 0,00004	5,73 ± 0,02
	32,5	8,30±0,06	1,06±0,00	36,90 ± 1,12	6,71 ± 0,0003	6,66 ± 0,06
	37,5	9,71±0,08	1,21±0,01	46,13 ± 0,75	6,90 ± 0,0006	5,56 ± 0,08
	41,0	8,14±0,07	0,98±0,00	41,47 ± 0,96	7,14 ± 0,0001	7,09 ± 0,07
	43,0	9,10±0,04	1,12±0,00	43,74 ± 0,70	6,96 ± 0,0001	6,08 ± 0,04
	45,0	9,04±0,01	1,19±0,00	39,08 ± 0,42	6,52 ± 0,00003	6,12 ± 0,01
	47,0	10,23±0,04	1,25±0,01	44,60 ± 1,70	7,00 ± 0,0002	5,97 ± 0,04
2	2,5	13,12±0,12	1,77±0,02	39,50 ± 0,95	6,35 ± 1,003	5,39 ± 0,12
	7,5	11,43±0,10	1,59±0,02	40,41 ± 1,35	6,15 ± 1,002	4,89 ± 0,10
	12,5	9,07±0,09	1,20±0,01	35,56 ± 0,88	6,49 ± 0,0007	5,63 ± 0,09
	17,5	9,48±0,11	1,17±0,01	37,74 ± 0,98	6,97 ± 1,001	5,34 ± 0,11
	22,5	9,21±0,08	1,12±0,01	39,72 ± 1,00	7,08 ± 0,001	5,87 ± 0,08
	26,0	8,96±0,06	1,07±0,01	38,68 ± 0,65	7,17 ± 0,0006	6,32 ± 0,06
	28,0	9,31±0,04	1,03±0,01	43,93 ± 0,94	7,73 ± 0,0005	6,38 ± 0,04
	30,0	11,42±0,06	1,12±0,01	43,89 ± 0,86	8,74 ± 0,0005	6,32 ± 0,06
	32,0	13,54±0,03	1,27±0,01	43,29 ± 0,98	9,17 ± 0,0002	6,70 ± 0,03
	34,0	10,98±0,07	1,20±0,01	47,61 ± 1,16	7,84 ± 0,0004	7,10 ± 0,07
3	5,0	15,37±0,05	2,30±0,01	31,10 ± 0,47	5,72 ± 0,0005	6,56 ± 0,05
	12,5	15,58±0,05	2,33±0,01	45,53 ± 0,79	5,73 ± 0,0005	4,68 ± 0,05
	17,5	14,08±0,03	2,03±0,02	47,32 ± 0,64	5,94 ± 0,0006	4,75 ± 0,03
	22,5	11,40±0,06	1,59±0,02	42,92 ± 0,88	6,14 ± 0,001	6,03 ± 0,06
	27,5	12,36±0,07	1,70±0,02	51,15 ± 0,97	6,23 ± 0,001	5,35 ± 0,07
	31,0	9,89±0,04	1,44±0,01	39,88 ± 0,69	5,89 ± 0,0003	7,91 ± 0,04
	33,0	11,94±0,05	1,58±0,01	52,18 ± 1,20	6,50 ± 0,0006	6,15 ± 0,05
	35,0	11,67±0,10	1,50±0,01	47,75 ± 1,03	6,68 ± 0,001	6,29 ± 0,10
	37,0	11,05±0,02	1,32±0,01	49,25 ± 1,38	7,19 ± 0,0002	7,28 ± 0,02
4	5,0	22,46±0,04	3,75±0,01	39,00 ± 0,58	5,13 ± 0,0005	3,88 ± 0,04
	15,0	18,06±0,07	3,15±0,02	43,56 ± 0,65	4,91 ± 0,001	4,40 ± 0,07
	25,0	16,95±0,08	3,04±0,03	41,82 ± 0,58	4,78 ± 0,002	4,05 ± 0,08
	32,5	13,56±0,05	2,27±0,01	38,73 ± 0,51	5,13 ± 0,0003	4,31 ± 0,05
	37,5	10,39±0,11	1,98±0,02	28,22 ± 0,60	4,49 ± 0,003	5,53 ± 0,11
	42,5	18,36±0,06	3,14±0,01	43,80 ± 0,59	5,01 ± 0,0005	3,64 ± 0,06
	47,5	12,29±0,08	2,18±0,01	38,09 ± 0,58	4,83 ± 0,001	3,91 ± 0,08
	52,5	8,07±0,07	1,44±0,01	33,07 ± 0,57	4,81 ± 0,0009	5,63 ± 0,07
	57,5	10,78±0,08	1,92±0,02	36,77 ± 0,64	4,81 ± 0,002	5,08 ± 0,08
	61,0	10,85±0,01	2,01±0,01	38,77 ± 0,41	4,63 ± 0,0001	4,07 ± 0,01
	64,5	7,16±0,06	1,50±0,01	27,09 ± 0,46	4,08 ± 0,001	5,38 ± 0,06
5	5,0	22,55±0,17	3,21±0,01	43,02 ± 2,12	6,03 ± 1,001	4,04 ± 0,17

	15,0	24,24±0,14	3,46±0,01	48,32 ± 0,94	6,01 ± 1,002	3,78 ± 0,14
	22,5	31,49±0,22	4,62±0,03	47,80 ± 1,24	5,85 ± 2,006	3,40 ± 0,22
	27,5	18,97±0,11	2,56±0,00	42,31 ± 0,84	6,34 ± 1,0002	3,60 ± 0,11
	32,5	18,17±0,07	2,86±0,01	36,30 ± 0,80	5,44 ± 0,0007	4,87 ± 0,07
	37,5	20,52±0,13	3,35±0,02	37,09 ± 0,80	5,25 ± 0,002	3,98 ± 0,13
	41,0	18,86±0,12	3,07±0,01	40,46 ± 1,00	5,26 ± 0,001	3,11 ± 0,12
	43,0	10,24±0,01	1,86±0,01	33,16 ± 0,40	4,71 ± 0,0001	5,03 ± 0,01
	45,0	15,26±0,15	2,49±0,01	36,32 ± 1,03	5,25 ± 0,001	3,72 ± 0,15
	47,0	15,74±0,12	2,61±0,01	36,35 ± 0,76	5,17 ± 1,0007	3,68 ± 0,12
	5,0	15,73±0,15	2,55±0,03	47,66 ± 1,21	5,28 ± 0,005	3,31 ± 0,15
	15,0	7,23±0,08	1,38±0,01	37,19 ± 0,52	4,48 ± 0,0008	3,98 ± 0,08
	21,0	11,08±0,11	1,96±0,03	36,51 ± 0,68	4,85 ± 0,003	3,78 ± 0,11
	23,0	12,45±0,11	2,04±0,01	39,72 ± 0,71	5,23 ± 0,002	3,88 ± 0,11
6	25,0	13,62±0,13	2,21±0,02	37,18 ± 0,75	5,28 ± 0,003	4,40 ± 0,13
	27,0	14,94±0,09	2,27±0,02	45,95 ± 0,92	5,64 ± 0,002	4,09 ± 0,09
	29,0	15,30±0,11	2,57±0,03	41,89 ± 0,65	5,11 ± 0,003	3,39 ± 0,11
	31,0	10,97±0,04	2,07±0,03	38,68 ± 0,51	4,56 ± 0,001	2,67 ± 0,04
	33,0	5,73±0,14	0,97±0,01	39,75 ± 0,90	5,05 ± 0,002	3,80 ± 0,14
	5,0	13,85±0,03	1,92±0,01	31,54 ± 0,39	6,19 ± 0,0002	6,30 ± 0,03
	15,0	21,44±0,05	3,52±0,01	37,16 ± 0,46	5,22 ± 0,0006	4,10 ± 0,05
	25,0	14,76±0,07	2,29±0,02	34,86 ± 0,61	5,53 ± 0,001	5,36 ± 0,07
	32,5	16,28±0,12	2,39±0,01	45,89 ± 0,87	5,84 ± 0,002	4,03 ± 0,12
	37,5	15,05±0,14	2,16±0,02	44,21 ± 1,10	5,97 ± 0,002	4,36 ± 0,14
7	42,5	15,41±0,10	2,34±0,02	52,00 ± 10,36	5,65 ± 0,002	4,23 ± 0,10
	47,5	14,42±0,08	2,37±0,02	34,24 ± 0,68	5,21 ± 0,002	4,66 ± 0,08
	51,0	18,29±0,17	2,90±0,01	44,32 ± 0,91	5,42 ± 0,003	3,50 ± 0,17
	53,0	17,75±0,03	2,80±0,01	42,37 ± 0,49	5,44 ± 0,0003	3,71 ± 0,03
	56,5	15,13±0,12	2,37±0,01	43,96 ± 0,93	5,47 ± 0,001	4,12 ± 0,12

Fonte: Autoria própria.

## APÊNDICE G – Distribuição das constantes de estabilidade condicional para as interações de Cu(II) com a EOMSeD

**Tabela 13** – Distribuição das constantes de estabilidade condicional para as interações de Cu(II) com a EOMSeD, utilizando o modelo de equilíbrio 1: 1 proposto por Ryan e Weber com as componentes 1 e 2 obtidos pelo PARAFAC.



Fonte: Autoria própria.

## ANEXO

Anexo A – Artigo publicado no periódico *Analytical Methods*.Analytical  
Methods

PAPER

View Article Online  
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/d0ay02008g

## Total phosphorus determination in eutrophic tropical river sediments by laser-induced breakdown spectroscopy techniques†

Carla Pereira de Moraes,<sup>a,c</sup> Gustavo Nicolodelli,<sup>b</sup> Milene Corso Mitsuyuki,<sup>c</sup> Kleydson Stênio Gaioso da Silva,<sup>c</sup> Frederico Fábio Mauad,<sup>d</sup> Stéphane Mounier<sup>b,e</sup> and Débora Marcondes Bastos Pereira Milori<sup>a,c</sup>

Total phosphorus (TP) in sediments is an important chemical variable in the study of the extent of eutrophication in water bodies. Two methods, based on single pulse (SP) and double pulse (DP) laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), were developed for determining TP in the sediment cores of Brazilian rivers upstream from the Barra Bonita reservoir. TP concentration in the sediments was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) on digested samples. Besides, a LIBS system operating in SP and DP modes was used to develop methods for TP quantification in sediment pellets. In LIBS, the most appropriate wavelength to measure P was 214.91 nm. The calibration curves showed correlation coefficients of 0.93 and 0.92 and limits of detection of 709 mg kg<sup>-1</sup> and 349 mg kg<sup>-1</sup> for SP and DP LIBS, respectively. The two proposed methods were validated and the average percentage errors were 14% and 10% for SP and DP LIBS, respectively. The ICP OES and SP and DP LIBS data showed that the most superficial layers of the Piracicaba River, all the sedimentary layers of the Tietê River, and the confluence region present a high concentration of TP, according to the Brazilian sediment quality criterion. In conclusion, SP and DP LIBS were confirmed as promising alternative tools to traditional analytical methods for monitoring the TP content in the sediments that come from different hydrographic units. The proposed method using DP LIBS proved more sensitive than SP LIBS, but the SP LIBS method demonstrated enough precision for determining TP in eutrophic river sediments.

Received 29th October 2020  
Accepted 13th November 2020  
DOI: 10.1039/d0ay02008g  
rsc.li/methods

### 1. Introduction

The origin of P in sediments can be natural, coming from outside the aquatic system (allochthonous) or from within the system (autochthonous), and anthropogenic.<sup>1</sup> Depending on the concentration, P can be harmful to the aquatic system, accelerating the eutrophication process of rivers.<sup>2,3</sup> The most severe environmental consequence is the decrease in dissolved oxygen in the water, causing the death of plant and animal species. Also, it changes the taste and smell of water.<sup>4</sup>

Total phosphorus (TP) is an important chemical variable in the study of sediment quality, as it enables the assessment of the nutrient load and the extent of the degree of eutrophication

of water bodies. Chemical analysis of sediment cores is used to evaluate the distribution of the elements in depth and correlate the profile obtained with the history of land use and occupation and, consequently, with potential anthropic contributions. These conditions are not always detectable using water variables. The official method for determining TP in sediments is the USEPA 6010C method.<sup>5</sup> This method uses inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) for determination and requires treatment of samples, such as wet decomposition using high volumes of oxidizing mixtures.<sup>4,6,7</sup> Thus, it generates considerable amounts of chemical residues, disagreeing with the principles of green chemistry.<sup>8</sup>

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is an alternative method to overcome the disadvantages associated with sample preparation, as it provides direct analysis, thus eliminating or reducing the use of chemical reagents. Besides, the LIBS technique has other advantages, such as relatively low analysis cost when compared to conventional analytical methods and fast real-time analysis. LIBS is an optical emission spectroscopy technique that uses laser-generated plasma to vaporize, atomize and excite analytes. When the excited species return to a lower energy state, they emit discrete emission lines

<sup>a</sup>São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil  
<sup>b</sup>Department of Physics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil  
<sup>c</sup>Embrapa Instrumentation, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: debora.milori@embrapa.br  
<sup>d</sup>São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil  
<sup>e</sup>University of Toulon, Aix Marseille University, CNRS/INSU, IRD, MED Mediterranean Institute of Oceanography, UM 110, CS 60584, Toulon, 83041 Cedex 9, France  
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ay02008g

## Anexo B – Artigo publicado no periódico *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 177 (2021) 106066



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sab](http://www.elsevier.com/locate/sab)



### Optimization of laser-induced breakdown spectroscopy parameters from the design of experiments for multi-element qualitative analysis in river sediment

Carla Pereira de Morais<sup>a,c,d</sup>, Gustavo Nicolodelli<sup>b</sup>, Milene Corso Mitsuyuki<sup>c</sup>, Stéphane Mounier<sup>d</sup>, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13566-590 São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Physics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Embrapa Instrumentation, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> University of Toulon, Aix Marseille University, CNRS/INSU, IRD, MIO UM 110, Mediterranean Institute of Oceanography, CS 60584, 83041 Toulon, Cedex 9, France

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

LIBS  
Design of experiments  
Central composite design  
Fractional factorial design  
Sediment

#### ABSTRACT

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is a fast, low analytical cost, environmentally clean technique that does not require the use of reagents for sample preparation. However, regardless of the LIBS setup, it has limitations in terms of sensitivity and precision, especially when applied to complex samples, such as river sediment. To overcome these limitations, in this work, different experimental parameters were optimized for multi-element analysis of a river sediment sample using design of experiments (DOE) approaches, i.e., fractional factorial and central composite designs (CCD). The findings demonstrated that DOE applied to the LIBS technique can be used as an efficient tool for optimizing the key parameters affecting sediment analysis by LIBS.

#### 1. Introduction

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) is a fast, low analytical cost, and environmentally clean technique, which does not require the use of reagents for sample preparation [1]. However, limitations of LIBS, compared to classical analytical techniques, are lower sensitivity and precision, due to matrix effects. The sensitivity of the single pulse (SP) LIBS system can be increased using different kinds of experimental setups, such as double pulse (DP) LIBS [2,3], resonance-enhanced LIBS [4,5], microwave-assisted LIBS [6], spark discharge LIBS [7,8], spatial confinement of laser-induced plasma [9], and the use of a micro-torch [10]. In addition to instrumental techniques to improve the sensitivity of LIBS, strategies involving sample pretreatment have been used, such as the deposition of nanoparticles onto samples [11] and the addition of a salt containing easily ionizable elements [12].

In LIBS, the measurement precision is affected by matrix effects [13], the intensity of the emitted nanosecond laser, and the nonlinear interaction between the nanosecond laser and the sample matrix [14]. One of the ways to overcome this limitation is to obtain tens or hundreds of spectra distributed in different regions of the sample, to decrease the matrix effects and increase precision [15]. Some parameters that affect

the plasma, such as accumulated pulses [16,17], the wavelength [18] and energy of the nanosecond lasers [19,13], and the temporal parameters (delay time and gate width) [20] play important roles in the optimization of the signal-to-noise (S/N) ratio, with their ideal values varying according to the sample composition. In DP LIBS, the inter-pulse delay is an important factor to consider for improving plasma emission [21].

Design of experiments (DOE), a methodology based on mathematical and statistical theory, is used to plan and conduct experiments by means of the analysis and interpretation of data obtained from the experiments. DOE allows input variables to be manipulated to investigate their effects on the measured response variable [22]. When there are many factors to be optimized, it is necessary to select the variables that have the greatest effects. Fractional factorial designs can be used to perform the screening of factors [23], but since they only allow fitting of first order models, another DOE is needed to detect curvature. A three-level design (3 k factorial design) is often performed to fit a second order model, but as the number of factors increases, it becomes inefficient and impractical, so a central composite design (CCD) may be used instead. CCD is a fraction of the 3 k factorial design, but it does not use unnecessary degrees of freedom (which increases the cost of the experiment) [24]. The

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [milene.corso@embrapa.br](mailto:milene.corso@embrapa.br) (M.C. Mitsuyuki), [stephane.mounier@univ-tln.fr](mailto:stephane.mounier@univ-tln.fr) (S. Mounier), [debora.milori@embrapa.br](mailto:debora.milori@embrapa.br) (D.M.B.P. Milori).

<https://doi.org/10.1016/j.sab.2021.106066>

Received 21 September 2020; Received in revised form 31 December 2020; Accepted 3 January 2021

Available online 5 January 2021

0584-8547/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo C – Artigo publicado no periódico *Applied Spectroscopy*.

Applied Geochemistry 131 (2021) 105049



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Geochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apgeochem](http://www.elsevier.com/locate/apgeochem)

## Assessing extracted organic matter quality from river sediments by elemental and molecular characterization: Application to the Tietê and Piracicaba Rivers (São Paulo, Brazil)

Carla Pereira de Morais <sup>a,b,c,\*</sup>, Amanda Maria Tadini <sup>c</sup>, Lucas Raimundo Bento <sup>a,c</sup>, Benjamin Oursel <sup>b</sup>, Francisco Eduardo Gontijo Guimaraes <sup>d</sup>, Ladislau Martin-Neto <sup>c</sup>, Stéphane Mounier <sup>b,\*\*</sup>, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori <sup>c,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup> São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup> University of Toulon, Aix Marseille University, CNRS/INSU, IRD, MIO UM 110, Mediterranean Institute of Oceanography, CS 60584 83041, Toulon CEDEX 9, France

<sup>c</sup> Embrapa Instrumentation, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

Editorial handling by Dr. Zhenqing Shi

## Keywords:

River sediments  
Extracted organic matter  
Fluorescence  
Parallel factor analysis

## ABSTRACT

Urban river pollution causes serious problems to the environment, human health, and water scarcity. Developing tools to identify and assess the health of aquatic river systems is essential for monitoring the quality of rivers and implementing actions. This study assesses the elemental and molecular characteristics of organic matter (OM) extracted from river sediments and associates them with river quality. To assess the quality of sediment cores, the most reactive and available OM from two urban rivers (Tietê and Piracicaba Rivers, São Paulo, Brazil) was isolated with alkaline and water solutions. It was then characterized by elemental composition, ultraviolet-visible spectroscopy, and fluorescence excitation-emission matrix with parallel factor analysis. The average yield of alkaline extraction was  $40.71\% \pm 5.52\%$  of OM present in the bulk sediments. Extracted organic matter from sediments (EOM<sub>Sed</sub>) from the Tietê River presented the highest average concentrations of non-purgeable organic carbon (NPOC) and total organic nitrogen (TON), and the lowest average NPOC/TON molar ratios and specific UV absorbance at 254 nm (SUVA<sub>254</sub>). Considering the high degree of eutrophication in the Tietê River, these results suggest a greater input of simple OM with nitrogenous structures. The humic-like component in EOM<sub>Sed</sub> was the most abundant in both rivers. The aromaticity of EOM<sub>Sed</sub> from the Piracicaba River was evidenced by the greater contribution of complex structures in the form of aromatic and polyaromatic moieties and higher SUVA<sub>254</sub>. EOM<sub>Sed</sub> from the Tietê River also featured enhanced biological activity due to the greater contribution of microbial-derived products and the presence of small molecules and nitrogenous structures. As this combination of elemental and spectroscopic techniques successfully identified the characteristics of extracted OM, it can be used as a tool to assess the global river quality.

## 1. Introduction

Sediments consist of particle accumulation with different physical and chemical properties that are composed of inorganic and organic material. The particles are transported by water, air, erosion, and weathering processes and distributed along rivers (Murdoch and MacKnight, 1991; Schorer and Eisele, 1997). The sediments are

biogeochemically active due to the presence of many microbes and the continuous input of organic and inorganic substances (He et al., 2019; Kumwimba et al., 2017).

Organic matter (OM) in the sediments can originate from external sources (allochthonous) or from the aquatic ecosystem itself (autochthonous) (Brailsford et al., 2019; Kindler et al., 2011). Moreover, rivers are responsible for transferring carbon (C) between the terrestrial

\* Corresponding author. São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13566-590, São Carlos, SP, Brazil.

\*\* Corresponding author.

\*\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [carla.morais@usp.br](mailto:carla.morais@usp.br) (C.P. de Morais), [stephane.mounier@univ-tln.fr](mailto:stephane.mounier@univ-tln.fr) (S. Mounier), [debora.milori@embrapa.br](mailto:debora.milori@embrapa.br) (D.M.B.P. Milori).

<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.105049>

Received 15 April 2021; Received in revised form 6 July 2021; Accepted 10 July 2021

Available online 14 July 2021

0883-2927/© 2021 Published by Elsevier Ltd.