



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOLOGIA E GEOQUÍMICA**

---

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 616**

**ESTERÓIS COMO MARCADORES GEOQUÍMICOS DA  
ORIGEM DA MATÉRIA ORGÂNICA EM SEDIMENTOS DO  
RIO AURÁ (REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM-PA)**

**Dissertação apresentada por:**

**JORGE HERNANDO AGUDELO MORALES**

**Orientador: Prof. Dr. José Augusto Martins Corrêa (UFPA)**

---

**BELÉM – PARÁ  
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- A282e Agudelo Morales, Jorge Hernando.  
Esteróis como marcadores geoquímicos da origem da matéria orgânica em sedimentos do rio Aurá (Região Metropolitana de Belém-PA) / Jorge Hernando Agudelo Morales. — 2022.  
70 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. José Augusto Martins Corrêa  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Geociências, Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica, Belém, 2022.
1. Sedimentos (Geologia) . 2. Marcadores orgânicos. I.  
Título.

CDD 551.9

---



**Universidade Federal do Pará**  
**Instituto de Geociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica**

# **ESTERÓIS COMO MARCADORES GEOQUÍMICOS DA ORIGEM DA MATÉRIA ORGÂNICA EM SEDIMENTOS DO RIO AURÁ (REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM-PA)**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA POR**

**JORGE HERNANDO AGUDELO MORALES**

**Como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de  
GEOLOGIA E GEOQUÍMICA, linha de pesquisa de MINERALOGIA E  
GEOQUÍMICA.**

**Data de Aprovação:** 06 / 06 / 2022

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. José Augusto Martins Corrêa**  
**(Orientador – UFPA)**

**Prof.ª Dr.ª Silvia Keiko Kawakami**  
**(Membro - UFPA)**

**Prof. Dr. Vinicius Tavares Kütter**  
**(Membro - UFPA)**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida e seu amor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Aos meus pais e irmãos Omar e José por seu amor e apoio incondicional, agradeço a minha tia Omaira e Miguel por todo seu apoio e carinho.

Ao Prof. José Augusto Martins Corrêa por ser o meu orientador, pelo apoio oferecido e por me dar a oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado no melhor programa de pós-graduação.

À minha prezada amiga Camila Rodrigues, muito obrigado por ter me dado sua amizade, apreço, paciência, tempo, o melhor dos exemplos, pelo apoio a cada momento, conhecimento passado, orientações e dicas. É muito bom ter conhecido uma pessoa e profissional como você.

À Senhora Amélia obrigado por cuidar de mim e por me dar sua ajuda incondicional. Eu tenho um grande apreço pela Senhora.

Aos professores do PPGG que desde o primeiro dia me receberam com amabilidade e carinho, obrigado pelas aulas, dicas e todo o conhecimento que me passaram. Eu admiro muito vocês.

Às prezadas Cleida e Joanicy por ter me recebido desde o primeiro dia com muito carinho, pelo seu excelente trabalho e apoio.

Ao melhor país do mundo por ter me permitido experimentar as melhores vivências da minha vida. Amo tua cultura, gastronomia, idioma, tuas paisagens e tua gente, obrigado Brasil.

À Angela Cely, a mulher que me acompanhou esses anos, pela paciência, carinho e apoio, acompanhamento nas análises. Ao Sebastian Anaya, Sergio Diaz e Cristian Torres por me apoiar espiritualmente e no crescimento pessoal, obrigado por seus conselhos e carinho incondicional.

"Christo nihil praeponere - a nada dar mais valor que a Cristo"

## RESUMO

O rio Aurá, localizado no nordeste da Amazônia brasileira, vem recebendo há muitos anos aportes de matéria orgânica (MO) antropogênica relacionada à efluentes domésticos de comunidades ribeirinhas e do Aterro Sanitário do Aurá. Neste trabalho, determinamos a ocorrência, as fontes e a distribuição de sete esteróis em sedimentos superficiais do rio Aurá para avaliar a contaminação orgânica neste corpo hídrico. A cromatografia gasosa-acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) foi empregada para determinar os esteróis: coprostanol, colestanol, colesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmastanol. Os analitos de interesse identificados e as razões diagnósticas indicaram que os sedimentos do rio estudado apresentam compostos orgânicos provenientes de fontes tanto antropogênicas (esgotos domésticos e MO do aterro sanitário) quanto biogênicas autóctones (plantas superiores terrestres). A Análise de Componentes Principais (PCA) corrobora com esse resultado e possibilitou o agrupamento dos pontos de amostragem segundo essas fontes. A estação 1 (ponto mais próximo do aterro Aurá) apresentou o maior nível de contaminação observado e o coprostanol foi detectado em maior concentração  $219,8 \text{ ng g}^{-1}$  nesse local, o que indica contaminação fecal humana moderada. Este trabalho demonstrou que a poluição por esgoto doméstico e insumos de MO do aterro do Aurá podem ser ameaças potenciais ao ecossistema e à saúde humana da região estudada

Palavras-chave: Esteróis; Sedimentos superficiais; Poluição orgânica, Esgoto doméstico; Sistemas aquáticos amazônicos.

## ABSTRACT

The Aurá River located in Northern Brazil, Brazilian Amazon, has been experiencing anthropogenic input from riverine communities and the Aurá landfill for many years. In this work, we assess the occurrence, sources, and distribution of six sterol markers in surface sediments of Aurá River to evaluate organic inputs in this water body. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) was used to determine sterol compounds. The sterol markers identified, diagnostic ratios, and statistical analysis showed that Aurá River sediments presented two primary sterol sources: anthropogenic (domestic sewage and inputs from Aurá landfill) and natural sources (terrestrial higher plants). Station 1 (the closest site to the Aurá landfill) presented the highest level of contamination. Coprostanol concentrations at this station was 219.8 ng g<sup>-1</sup>. This coprostanol range indicates moderate human fecal contamination. This work demonstrated that domestic sewage pollution from riverine communities and organic matter inputs from Aurá landfill might be assumed as potential threats to environmental and human health.

Keywords: Sterols; Surface sediments; Organic pollution; Domestic sewage; Amazonic aquatic systems.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura geral dos esteroides. Fonte: Modificado de Morrison & Boyd (1995). ....	6
<b>Figura 2</b> - Processos de transformação do colesterol em coprostanol e colesterol. Fonte: Adaptado de Grimalt <i>et al.</i> (1990). ....	9
<b>Figura 3</b> - Máxima concentração de coprostanol ( $\text{ng g}^{-1}$ ) observadas em sedimentos de diferentes corpos hídricos no Brasil. ....	11
<b>Figura 4</b> - Ilustração genérica dos constituintes de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. Fonte: Modificado de Stauffer (2013). ....	15
<b>Figura 5</b> - Esquema genérico da Espectrometria de massas. Fonte: Modificado de Skoog <i>et al.</i> (2008). ....	15
<b>Figura 6</b> – Área de estudo e os pontos de coleta. ....	19
<b>Figura 7</b> - Equipamentos usados na amostragem: a) Recipientes metálicos e b) Draga Van Veen. ....	19
<b>Figura 8</b> - Cromatógrafo gasoso GCMS-TQ8040 – Shimadzu empregado na análise dos esteróis. ....	21



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Nomenclatura, estrutura e fórmula molecular dos esteróis avaliados no presente estudo.....	6
<b>Tabela 2</b> - Razões diagnósticas de esteróis e seus respectivos indicativos. ....	10
<b>Tabela 3</b> - Classificação do método da cromatografia gasosa baseado no tipo de fase estacionaria. ....	14
<b>Tabela 4</b> - Reagentes de derivatização convencionais usados no método de sililação.....	16
<b>Tabela 5</b> - Georreferenciamento dos pontos de amostragem. ....	20

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
EPIGRAFE .....	v
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. GERAL .....	4
2.2. ESPECÍFICOS .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1. BIOMARCADORES GEOQUÍMICOS .....	5
3.2. ESTEROIS EM SEDIMENTOS .....	5
3.3. PANORAMA DO USO DE ESTERÓIS COMO MARCADORES DA ORIGEM DA MATÉRIA ORGÂNICA E CONTAMINAÇÃO FECAL NO BRASIL .....	10
3.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	13
3.4.1. Esteróis X Cromatografia Gasosa.....	16
3.5. ÁREA DE ESTUDO .....	16
3.5.1. Rio Aurá .....	16
3.5.2. Geologia .....	17
3.5.3. Clima .....	17
3.5.4. Vegetação .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1. AMOSTRAGEM E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	19
4.2. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA E DE MATÉRIA ORGÂNICA .....	20

4.3. ANÁLISE DOS ESTERÓIS .....	20
4.3.1. Extração, Derivatização e Padrão Interno .....	20
4.3.2. Identificação e Quantificação .....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	23
6. CONCLUSÃO .....	34
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO A .....	46
ANEXO B .....	47
ANEXO C .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição orgânica das bacias hidrográficas, produto da descarga de águas residuais municipais e drenagem urbana, afeta negativamente a saúde humana e dos ecossistemas (Liyanage & Yamada, 2017; Wen *et al.* 2020). Como resultado do crescimento populacional global, mais águas residuais são geradas e, portanto, um maior impacto sobre o meio ambiente tem sido observado (Reichwaldt *et al.* 2017).

O Brasil possui cerca de 12% das reservas de água doce superficial do mundo, e em torno de 78% dos recursos hídricos nacionais se encontram na Amazônia (Gomes & Barbieri, 2004). O estado de Pará está inserido na bacia hidrográfica Tocantins Araguaia sendo circundado pela bacia hidrográfica amazônica e do Atlântico Nordeste Ocidental. No entanto, apesar de sua localização privilegiada, o abastecimento de água potável é um sério problema na região, dada falta de investimento em saneamento público e ao rápido crescimento da maioria das cidades da região (de Oliveira *et al.* 2013). Na região Norte do Brasil, 70% da população carece do acesso a água tratada, e no Pará 40% dos municípios distribuem água sem tratamento adequado sendo até pouco tempo o estado que apresentou maior demanda desse tipo de investimento (Pereira *et al.* 2018).

Os esteróis, subgrupo dos esteroides, são marcadores orgânicos usados para inferir a presença de matéria orgânica (MO) antropogênica nos sedimentos, isso porque: (1) são relativamente resistentes à degradação microbiana; (2) podem ser quantificados mesmo em baixos níveis; e (3) são relativamente fáceis de se rastrear e quantificar (Martins *et al.* 2010). Esses marcadores químicos são os mais utilizados em estudos que investigam insumos de esgoto devido à sua especificidade com material fecal de origem humana (Carreira *et al.* 2015; Frena *et al.* 2016a; Martins *et al.* 2010). Além disso, eles têm sido usados para identificar a poluição fecal lixiviada de aterros sanitários (Zhang *et al.* 2008).

Os esteróis têm propriedades hidrofóbicas e são facilmente aderidos às partículas, o que favorece o seu posterior acúmulo nos sedimentos (Wen *et al.* 2020). Os compostos de esteróis fornecem evidências mais consistentes da fonte e gravidade da poluição do esgoto quando comparados aos métodos tradicionais que usam microrganismos como a bactéria gram negativa *Escherichia coli* e marcadores moleculares (a exemplo do DNA) (Thomes *et al.* 2019; Wen *et al.* 2020).

O coprostanol, esteroide sintetizado no trato digestivo de humanos e vertebrados superiores através da hidrogenação do colesterol, é o mais abundante em fezes humanas (Leeming *et al.* 1996). Assim, o mesmo tem sido utilizado para rastrear o *input* de material fecal antropogênico em ecossistemas aquáticos (Carreira *et al.* 2015). Investigações de contaminação por esgoto em sedimentos comparando esteróides fecais e contagens de coliformes mostram que o coprostanol é o melhor indicador (Lima Da Costa & Carreira, 2005). No entanto, razões diagnósticas como coprostanol/(coprostanol + colestano) e coprostanol/colesterol têm sido utilizadas de forma conjunta para melhorar a confiabilidade da avaliação da poluição causada por esgoto doméstico permitindo confirmar a poluição fecal e distinguir entre fontes humanas e naturais (Carreira *et al.* 2015; He *et al.* 2018).

O rio Aurá, localizado a sudeste da cidade de Belém, é o terceiro maior em extensão da Região Metropolitana de Belém (RMB) sendo relevante para a capital do Pará por influenciar diretamente no corpo hídrico de captação de água para abastecimento urbano (Siqueira & Aprile, 2013). O rio Aurá drena área próxima ao Aterro Sanitário do Aurá, atualmente desativado, e estudos apontam que esse corpo d'água tem recebido contaminação antropogênica aportada pela lixiviação do solo desse aterro (Sousa *et al.* 2020; Santos de Sousa *et al.* 2014; Siqueira *et al.* 2016). Além da contaminação proveniente de inúmeros esgotos irregulares da comunidade ribeirinha local (de Oliveira *et al.* 2013; Siqueira & Aprile, 2013).

A poluição desse rio e de outros na região amazônica se deve primariamente à falta de um programa de saneamento adequado e eficiente (Siqueira & Aprile, 2013; Steinbrenner *et al.* 2020). Principalmente durante o período chuvoso, diversos contaminantes são carreados do aterro e de seu entorno para o interior do rio Aurá que tem sua foz a 200 metros do ponto de captação de água da Companhia de Saneamento do Pará (COSANPA), no rio Guamá, colocando em risco à saúde humana (Santos de Sousa *et al.* 2014; Siqueira *et al.* 2016).

Vários estudos na bacia do rio Aurá foram realizados na última década, dentre eles destacam-se: a avaliação dos riscos ambientais devido à contaminação por metais e MO em sedimentos (Siqueira & Aprile, 2013); a avaliação da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e sua variação espacial nos sedimentos superficiais (Carneiro *et al.* 2016; Siqueira & Aprile, 2013); e a distribuição, variação sazonal e determinação de fontes de HPA em material particulado em suspensão coletados no rio. Porém, ainda não existem pesquisas com foco no aporte de MO relacionada à esgotos domésticos e material fecal no Rio Aurá.

Levando em consideração que a cidade de Belém e a RMB não apresentam sistema de tratamento de esgoto adequado e eficiente, e que a população ribeirinha que habita as margens do rio Aurá ainda dispõe de estrutura sanitária precária, o desenvolvimento de pesquisas que visem o monitoramento da saúde desse corpo aquático é de extrema importância. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar a contaminação orgânica nos sedimentos superficiais do rio Aurá através do uso marcadores geoquímicos de matéria fecal humana (esteróis) a fim de monitorar o aporte de efluentes domésticos e compostos lixiviados do Aterro Sanitário do Aurá.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a contaminação orgânica antropogênica, através de marcadores orgânicos geoquímicos (esteróis), nos sedimentos superficiais do Rio Aurá (Região Metropolitana de Belém-PA-Brasil).

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar quali e quantitativamente os esteróis nos sedimentos do rio Aurá;
- Identificar, por meio de razões diagnósticas e análises estatísticas, potenciais fontes de esteróis para o rio Aurá;
- Avaliar a existência de uma correlação entre os esteróis e a granulometria e o percentual de matéria orgânica presente nos sedimentos;
- Identificar, ao longo do rio Aurá, as regiões com maior propensão à contaminação por compostos orgânicos antropogênicos;
- Comparar os resultados obtidos com os de outros rios na região amazônica, no Brasil e no mundo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. BIOMARCADORES GEOQUÍMICOS

No estudo da geoquímica de corpos aquáticos são usadas diferentes classes de compostos na avaliação da matéria orgânica em corpos aquáticos. Além de compostos empregados como indicadores são também utilizados: razões elementares, composição isotópica e marcadores geoquímicos (da Silva Carreira *et al.* 2017).

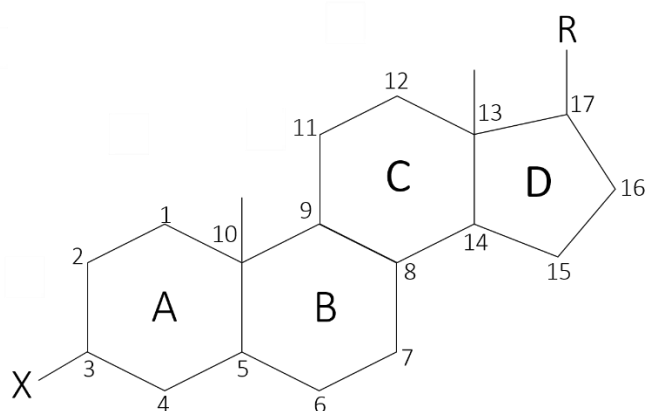
Os marcadores geoquímicos também denominados biomarcadores são compostos usados como marcadores da origem genética da matéria orgânica lipídica ou betuminosa (Simoneit, 2004). Eles são caracterizados por uma estrutura química ou nível de transformação diagenética que pode ser relacionada a uma origem específica. Essas características permitem distinguir aportes autóctones e alóctones, e possibilitam entender a modificação e a acumulação de MO em ambientes aquáticos, por isso são uma ferramenta muito útil (Carreira *et al.* 2017).

Microorganismos e compostos químicos como lipídios são exemplos de biomarcadores amplamente aplicados para distinguir fontes de poluição fecal em corpos aquáticos (Leeming *et al.* 1996). Os lipídios são compostos orgânicos hidrofóbicos e lipofílicos que, após serem introduzidos em um sistema aquático tendem a se associar ao material particulado e, posteriormente, se depositar no sedimento (Frena *et al.* 2016b; Leeming *et al.* 1996). O emprego de lipídios como biomarcadores de contaminação fecal antropogênica apresenta vantagens em relação ao uso de microrganismos, uma vez que os microrganismos são facilmente biodegradados, além de possibilitarem a distinção entre as variadas origens de contaminação (Adnan *et al.* 2012).

#### 3.2. ESTEROIS EM SEDIMENTOS

Os lipídios abrangem um amplo grupo de compostos orgânicos úteis como biomarcadores. Os n-alcanos, ácidos graxos e esteroides são exemplos de lipídios usados como marcadores de origem da MO sedimentar (Derrien *et al.* 2017). Os esteroides possuem em sua estrutura um sistema de anéis apolar conhecido como ciclopentanofenantreno (Figura 1). Esse sistema é composto por quatro anéis interligados, onde três dos anéis contêm seis átomos de carbono cada um e o quarto anel apresenta cinco (Qingtao Huang *et al.* 2017).





**Figura 1** - Estrutura geral dos esteroides. Fonte: Modificado de Morrison & Boyd (1995).

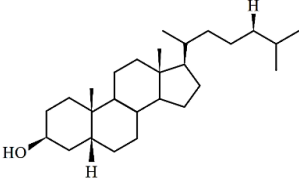
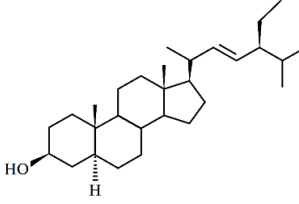
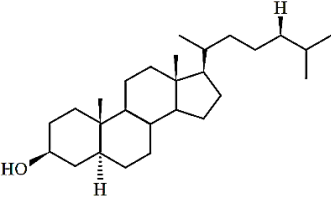
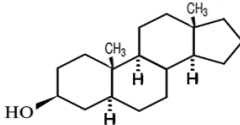
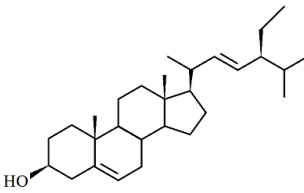
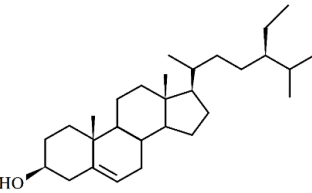
A variação na estrutura dos esteroides ocorre mediante a adição de grupos funcionais possibilitando a formação de inúmeros compostos químicos. A estrutura básica dos esteroides pode exibir as seguintes modificações: grupos metílicos angulares nos carbonos 10 e 13; instaurações nos anéis; a variação do radical no carbono 17 por diferentes grupamentos químicos; e a presença do grupo hidroxila (-OH) ou cetônico (=O) (Lehninger, 1970; Morrison & Boyd, 1995).

Os esteróis constituem uma classe de esteroides que apresentam em sua estrutura o grupo hidroxila ligado ao carbono 3, porção polar desses compostos (Lehninger, 1970; Morrison & Boyd, 1995). Entretanto, a estrutura química dos esteróis pode variar segundo a saturação do composto e as modificações do radical no carbono 17. Assim, os esteróis saturados e insaturados são chamados de estanois e estenóis, respetivamente (Stefens, 2006). Na Tabela 1 são apresentadas a nomenclatura comum e oficial segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), estrutura molecular e fórmula molecular dos esteróis investigados neste estudo.

**Tabela 1** - Nomenclatura, estrutura e fórmula molecular dos esteróis avaliados no presente estudo.

Nomenclatura Comum	Nomenclatura IUPAC	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular
Colesterol	3 $\beta$ -cholest-5-en-3-ol		C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O

---

Coprostanol	$3\beta,5\beta$ cholestan-3-ol		$C_{27}H_{48}O$
Estigmastanol	$3\beta,5\alpha$ -stigmastan-3-ol		$C_{29}H_{52}O$
Colestanol	$3\beta,5\alpha$ -cholestan-3-ol		$C_{27}H_{48}O$
Androstanol	$5\alpha$ androstan-3 $\beta$ -ol		$C_{19}H_{32}O$
Estigmasterol	(3 $\beta,22E$ )-stigmasta-5,22-dien-3-ol		$C_{29}H_{48}O$
$\beta$ -sitosterol	$3\beta$ -stigmast-5-en-3-ol		$C_{29}H_{50}O$

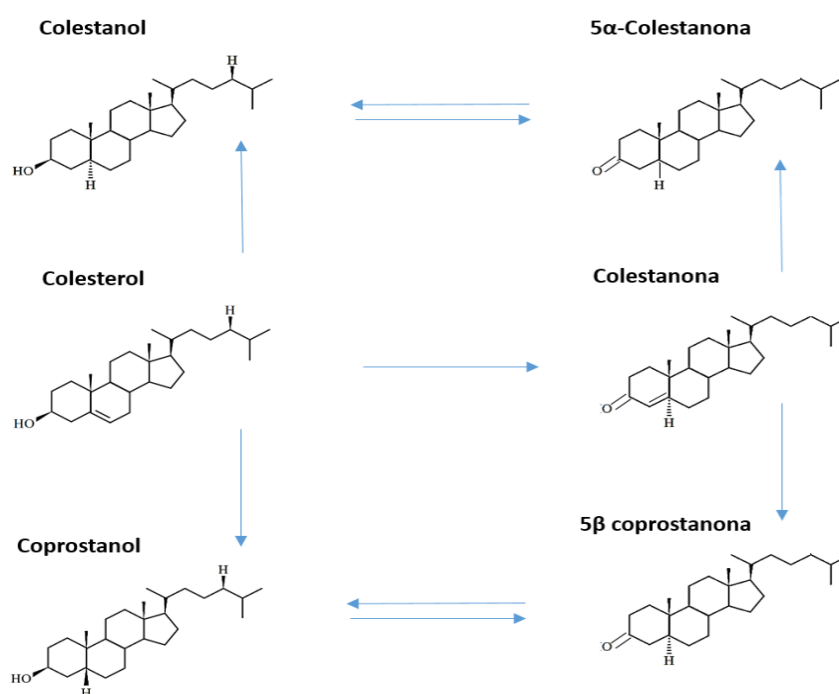
---

Fonte: ("PubChem," n.d.)

Uma vez que os esteróis são compostos presentes nas células eucariotas, os mesmos podem ser originados de animais, de plantas e de fungos, e são denominados zoosteróis, fitoesteróis e micosteróis, respectivamente (Gordon, 2003; Wen *et al.* 2020). Com base na ampla variedade de suas estruturas particulares, os esteróis fornecem informações úteis para a especificação da fonte de compostos orgânicos nos corpos aquáticos (Volkman, 2006; Wen *et al.* 2020).

O colesterol ( $5\beta$ -colestano- $3\beta$ -ol) é o esterol mais abundante no ambiente. Ele está presente em todos os organismos vivos, razão pela qual é relacionado a um amplo número de fontes animais e vegetais tais como mamíferos e plantas terrestres (Mudge & Norris, 1997; Reeves & Patton, 2001; Seguel *et al.* 2001; Thomes *et al.* 2019). Além disso, o colesterol pode ter origem antropogênica associado ao descarte inadequado de esgoto e de insumos agrícolas no ecossistema aquático (Thomes *et al.* 2019).

Nas plantas, os fitoesteróis mais representativos são: o  $\beta$ -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (Gordon, 2003; Gylling *et al.* 2014). Os estanois pertencentes às plantas como, por exemplo, o campestanol e o estigmastanol são  $5\alpha$ -saturados derivados dos esteróis das plantas por hidrogenação (Gylling *et al.* 2014). No entanto, os estanois também são formados por processos como a biohidrogenação por ação dos microrganismos, processo que permite a formação de coprostanol a partir de colesterol (Lim *et al.* 2017). A Figura 2 apresenta as vias de transformação do colesterol em coprostanol e colestanol, assim como as estanonas envolvidas nesse processo.



**Figura 2** - Processos de transformação do colesterol em coprostanol e colestanona. Fonte: Adaptado de Grimalt et al. (1990).

Na avaliação da poluição fecal de origem antropogênica em corpos hídricos é empregado um grupo de marcadores orgânicos denominados esteróis fecais (Adnan *et al.* 2012; Froehner *et al.* 2009; Sojinu *et al.* 2012). Os esteróis são compostos interessantes nesse tipo de estudo por persistirem em sedimentos quando há entrada de matéria fecal humana nos sistemas aquáticos (Adnan *et al.* 2012). Eles representam uma ferramenta útil uma vez que são pouco solúveis, quimicamente estáveis, permitem ser quantificados em pequenas quantidades e possibilitam identificar com precisão as fontes de contaminação fecal, tanto antigas quanto recentes, em sedimentos de corpos aquáticos (Canuel, 2001; de Abreu-Mota *et al.* 2014; Lim *et al.* 2017; Volkman, 1986; Wen *et al.* 2020).

O coprostanol é o esterol mais representativo na avaliação de poluição fecal de origem antrópica, ele constitui de 40 a 60% do total dos esteróis presentes em excrementos humanos (Frena *et al.* 2019; Leeming *et al.* 1996; Martins *et al.* 2008). Porém, levando em consideração que o coprostanol é também produzido por outros animais superiores, faz-se necessário o uso conjunto de razões diagnósticas envolvendo outros esteróis (Tabela 2) para uma caracterização mais apropriada (Adnan *et al.* 2012; Lim *et al.* 2017).

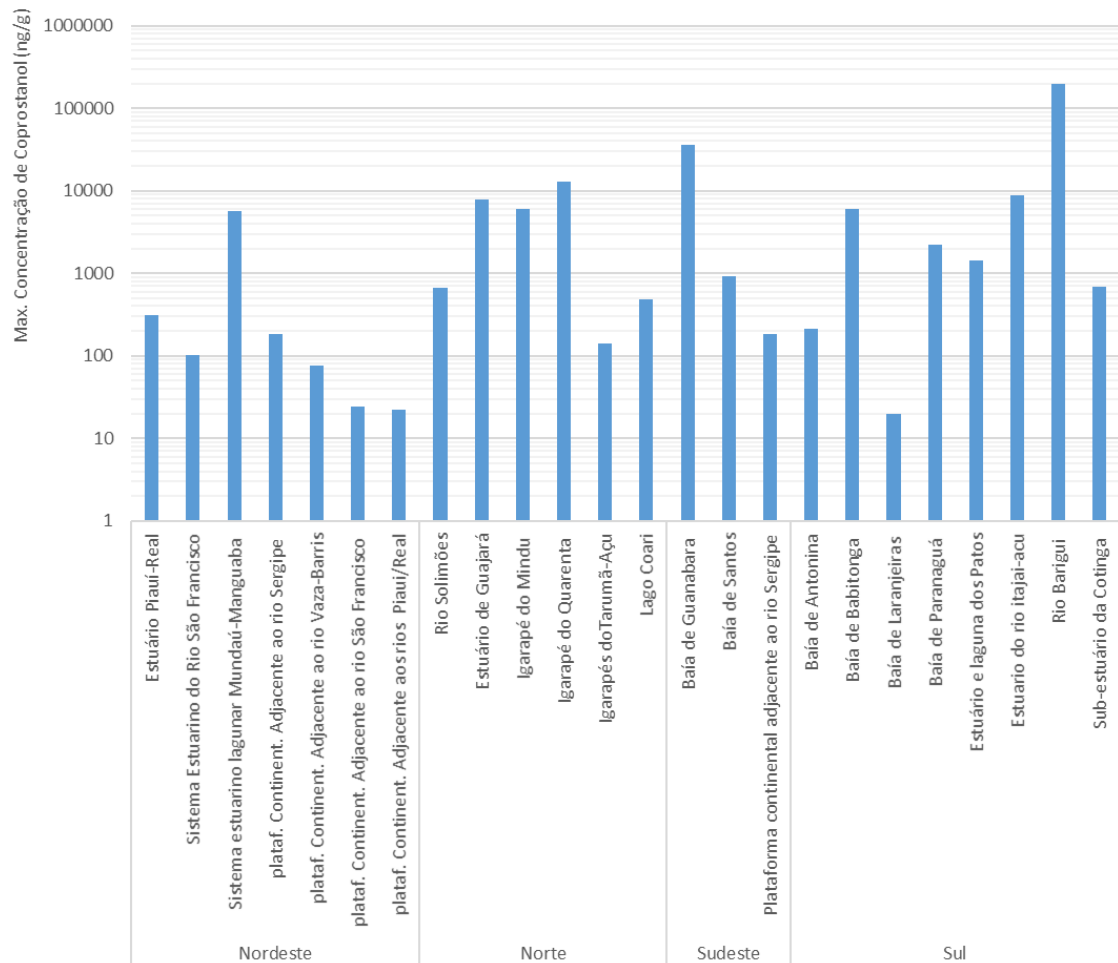
**Tabela 2 - Razões diagnósticas de esteróis e seus respectivos indicativos.**

Nome	Razões diagnósticas	Valores	Indicativo	Referência
<b>R1</b>	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Coprostanol} + \text{Colestanol}}$	< 0,3	Não apresenta contaminação fecal	(Grimalt <i>et al.</i> 1990)
		0,3 - 0,7	Contaminação Fecal moderada	
		> 0,7	Contaminação fecal humana	
<b>R2</b>	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Colesterol}}$	$\leq 0,5$	Fontes biogênicas	Grimalt <i>et al.</i> (1990)
		$> 0,5$ e $\leq 1,0$	Contaminação fecal humana	Leeming <i>et al.</i> (1996)
		> 1,0	Forte contaminação por esgoto	Takada <i>et al.</i> (2004)
				Fattore <i>et al.</i> (1996)
<b>R3</b>	$\frac{\text{Coprostanol}}{\Sigma \text{esteróis}} \times 100\%$ ou (%Coprostanol)	5-6%	Contaminação fecal humana	(Isobe <i>et al.</i> 2002)
		< 2%	Não há Contaminação fecal humana	
<b>R4</b>	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Cholestanol}}$	> 0,5	Contaminação fecal humana	Leeming <i>et al.</i> (1996) Shah <i>et al.</i> 2007)
<b>R5</b>	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Colestanol} + \text{Colesterol}}$	> 0,06	Contaminação fecal humana	(Writer <i>et al.</i> 1995)
<b>R6</b>	$\frac{\text{Colestanol}}{\text{Colesterol}}$	< 0,5	Aporte de matéria orgânica recente	Chaloux <i>et al.</i> (1995)
		> 0,5	Redução <i>in situ</i> do Colesterol	

### 3.3. PANORAMA DO USO DE ESTERÓIS COMO MARCADORES DA ORIGEM DA MATÉRIA ORGÂNICA E CONTAMINAÇÃO FECAL NO BRASIL

No Brasil, os esteróis têm sido utilizados como traçadores de poluição de origem antropogênica em sedimentos de diferentes corpos hídricos. A maior parte destes estudos encontra-se focada em ecossistemas aquáticos costeiros (Araujo *et al.* 2011; Carreira *et al.* 2015; Cabral *et al.* 2019; Muniz *et al.* 2006; Cordeiro *et al.* 2008; de Abreu-Mota *et al.* 2014; Fernandez *et al.* 2015; Bataglione *et al.* 2016; dos Reis Souza *et al.* 2020; Frena *et al.* 2019; M. Frena *et al.* 2016b, 2016a; Morgana. Frena *et al.* 2016; Santos *et al.* 2008; Martins *et al.* 2012, 2008, 2007, 2014). Existem também alguns estudos avaliando esteróis nos sedimentos de lagos

(Moreno, 2013), rios e igarapés (Froehner *et al.* 2008; Moreno, 2013; Melo *et al.* 2019). Os níveis máximos de coprostanol reportados nesses estudos são exibidos na Figura 3.



**Figura 3** - Máxima concentração de coprostanol ( $\text{ng g}^{-1}$ ) observadas em sedimentos de diferentes corpos hídricos no Brasil.

Dentre as áreas estudadas, o rio Barigui, localizado na região metropolitana de Curitiba, avaliado por Froehner *et al.* (2008) apresentou a maior concentração de coprostanol ( $196.000 \text{ ng g}^{-1}$ ). O resultado desse estudo indicou que grande aporte de contaminantes provenientes do descarte inadequado de efluentes domésticos e do tratamento de esgoto ineficiente. O rio Barigui é um rio de pequena extensão (67 km), um dos motivos pelos quais apresenta pouca diluição do efluente de esgoto. A baía de Guanabara é a segunda maior baía do litoral do Brasil e o segundo corpo hídrico brasileiro com maior concentração de coprostanol ( $36.240 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Santos *et al.*, 2008). Os autores dessa pesquisa sugeriram que na avaliação da contaminação derivada de esgoto nesse corpo hídrico, o uso de esteróis deve ser levado em consideração junto à dinâmica do sistema, bem como os processos pré e pós-

deposicionais. Os igarapés do Quarenta e do Mindu, e o estuário de Guajará apresentam concentrações de coprostanol equivalentes a 25.431, 12.428 e 7.930 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, mostrando que os mesmos têm sido mais afetados do que alguns corpos hídricos da região sul (Figura 3). Os corpos hídricos pertencentes à Região Norte do Brasil e que fazem parte da Amazônia legal brasileira expõem valores superiores a 100 ng g<sup>-1</sup> de coprostanol. Todos os ecossistemas dessa região, com exceção do rio Coari, apresentaram concentrações superiores a 500 ng g<sup>-1</sup> do esterol fecal indicando que a poluição antrópica por esgoto é ainda mais evidente nos corpos aquosos localizados nas cidades com maior índice populacional.

A Região Amazônica Brasileira abrange os Estados do Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso, e caracteriza-se por possuir em torno de 78% dos recursos hídricos nacionais (IBGE, 2020; Gomes & Barbieri, 2004). Porém, poucos estudos publicados envolvendo esteróis como marcadores moleculares na avaliação de esgoto doméstico nos corpos hídricos desta região são encontrados na literatura. Os estudos de Gomes et al. (2015) e Melo et al. (2019) abordaram diretamente os esteróis como marcadores moleculares em sistemas aquáticos amazônicos no Brasil. Esses estudos tiveram como área de estudo corpos hídricos próximos a Manaus e Belém, as capitais mais populosas da Amazônia brasileira com uma população de 2.219.580 e 1.499.641 de habitantes, respectivamente (IBGE, 2020). Além disso, a localização desses corpos hídricos é caracterizada por típica e intensas precipitação pluviométrica e hidrodinâmica fluvial do rio Amazonas, que tem efeitos na depuração e diluição de compostos presentes no esgoto.

Gomes et al. (2015) avaliaram a contaminação de esgoto em sedimentos superficiais da baía de Guajará, localizado no estado do Pará, região norte do Brasil, na foz do delta do Amazonas, através de dez marcadores de esteróis (Coprostanol, Epicoprostanol, Coprostanona, Colestanona, Colesterol, Colestanol, Brassicasterol, Estigmasterol,  $\beta$ -Sitosterol,  $\beta$ -Sitostanol). Os esteróis foram analisados por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) e as fontes de esteróis estimadas através de razões diagnósticas. As concentrações de coprostanol variaram de 60 a 7.930 ng g<sup>-1</sup>, níveis semelhantes aos observados na baía de Santos, São Paulo (Figura 3). Além disso, o coprostanol, o colesterol e a coprostanona foram detectados em todas as amostras de sedimento.

Melo et al. (2019) avaliou os níveis de contaminação de esgoto em sedimentos de três riachos (Mindu, Quarenta e Tarumã-Açu) que cruzam a cidade de Manaus-AM. O método analítico empregado foi a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

(CL/MS) e razões diagnósticas foram usadas para corroborar nas interpretações juntamente com as concentrações absolutas de esteróis obtidas e os percentuais relativos de coprostanol. Nesse estudo, ficou claro que os riachos Mindu e Quarenta são fortemente impactados por efluentes domésticos, as concentrações de coprostanol nesses corpos aquáticos variaram de 523 a 6.113 ng g<sup>-1</sup> e de 509 a 12.830 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os níveis de coprostanol presentes nesses três corpos hídricos estão associados à alta densidade populacional e precário sistema de tratamento de esgoto, levando em consideração que Manaus é a capital mais populosa da região norte do Brasil e, no entanto, apenas o 23,8% do esgoto é tratado (IBGE, 2012; Silva et al, 2018).

#### 3.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação de compostos de uma amostra complexa, onde os compostos volatilizados na entrada aquecida ou injetor de um cromatógrafo de gás serão posteriormente separados em consequência da migração diferencial dos componentes da amostra devido às interações entre uma fase gasosa móvel e uma fase estacionária líquida ou sólida (Polo, 2015; Sparkman *et al.* 2011; Wang & Jocelyn Paré, 1997).

A fase móvel consiste em um fluido (gás, líquido ou fluidos supercríticos e subcríticos) que carrega os analitos (compostos de interesse) ao deslocar-se em contato com e através da fase estacionária, fase que retém os analitos mediante interações moleculares (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015). A fase móvel não interage com as moléculas do analito, assim, sua única função é transportá-lo através da coluna cromatográfica (Kitson *et al.* 1996; Polo, 2015; Skoog *et al.* 2008).

A distribuição da fase estacionária pode ser planar ou de coluna, neste último caso a coluna pode ser do tipo capilar ou empacotada, assim, a fase estacionária encontra-se recobrando as paredes interiores do capilar ou a coluna pode conter partículas sólidas de recheio (empacotamento) suportando a fase estacionária líquida (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015). A Tabela 3 apresenta a classificação do método de cromatografia gasosa em coluna baseado no tipo de fase estacionária empregado.

A cromatografia gasosa pode ser utilizada em conjunto com outras técnicas visando a identificação e quantificação dos analitos separados da amostra (Scott, n.d.; Sparkman *et al.* 2011). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) é a combinação de duas técnicas analíticas sensíveis e seletivas para a separação, identificação e quantificação



de componentes de misturas orgânicas complexas (Gilbert *et al.* 2013; Skoog *et al.* 2008). A cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura no tempo, enquanto que a espectrometria de massas fornece um espectro de massa para cada componente da mistura auxiliando na identificação individual de cada componente (Stauffer, 2013; Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015).

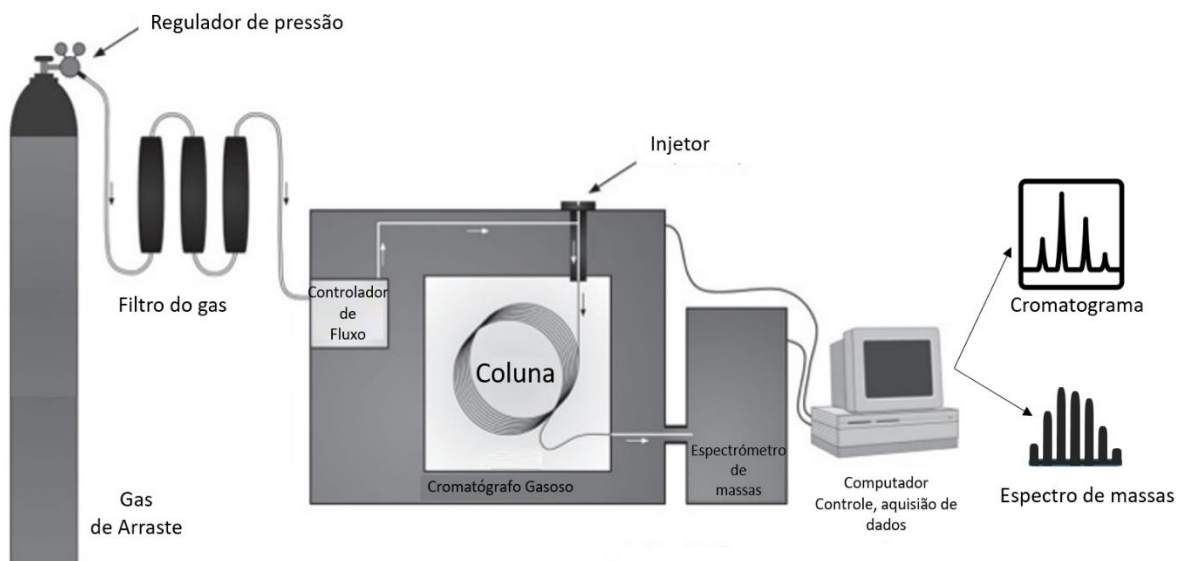
**Tabela 3** - Classificação do método da cromatografia gasosa baseado no tipo de fase estacionária.

<b>Classificação do método cromatográfico</b>	<b>Método específico</b>	<b>Fase estacionária</b>	<b>Tipo de equilíbrio</b>
<b>Cromatografia Gasosa</b>	Cromatografia Gás-Sólido	Sólida	Adsorção
	Cromatografia Gás-Líquido	Líquido adsorvido ou unido a uma superfície sólida	Distribuição entre um gás e um líquido

Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2008).

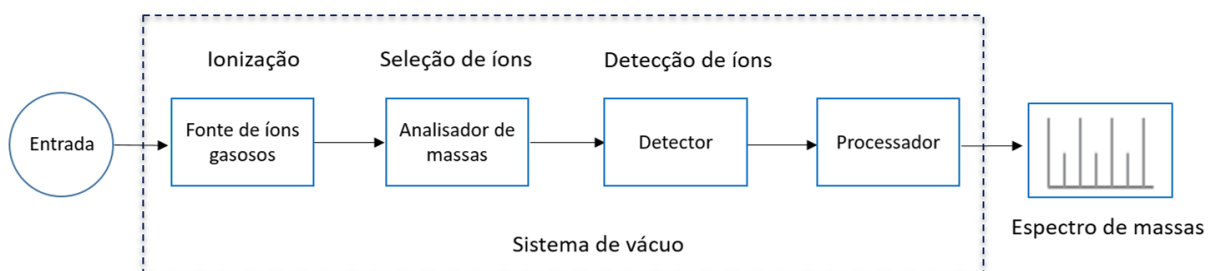
O esquema básico de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Figura 4) consiste, primeiramente, em um gás de arraste que deve ser inerte e isento de impurezas. Os gases mais usados são: Nitrogênio (N<sub>2</sub>), Hélio (He), Hidrogênio (H<sub>2</sub>), Argônio (Ar) e Nitrogênio (N) (Skoog *et al.* 2008; Kitson *et al.* 1996). Em segundo lugar, no sistema de injeção que apresenta um septo de silicone onde é injetada a amostra que ao ser inserida no equipamento é vaporizada no início da coluna graças a um bloco metálico suficientemente aquecido, garantindo que temperatura no injetor vaporize a amostra sem causar a sua decomposição (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015).

A contínua injeção do gás de arraste no injetor permite que os compostos volatilizados fluam ao longo da coluna capilar ou empacotada localizada no interior de um forno que possibilita o controle adequado da temperatura permitindo que o processo de separação seja eficiente (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015). Os componentes são carregados através da fase estacionária pela fase móvel (eluente) e conduzidos para o detector na saída da coluna. O detector gera um sinal elétrico proporcional a quantidade molar dos compostos e a representação gráfica da resposta do detector em função do tempo ou do volume da fase móvel é denominada cromatograma (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015).



**Figura 4** - Ilustração genérica dos constituintes de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. Fonte: Modificado de Stauffer (2013).

Após a separação dos compostos na coluna, eles passam pela linha de transferência e são analisados no espectrômetro de massas. Inicialmente, as moléculas são ionizadas e aceleradas, e posteriormente separadas segundo sua razão massa/carga ( $m/z$ ) através de um campo magnético (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015). As análises de massas são geralmente realizadas através um analisador quadrupolo ou analisador por tempo de voo. Assim, a espectrometria de massas tem como princípio gerar íons de compostos com o intuito de separá-los considerando a sua razão  $m/z$  para assim detectá-los (Skoog *et al.* 2008; Polo, 2015). O esquema simplificado de um espectrômetro de massas é ilustrado na Figura 5.



**Figura 5** - Esquema genérico da Espectrometria de massas. Fonte: Modificado de Skoog et al. (2008).

### 3.4.1. Esteróis X Cromatografia Gasosa

Os esteróis apresentam baixa volatilidade inviabilizando sua análise direta por cromatografia gasosa (CG). Portanto, faz-se necessário aumentar a volatilidade desses compostos através do processo químico denominado derivatização para que seja possível a análise quali e quantitativa dos mesmos por CG.

A derivatização permite transformar compostos químicos menos voláteis e termicamente lábeis em constituintes que podem ser analisados no estado gasoso ampliando a gama de compostos que podem ser identificados através da CG (Řezanka *et al.* 2016). Devido à temperatura elevada no interior do cromatógrafo a gás, a análise de compostos com grupos polares livres sofre de uma divisão pobre (formação de picos de cauda) comprometendo, e até mesmo impossibilitando, a análise quali e quantitativa. Diante disso, a proteção (derivatização) de grupos polares como hidroxila ( $-OH$ ), amino ( $-NH_2$ ), sulfidril ( $-SH$ ) ou carboxílico ( $-COOH$ ) é uma das etapas mais importantes no preparo das amostras, sendo o método mais comum a Sililação (Řezanka *et al.* 2016). Assim, a derivatização de lipídios é um pré-tratamento importante dos esteróis para a análise via CG Na Tabela 4 são apresentados os agentes de derivatização convencionais.

**Tabela 4** - Reagentes de derivatização convencionais usados no método de sililação.

Método	Reagente	Nome Comum
Sililação	BSA	Bis(trimetilsilil)acetamida
	BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
	HMDS	Hexametilsiliazano
	MSTFA	N-metil-N-(Trimetilsilil)trifluoroacetamida

Fonte: Řezanka et al. (2016).

## 3.5. ÁREA DE ESTUDO

### 3.5.1. Rio Aurá

O rio Aurá, área de estudo desse trabalho, está localizado entre os municípios de Belém e Ananindeua, na Região Metropolitana de Belém (RMB). Esse rio forma uma micro-bacia que pertence à bacia do Rio Guamá e é considerada a terceira maior em extensão da RMB com um comprimento de aproximadamente 10.400 m (Siqueira *et al.* 2016, 2019). Um lixão chamado de aterro sanitário de Aurá, criado em 1990 e fechado em 2015, está localizado a

aproximadamente 1400 m ao norte do rio estudado e funcionou de forma descontrolada e irregular por cerca de 24 anos (Santos *et al.* 2016). De acordo com estudos anteriores, a qualidade da água do Rio Aura é impactada negativamente por poluentes orgânicos e inorgânicos, como metais pesados e HPA, provenientes do aterro em questão (Siqueira e Aprile 2013; Siqueira *et al.* 2016; Santos *et al.* 2016).

### **3.5.2. Geologia**

Geologicamente, Belém está inserida no domínio tectônico da Plataforma do Pará, constituída por unidades litoestratigráficas pertencentes à Era Cenozoica, representadas pelo Grupo Barreiras, constituído por rochas sedimentares siliciclásticas, Unidade Sedimentares Pós-Barreiras, Depósitos Argilosos Flúvio-Marinhas, conformado por depósitos sedimentares associados ao sistema continental-estuarino, e também por Depósitos Atuais, que abrangem os depósitos pantanosos, depósitos praias, depósitos de barras fluviais e de bancos de areia e/ou de lama, além de colúvios e aluviões (Oliveira & Silva, 2011).

O Grupo Barreiras (Mioceno-Plioceno) é constituído de sedimentos continentais, argilosos, arenosos, com presença de fósseis vegetais e animais, e ocasionalmente conglomeráticos e ricos em hematita/goethita (Nascimento *et al.* 1995; Oliveira & Silva, 2011). A unidade Sedimentar Pós-Barreiras (Pleistoceno-Holoceno) predomina nas porções nordeste, centro e noroeste, e se encontra subdividida em Formação Superficial Pleistocênica que incluem os depósitos fluviais de paleocanais e os depósitos eólicos/praias; e em Formação Superficial Holocênica que representa os depósitos sedimentares formados por processos desenvolvidos sobre o continente (aluviões, colúvios e elúvios) e/ou próximos à costa (depósitos eólicos/praias) (Oliveira & Silva, 2011). Os sedimentos Holocênicos que constituem as formações aluviais recentes que ocorrem nas áreas das baixadas inundáveis da faixa litorânea e nos vales de rios e igarapés da região (Nascimento *et al.* 1995).

### **3.5.3. Clima**

O clima na RMB é quente e úmido, com precipitação média anual alcançando os 2.834 mm. As temperaturas médias anuais variam entre 25,9°C e 32,4°C. Está na zona climática Af (classificação de Köppen), que coincide com o clima de floresta tropical, permanente úmido,

com ausência de estação fria e temperatura do mês menos quente acima de 18°C (SEGEP, 2012; Somar Meteorologia, 2015; Oliveira *et al.* 2016). Belém apresenta uma média anual de 3.001 mm de chuva, com uma variação de 300 a 450 mm durante os meses do período chuvoso (Da Silva, 2018)

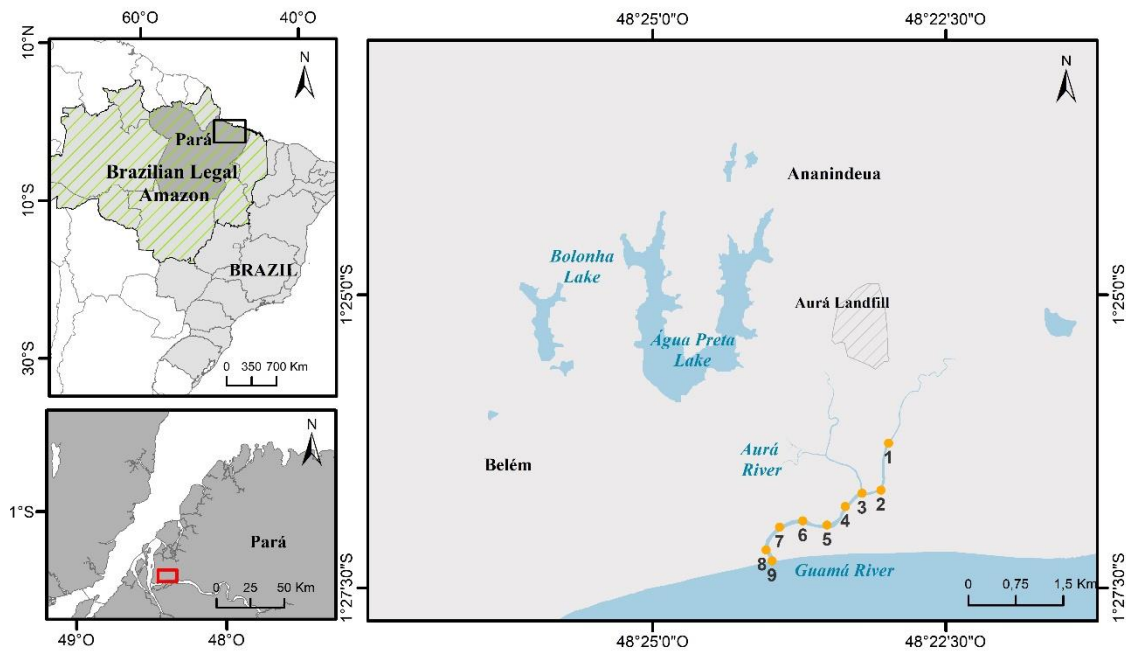
#### **3.5.4. Vegetação**

A vegetação de mangue acompanha as porções semi-litorâneas e fluviais do setor estuarino, a Floresta Ombrófila domina os tratos marginais dos cursos d'água e as baixadas, onde prevalecem formações herbáceas, subarbustiva e arbustiva. A cobertura vegetal do município é composta por floresta secundária ou capoeiras, em Mosqueiro, Caratateua e áreas adjacentes podem ser encontrados testemunhos da antiga floresta densa dos baixos platôs (SEGEP, 2012).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. AMOSTRAGEM E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostragem de sedimentos superficiais (0-10 cm) foi realizada ao longo de 9 pontos no Rio Aurá (RMB-PA-Brasil) (Figura 6), em fevereiro/2020, com o auxílio de uma draga do tipo Van Veen (Figura 7). O georreferenciamento dos pontos de coleta, obtido através de aparelho GPS, é apresentado na Tabela 5. As amostras de sedimento foram armazenadas em recipientes metálicos lavados previamente com n-hexano e mantidas sob refrigeração até o armazenamento em laboratório onde foram congeladas até o início do tratamento pré-análise.



**Figura 6** – Área de estudo e os pontos de coleta.



**Figura 7** - Equipamentos usados na amostragem: a) Recipientes metálicos e b) Draga Van Veen.

**Tabela 5** - Georreferenciamento dos pontos de amostragem.

AMOSTRA	COORDENADAS	
	S	W
1	01°26'16,0"	48°22'59,2"
2	01°26'40,0"	48°23'03,2"
3	01°26'41,5"	48°23'12,8"
4	01°26'48,3"	48°23'21,3"
5	01°26'57,9"	48°23'30,8"
6	01°26'55,7"	48°23'43,1"
7	01°26'58,9"	48°23'55,0"
8	01°27'10,6"	48°24'01,9"
9	01°27'05,6"	48°23'52,7"

#### 4.2. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA E DE MATÉRIA ORGÂNICA

O granulômetro a laser (SALD 2101 Shimadzu) do Laboratório de Oceanografia Química da UFPA foi utilizado para a determinação das frações granulométricas que constituem as amostras, um tratamento prévio de digestão da matéria orgânica dos sedimentos (1 g) com 10% peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizado.

Para a determinação da quantidade de matéria orgânica (%MO) nas amostras, 4 g de sedimento seco foi calcinado em forno mufla a 500°C por 4 h para determinação do teor de carbono orgânico (%CO) por meio da diferença de massa antes e após a calcinação. O %MO foi obtido através da equação  $\%MO = \%CO \times 1.724$  (Ranney, 1969; Dume *et al.* 2017; Kebede & Ademe, 2016).

#### 4.3. ANÁLISE DOS ESTERÓIS

##### 4.3.1. Extração, Derivatização e Padrão Interno

A extração dos esteróis foi realizada utilizando-se 5 g de sedimento seco e pulverizado, 10 mL de diclorometano (DCM) e 5 mL de metanol segundo a metodologia de extração em banho ultrassônico descrita por Frena *et al.* (2016b). Os extratos obtidos foram concentrados a aproximadamente 2 mL por rotoevaporação e depois evaporado completamente sob fluxo de nitrogênio (99,996% de pureza). Os esteróis presentes nos extratos foram derivatizados na forma de éteres trimetilsilil usando-se 50 µL de BSTFA (bis(trimetilsilil)trifluoracetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorossilano). A derivatização foi realizada a 60°C durante 60 min.

Finalmente, os extratos foram reconstituídos a 1 mL com n-hexano. Uma solução de 5 $\alpha$ -colestano (500 ng mL<sup>-1</sup>) foi utilizada como padrão interno (PI) para auxiliar na identificação de todos os compostos por GC-MS.

#### 4.3.2. Identificação e Quantificação

O método de análise seguiu o descrito por Frena et al. (2016b), a identificação e a quantificação dos esteróis por GC foram realizadas no Laboratório Análises de Compostos Orgânicos Poluentes da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob a supervisão da Profa. Dra. Flaviana Cardoso Damasceno.

Uma alíquota de 1  $\mu$ L do extrato derivatizado de cada amostra foi injetada em um cromatógrafo a gás GCMS-TQ8040 – Shimadzu (Figura 8). A coluna cromatográfica SH-RTX-5SilMS (30 m x 0,25  $\mu$ m x 0,25 mm) foi usada sob as seguintes condições 100°C (temperatura mantida por 3 min), aumento de 25°C min<sup>-1</sup> até 280°C (2 min) e aumento de 1°C min<sup>-1</sup> até 300°C (1 min). O gás hélio (99,99% de pureza) com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> foi empregado como gás de arrastre.



**Figura 8** - Cromatógrafo gasoso GCMS-TQ8040 – Shimadzu empregado na análise dos esteróis.

O espectrômetro de massas ion source foi utilizado no modo electron impact (EI) a 70 eV. As temperaturas do injetor e da interface da fonte de íons foi estabelecida em 280°C e



300°C, respectivamente. A análise foi realizada no modo selective ion monitoring (SIM) e o software empregado na aquisição dos dados foi o da Shimadzu (Kyoto, Japan).

A curva de calibração para cada esterol foi obtida a partir de soluções padrão de coprostanol, colesterol, estigmastanol, colestanol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol em diferentes níveis de concentração dentro do intervalo esperado nas amostras. Os esteróis avaliados foram identificados com base nos espectros de massa e tempos de retenção (ANEXOS 1 e 2) obtidos para os padrões e quantificados com base nos fatores de resposta dos padrões relativos ao 5 $\alpha$ -colestano (PI).

Os brancos processuais foram realizados e nenhum pico interferiu nas análises dos compostos alvo. O percentual de recuperação do método de extração (avaliado através do Androstanol) variou de 76% a 99%, uma taxa aceitável considerando amostras ambientais (Ribani *et al.* 2004). O limite de quantificação (LOQ) de cada analito foi definido como o primeiro ponto da curva analítica dividido pela massa de sedimento empregado na análise e o limite de detecção (LOD) como três vezes menor que o LOQ ( $LOD = LOQ/3$ ).

#### **4.3.3. Análise Estatística**

A análise estatística das variáveis ambientais envolvidas no presente estudo foi realizada através de análise de componente principal (PCA) e da Correlação de Pearson, determinadas com a linguagem de programação R (<http://www.r-project.org/>) e com o Microsoft Excel, respectivamente.

A PCA é um método que permite facilitar a interpretação de dados reduzindo o número de variáveis conservando sua informação e permite identificar quais variáveis tem maior influência (Nogarotto *et al.* 2020). O coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ) é uma medida estatística do grau de associação e dependência entre duas variáveis quantitativas (Figueredo & Silva, 2009).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este tópico da dissertação consiste no principal resultado obtido através da pesquisa realizada durante o mestrado, o artigo intitulado “Sterol markers assessment of anthropogenic pollution in surface sediments from an urbanized Amazon River (Northern Brazil)” submetido à revista *Environmental Science and Pollution Research (ESPR)* em 15 de março de 2022 (ANEXO 3).

### **A sterol marker assessment of anthropogenic pollution in surface sediments from an urbanized Amazon River (Northern Brazil)**

Jorge Hernando Agudelo Morales<sup>a\*</sup>; Marina da Silva Messias<sup>b</sup>; Camila Carneiro dos Santos Rodrigues<sup>a</sup>; Flaviana Cardoso Damasceno<sup>b</sup>; José Augusto Martins Corrêa<sup>a</sup>, Angela Esmeralda Cely Torres<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal University of Pará, Rua Augusto Corrêa, 1 - Guamá, Belém-PA-Brazil, 66075-110.

<sup>b</sup>Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n - Jd. Rosa Elze, São Cristóvão-SE-Brazil, 49100-000.

\*jorge.morales@ig.ufpa.br; (+5591) 98088-0626 (*Corresponding author*)

#### **Highlights**

Anthropogenic pollution in surface sediments has far-reaching consequences for the Amazonian water quality; Coprostanol, sterol ratios, and statistical analysis showed that moderate sewage and landfill leachate pollution can affect Amazonian aquatic systems and human health.

#### **Abstract**

The Aurá River in Brazilian Amazon has been experiencing anthropogenic input from riverine communities and the Aurá landfill for many years. In this work, we assess the occurrence, sources, and distribution of six sterol markers in surface sediments of Aurá River to evaluate organic inputs in this water body. Gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) was used to determine sterol compounds. The sterol markers identified, diagnostic ratios, and statistical analysis showed that Aurá River sediments presented two primary sterol sources: anthropogenic (domestic sewage and inputs from Aurá landfill) and natural sources (terrestrial higher plants). Station 1 (the closest site to the Aurá landfill) presented the highest level of contamination. Coprostanol concentrations at this station was 219.8 ng g<sup>-1</sup>. This coprostanol range indicates moderate human fecal contamination. This work demonstrated that domestic sewage pollution from riverine communities and organic matter inputs from Aurá landfill might be assumed as potential threats to environmental and human health.

**Keywords:** Sterol markers; surface sediments; organic pollution, domestic riverine sewage; ecological and human health risk; Amazonian aquatic systems.

## 1. Introduction

Amazonia is the world's largest tropical forest, containing 15% to 20% of the world's freshwater supply (de Melo et al. 2019). It is estimated that approximately 12-14% of global surface water drains through the 12 hydrographic regions in Brazilian territory. Although the importance of this region, there has been an increased deterioration of water quality due to the input high amounts of pollutants related to human pressures (Singh et al. 2020; Edokpayi et al. 2017) that include discharge of untreated domestic sewage, irregular landfills, and open dumps (Siqueira et al. 2016; de Melo et al. 2019; de Cassia Silva Bacha et al. 2021). In addition, contaminants leached from landfills are subject to infiltration into groundwater (Amano et al. 2021). Pollution of surface waters affects the supply of clean water and all the life that depends on it (Häder et al. 2020).

Sterols are some of the most used chemical markers in studies that include sewage inputs because of their specificity with the human fecal material, resistance to microbial degradation, and relative ease to track and quantify (Martins et al. 2010; Carreira et al. 2015; Frena et al. 2016b). Furthermore, sterols have been used to identify fecal pollution from landfill leachate (Zhang et al. 2008). These compounds have hydrophobic properties and are easily adsorbed to particles, allowing them to accumulate in sediments (Wen et al. 2019). Sterol markers provide much more consistent evidence of the source and the severity of sewage pollution compared to traditional methods that use microorganisms (eg *Escherichia coli*) and molecular markers (eg DNA) (Wen et al. 2019; Thomes et al. 2019).

Coprostanol is a sterol synthesized in the digestive tracts of humans and higher vertebrates through the hydrogenation of cholesterol. This sterol is the most abundant in human feces, accounting for 60% of the total sterols (Leeming et al. 1996). Thus, it has been used to trace anthropogenic fecal inputs in aquatic ecosystems (Carreira et al. 2015). Investigations of sewage contamination in sediments comparing fecal sterols and coliform counts showed that coprostanol may be considered the best indicator of fecal contamination (Lima Da Costa and Carreira 2005). Other studies in which pathogens, such as *E. coli*, have been destroyed by chlorination or heat have used coprostanol to indicate fecal contamination in the environment (Mudge and Seguel, 1999; Peng *et al.* 2005; Reeves and Patton, 2005; Reichwaldt et al. 2017). However, sterol markers diagnostic ratios have been proposed to improve the reliability of the pollution assessment caused by domestic sewage, allowing confirmation of fecal pollution and distinguishing between human and animal sources (Carreira et al. 2015; He et al. 2018).

Cholesterol and cholestanol support research on anthropogenic organic matter input patterns in sediments (Martins et al. 2010). Cholesterol is the main zoosterol. However, it can be attributed to other organisms, including algae, diatom, macrophytes, and a wide variety of phytoplankton (Gordon 2003; Sojinu et al. 2012; He et al. 2018). Moreover, cholesterol can also enter into riverine ecosystems through sewage runoff and agricultural inputs (Thomes *et al.* 2019). Cholestanol, the epimer of cholesterol, is found in situ as a cholesterol bacterial reduction product and can be considered as a sewage sterol (Frena et al. 2016a; Thomes et al. 2019). It can also be produced by marine and terrestrial plants, zooplankton, and phytoplankton (Thomes et al. 2019). Plant sterols such as campesterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, and stigmastanol are used to estimate plant-derived OM input to aquatic systems (Bataglion et al. 2016).

The Aurá River is relevant for Belem city (the second-largest city in Brazilian Amazon) because it directly influences the catchment springs of water to urban supply (Siqueira and Aprile 2013). There are two main sources of organic anthropic pollution affecting the Aurá River basin. First, this river drains the surroundings of the Aurá landfill, actually deactivated but which did not treat correctly the garbage disposed on it for many years. Consequently, this water body has constantly received organic anthropogenic contamination from soil runoff (Siqueira et al. 2016). And finally, the study river is under constant contamination as a consequence of the inadequate sewage system in the local riverside community (de Oliveira et al. 2013; Siqueira and Aprile 2013). To date, some research has been carried out in the Aurá river basin. In 2013, Siqueira & Aprile assessed the environmental risks due to contamination by metals. More recently, Santos et al. (2016) evaluated the spatial variation and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the surface sediments of this river. However, no research has been found that surveyed sewage pollution in this aquatic system.

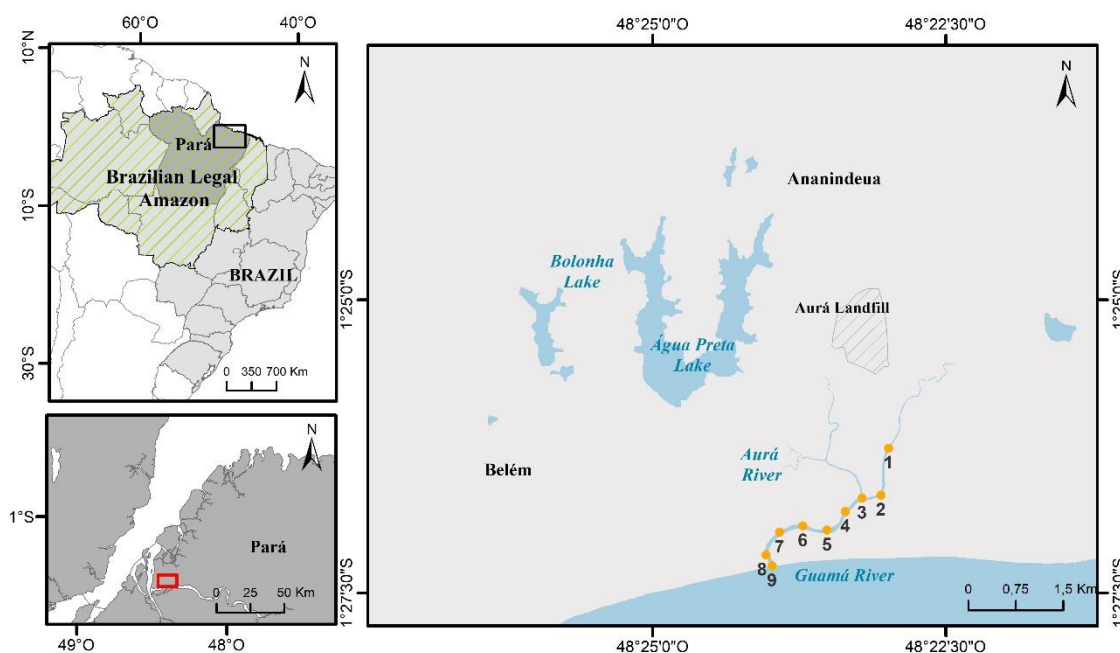
In this context, this study aimed to determine sterol markers concentrations in surficial sediments along the Aurá River, to evaluate: (i) organic contamination levels related to sewage compounds, and (ii) sterols distribution and origin to monitor the domestic effluents input and the influence of the Aurá sanitary landfill into the river. This research contributes to the literature concerning organic pollution in Amazonian aquatic bodies. In addition, the data can support the implementation of pollution control programs and sustainable decision-making in the region.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Study area*

The Aurá River basin is located southeast of Belém city, Pará, Northern Brazil. This river is the third-largest in extension inside Belém Metropolitan Region (BMR) (Siqueira et al. 2016). The river mouth is 200 m from the water collection site of Companhia de Saneamento do Pará (COSANPA) on the Guamá River. The water captured is conducted to Bolonha and Água Preta lakes and supplies 75% of the BMR (Siqueira *et al.* 2016). A landfill, created in 1990 and closed in 2015, is located approximately 1400 m north of the study river, it operated uncontrolled and irregularly for about 24 years (Santos et al. 2016). According to previous studies, the water quality from Aura River is negatively impacted by organic pollutants from runoff of the landfill soil (Siqueira and Aprile 2013; Siqueira et al. 2016; Santos et al. 2016).

Sampling was carried out in March/2020 along the Aurá River, a total of 9 surficial sediment samples (depth 0-10 cm) were collected (Fig. 1) using a handheld Van Veen grab. Sediment samples were placed into pre-cleaned aluminum recipients and stored under refrigeration during transportation to the laboratory. Before initial chemical treatments, all sediment samples were freeze-dried, pulverized in a mortar and stored at 4°C before further analysis.



**Fig. 1.** Study area map and sampling sites location.

## 2.2 Chemicals and reagents

Cholesterol ( $3\beta$ -cholest-5-en-3-ol), Coprostanol ( $3\beta,5\beta$ cholestan-3-ol), Stigmastanol ( $3\beta,5\alpha$ -stigmastan-3-ol), Cholestanol ( $3\beta,5\alpha$ -cholestan-3-ol),  $\beta$ -sitosterol ( $3\beta$ -stigmast-5-en-3-ol), androstanol ( $5\alpha$ -androstan-3  $\beta$ -ol) and  $5\alpha$ -cholestane (internal standard) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Stigmasterol ( $(3\beta,22E)$ -stigmasta-5,22-dien-3-ol) and BSTFA (bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)/TMCS (trimethylchlorosilane) (99:1) from Spectrum (Gardena, CA). Stock solutions containing individual sterols were prepared in HPLC-grade dichloromethane (DCM). Working standard solutions were prepared from these solutions and diluted with 95% hexane before analysis. HPLC-grade 95% *n*-hexane, methanol, and DCM were purchased from Tedia (RJ, Brazil).

## 2.3 Sterols analytical procedures

Sterols extraction and analysis methods applied in this study were described by Frena et al. (2016). An amount of 5 g of lyophilized sediment from each sampling site was extracted in an ultrasonic bath (model UltraCleaner 1400; Callmex, São Paulo, Brazil). Sediment samples were immersed in a mixture of 10 mL of DCM and 5 mL of methanol (2:1, v/v) for 30 min (three times) at a 40 kHz frequency. Extracts were reduced to 2 mL by rotoevaporation and posteriorly evaporated to dryness under a nitrogen stream (99.996 % purity). Sterols in the extracts were derivatized into the form of trimethylsilyl ethers using 50  $\mu$ L of BSTFA with 1% TMCS, this process was carried out for 60 min at 60°C. The extracts obtained after derivatization were reconstituted in 1 mL of *n*-hexane. The internal standard  $5\alpha$ -cholestane (500 ng mL<sup>-1</sup>) was added after extraction and dilution. Finally, an aliquot of 10  $\mu$ L of the reconstituted and the derivatized extract was injected into the GC-MS-MS in splitless mode (1 min), at 280°C, for sterols markers identification and quantification.

The analysis was conducted on a Shimadzu GC-MS QP2010 system (Kyoto, Japan), the extracts carried by helium (99.995 % purity) at a 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate, and a Zebron ZB5-MS capillary column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm df) supplied by J.W. Scientific (Santa Clara, CA, USA) was used under the following conditions: 100°C (held for 3 min), increasing at 25°C min<sup>-1</sup> to 280°C (held for 2 min), then rising at 1°C min<sup>-1</sup> to 300 °C (held for 1 min). The mass spectrometer ion source was operated in electron impact (EI) mode at 70 eV, GC-MS interface temperature was set at 300°C, and the ion source at 280°C. Analysis was performed in selective ion monitoring (SIM) mode. Data were obtained by GC Solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Calibration curves for each sterol were obtained from standard solutions of coprostanol, cholesterol, stigmastanol, cholestanol, stigmasterol, and β-sitosterol at different concentration levels. The evaluated sterols were identified based on mass spectra and retention times obtained for standards and quantified based on response factors of standards relative to 5α-cholestane (IS). Procedural blanks were performed and no peaks interfered with the analyses of the target compounds. Surrogate (Androstanol) recovery ranged from 76% to 99%, an acceptable rate considering environmental samples (Ribani *et al.* 2004). The limit of quantification (LOQ) of each analyte was defined as the first point of the analytical curve divided by the sediment mass and the limit of detection (LOD) as three times lower than the LOQ.

#### 2.4 Sterols origin

The diagnostic ratios of sterols origin (Tab.1) were used as tools to distinguish between human and animal fecal origins and to assess the degree of pollution caused by residential sewage (He *et al.* 2018).

**Tab. 1** Diagnostic ratios applied in this study

Name	Diagnostic ratio	value	Indicative	Reference
R1	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Coprostanol} + \text{Cholestanol}}$	< 0.3	No Fecal contamination	Grimalt et al. (1990)
		0.3 – 0.7	Moderate Fecal contamination	
		> 0.7	Human Fecal contamination	
R2	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Cholesterol}}$	≤ 0.5	Biogenic sources	Grimalt et al. (1990)
		> 0.5 and ≤ 1.0	Human fecal contamination	Leeming et al. (1996)
		> 1.0	Intense sewage contamination	Takada et al. (1994) Fattore et al. (1996)
R3	$\frac{\text{Coprostanol}}{\Sigma \text{esteróis}} \times 100\%$ ou (%Cop)	5-6%	Human fecal contamination	Isobe et al. (2002)
		< 2%	No Human fecal contamination	
R4	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Cholestanol}}$	> 0.5	Human fecal contamination	Leeming et al. (1996) Shah et al. (2007)
R5	$\frac{\text{Coprostanol}}{\text{Cholestanol} + \text{Cholesterol}}$	> 0.06	Human fecal contamination	Writer et al. (1995)

R6	Cholestanol	< 0.5	Fresh organic input	Chaloux et al. (1995)
	Cholesterol	> 0.5	In situ reduction of cholesterol	

### 2.5 Bulk parameters

For samples granulometry determination, 4 g of dried sediment were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, then centrifuged, and finally washed with distilled water to eliminate the organic matter (OM). The grain size was analyzed with a laser granulometer (SALD 2101 Shimadzu). The OM content in samples was determined by calcinating 5 g of dried sediment at 500°C for 4 h.

### 2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Rstudio Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). It was applied principal component analysis (PCA) to identify relations among the sterol markers and bulk parameters (grain size and organic matter) and to distinguish sampling stations according to sterols sources. Pearson correlation was determined to better understand the relationship between the sterols and bulk parameters.

## 3. Results and discussion

Sterols concentrations determined in 9 samples of the superficial sediments are shown in Table 2. Total sterols concentrations ( $\Sigma$ sterols) ranged from 1319.6 ng g<sup>-1</sup> (site 4) to 364.9 ng g<sup>-1</sup> (site 7). Coprostanol is the most abundant sterol in human feces, accounting for 40–60% of total sterol content, and it is considered a biomarker of human fecal contamination (Leeming et al. 1998; Peng et al. 2005; Sullivan et al. 2010; Frena et al. 2019). This sterol was identified in 6 of the 9 samples, ranging from below quantification limit (stations 6-9) to 219.8 ng g<sup>-1</sup> (site 1), and accounted for 5.16% of  $\Sigma$ sterols in the study area. In this work, it was used the threshold coprostanol values proposed by Melo et al. (2019): 10 ng g<sup>-1</sup> characterizing uncontaminated sediments, 100 ng g<sup>-1</sup> contaminated sediments, and 500 ng g<sup>-1</sup> severely polluted sediments.

The highest coprostanol levels were found at site 1 (224,49 ng g<sup>-1</sup>) in the nearest site from Aura landfill. These values suggest similar range of fecal material input to other aquatic systems in Brazil and worldwide (Table 3). Coprostanol levels were similar to sediments of Tokyo bay, Japan (20–243 ng g<sup>-1</sup>) (Chaloux et al. 1995), Ubatuba Bay, Brazil (224,49 ng g<sup>-1</sup>) (Muniz et al. 2006), and slightly superior to sediments of the inner shelf adjacent to Sergipe River (58.6-184.1 ng g<sup>-1</sup>) (Carreira et al. 2015).

**Tab. 2** The total and individual sterol concentration compounds (ng g<sup>-1</sup> dw) and sedimentological characteristics for the 9 surficial sediment sampling sites on Aurá River (Northern Brazil).

Variables	Samples								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Coprostanol</b>	219.8	28.3	61.5	76.7	24.9	ND	ND	ND	ND
<b>Cholesterol</b>	55.7	138.2	146.1	158.6	66.7	21.8	56.3	16.5	34.4
<b>Cholestanol</b>	112.6	126.3	182.3	235.9	65.0	50.1	20.6	30.5	25.7
<b>Stigmasterol</b>	187.8	230.4	253.7	312.8	101.1	52.7	28.6	45.0	81.1
<b>β-Sitosterol</b>	335.7	220.2	102.3	320.7	317.4	319.1	222.7	340.4	348.4
<b>Stigmastanol</b>	355.4	243.4	354.4	215.0	333.7	330.1	36.7	106.0	219.5
<b>Σsterols</b>	1267.0	986.8	1100.3	1319.6	908.7	773.9	364.9	538.4	709.1
<b>R1</b>	0.7	0.2	0.3	0.2	0.3	-	-	-	-
<b>R2</b>	3.9	0.2	0.4	0.5	0.4	-	-	-	-
<b>R3</b>	17.3	2.9	5.6	5.8	2.7	-	-	-	-
<b>R4</b>	2.0	0.2	0.3	0.3	0.4	-	-	-	-
<b>R5</b>	1.3	0.1	0.2	0.2	0.2	-	-	-	-
<b>R6</b>	2.0	0.9	1.2	1.5	1.0	2.3	0.4	1.8	0.7
<i>Sedimentological Characteristics</i>									
<b>%OM</b>	10.8	8.8	16.8	6.3	5.7	9.8	7.5	7.2	11.8
<b>%MUD</b>	27.7	42.3	27.7	24.0	27.7	38.3	27.7	30.7	27.7

ND: not determined, levels below quantification limit. R1: Coprostanol/(Coprostanol + Cholestanol), R2: Coprostanol/(Cholesterol), R3: (%Cop), R4: Coprostanol/(Cholestanol) R5: Coprostanol/(Cholestanol + Cholesterol), R6: Cholestanol/(Cholesterol).

**Tab. 3** Total sterol and coprostanol concentrations (ng g<sup>-1</sup>) in different aquatic systems around the world.

Location	Total esterol concentration (ng g <sup>-1</sup> )	Coprostanol Concentration	References
Tokyo Bay, Japan	20–243	243	Chaloux et al. (1995)
Ubatuba Bay, Brazil	<10–270	270	Muniz et al. (2006)
Tay Estuary, Scotland	0.15–1.70	1.53	Reeves and Patton (2005)
Inner shelf NE coast, Brazil	<10–184	184	Carreira et al. (2015)
Sepeitaba Bay, Brazil	10–430	430	Carreira et al. (2009)
Manaus' rivers, Brazil	167–25,431	12,829	Melo et al. (2019)

Data determined for station 1 suggest contamination of long-term emission from the Aura landfill, which activity was finished in 2015, and may be the main source of coprostanol to the river. Coprostanol was not detected at stations 6-9 indicating that domestic sewage probably does not affect these sites. The absence of coprostanol at these sites suggests that the hydrodynamic of the Aura River is efficient for contaminant dispersion.

The predominant sterol in all examined samples along the Aura river basin was β-sitosterol, which is the principal sterol present in higher plants (Volkman 2005; Frena et al. 2016b; Derrien et al. 2017), reflecting significant input of terrigenous material to the studied area. However, the presence of β-sitosterol may also be attributed to domestic sewage discharges due to the typical presence of this sterol in vegetable oils used for cooking (Froehner et al. 2009; Frena et al. 2016b). Other sterols that were prevalent along the Aura River basin were stigmastanol (sites 1-3 and 5-6) and stigmasterol (sites 1-4), which are indicatives of herbivore feces and

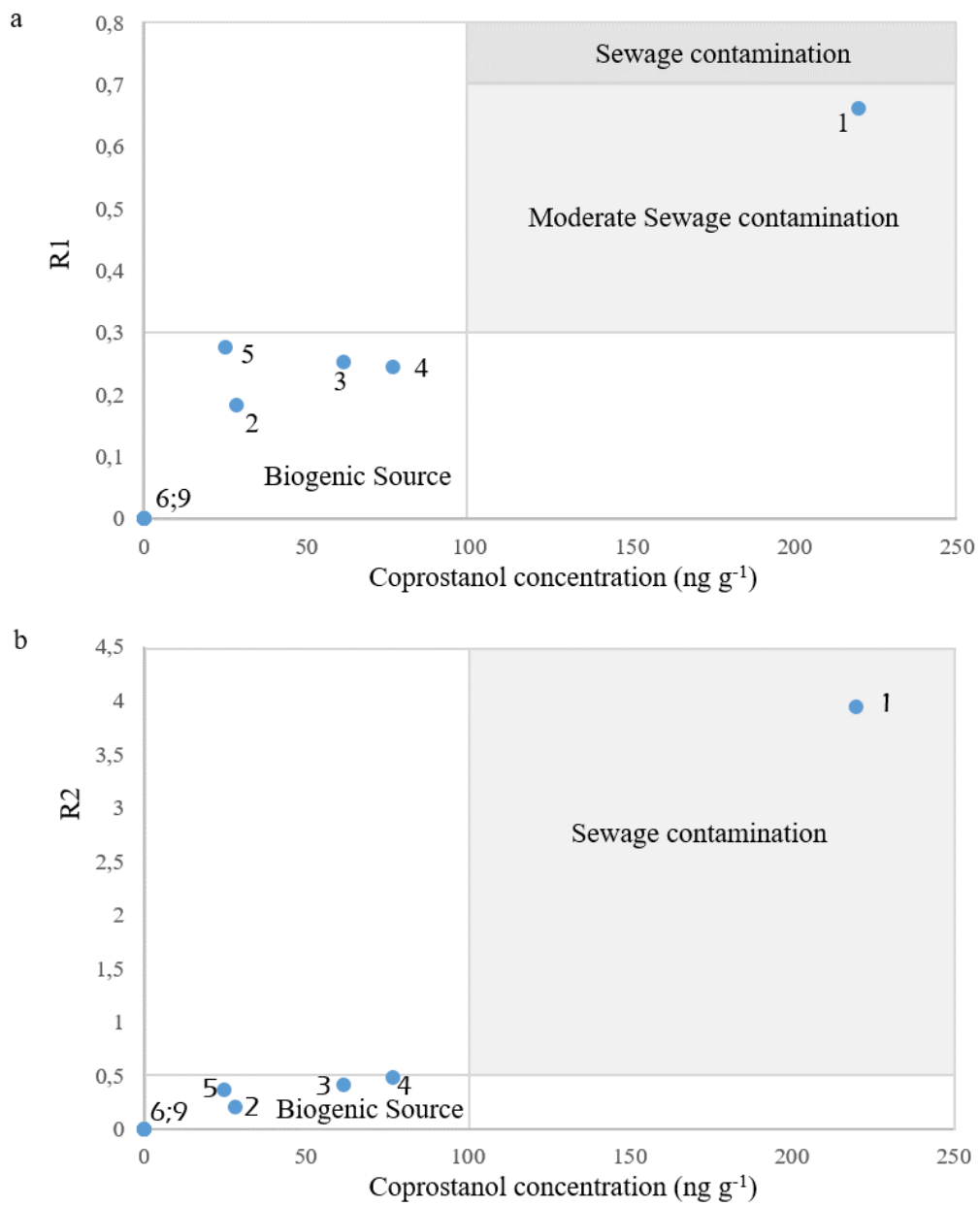


vascular plants metabolism, respectively (Martins et al. 2008; Frena et al. 2016b). High levels of phytosterols and sewage sterols at stations 1 may be related to eutrophication processes that favor cholesterol, cholestanol, and phytosterols production in addition to sewage markers (Melo et al, 2019).

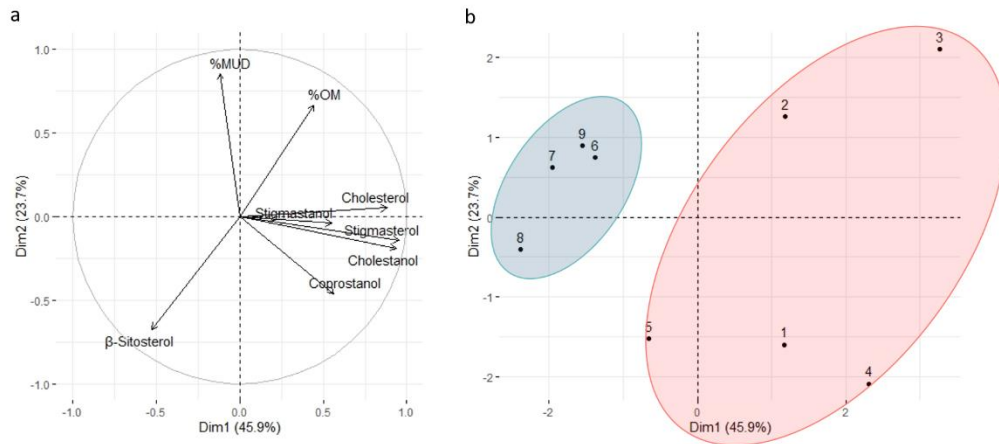
Diagnostic ratios are helpful in sewage pollution assessments. In this study, we considered different diagnostic ratios, shown in Table 1, to evaluate sewage contamination sources for Aurá River sediments. According to Grimalt et al. (1990), the diagnostic ratio coprostanol/(coprostanol + cholestanol) (R1) with values higher than 0.7 suggests sewage pollution and values lower than 0.3 indicates the nonexistence of this kind of contamination. R1 for station 1 and (0.66) shows that this location presents moderate sewage pollution. The relatively high quantities of coprostanol ( $>100 \text{ ng g}^{-1}$ ) and values over 0.7 for R1 suggest significant levels of sewage pollution (Frena et al. 2016b). For the other studied sites, R1 was  $>0.27$  indicating that they are unpolluted.

Biogenic and anthropogenic organic matter inputs can be distinguished using the ratio coprostanol/cholesterol (R2).  $R2 > 0.5$  is associated with sewage contamination, whereas  $< 0.5$  is attributed to biogenic sources (Grimalt et al. 1990; Leeming et al. 1996; Takada et al. 1994; Fattore et al. 1996; Frena et al. 2016b). This ratio showed that station 1 is the most affected by sewage pollution. The cross plot representations of R1 and R2 vs coprostanol concentrations indicated that site 1 is affected by anthropogenic pollutants, and the biogenic OM inputs influence the other sites. The cross plot representations of coprostanol levels vs coprostanol/(coprostanol+cholestanol) and coprostanol/cholestanol is shown in Fig. 2. According to the diagnostic ratios, except cholesterol/cholesterol, only 4 (sites 6-9) of the 9 evaluated stations are not affected by human fecal compounds.

Multivariate statistical analyses such as principal component analysis (PCA) and Pearson correlation are generally used to assess sewage pollution in aquatic systems (Martins et al. 2008; Frena et al. 2016b; Cabral et al. 2019). In this study, PCA was employed to identify potential sources of sewage contamination. The first component (PC1) and the second component (PC2) explained 45.9% and 23.7% of the total variance, respectively (Fig. 3). Stigmasterol, cholesterol, cholestanol, and coprostanol were the significant variables for PC1 whereas the dominant sterols for PC2 were stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol (Fig. 3a). PC1 showed a positive correlation among the sterols (except  $\beta$ -sitosterol) and allowed to associate the studied stations in two groups according to the contamination sources (Fig. 3b). The stations clustered in red present both anthropogenic and biogenic sources with coprostanol levels  $> 24.9 \text{ ng g}^{-1}$ . Stations clustered in blue are associated only with biogenic sources.

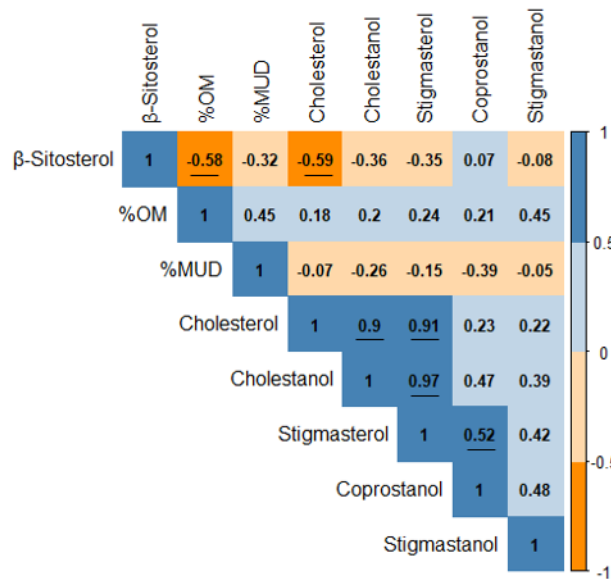


**Fig. 2.** Cross plots of coprostanol/(coprostanol + cholesterol) (R1) and coprostanol/cholesterol (R2) versus coprostanol concentrations for sampling sites from Aurá River.



**Fig. 3.** PCA analysis of sterol markers and bulk parameters. **a** Variables (loadings) **b** Sediment samples collected from the Aurá River were clustered according to their sterol source. Dim1: PC1; Dim2: PC2. The stations clustered in red present both anthropogenic and biogenic sources with coprostanol and stations clustered in blue are associated only with biogenic sources.

Pearson's correlation analysis ( $r$ ;  $p < 0.05$ ) involving sterols compounds, %OM, and %MUD showed a high positive correlation between two groups of sterols. The first group (coprostanol and stigmasterol) showed a significant correlation coefficient (0.52). Other studies have also reported a significant correlation between fecal and plant sterols (Yao et al. 2013; de Melo et al. 2019; Wen et al. 2020). One explanation for this result is that plant sterols, such as stigmasterol, are derived from municipal sewage in addition to their terrestrial source (Matić Bujagić et al. 2016; de Melo et al. 2019; Wen et al. 2020). The second group was cholestanol, cholesterol, and stigmasterol, indicating both anthropogenic and biogenic sources of OM in the study area. Fig 4 shows moderate and strong correlation coefficients ( $r > 0.5$ ) (highlighted in bold) between the assessed variables.



**Fig. 4** Correlation matrix of individual sterol concentrations and bulk parameters from surficial sediments of Aurá River.

Coprostanol and cholesterol showed a low positive correlation coefficient (0.23), it suggests the presence of human fecal contamination inputs in Aurá River because cholesterol, besides being found in zooplankton, a wide variety of phytoplankton, and several forms of marine animals, is also a byproduct of higher animals' feces, such as humans (Martins et al. 2007; Bataglioni et al. 2016; Frena et al. 2016b). Pearson correlation confirms the

observation performed by PCA since it also shows both anthropogenic and biogenic sources to the surficial sediments of Aurá River.

Between the sterols assessed in this study, only  $\beta$ -sitosterol showed some degree of correlation with cholesterol and %OM, both negatives (Fig. 4). This sterol only demonstrated a positive correlation with coprostanol, considered fecal sterol (Thomes et al. 2019). This observation may suggest that surficial sediments from Aurá River are influenced by anthropogenic pollution, taking into account that  $\beta$ -sitosterol is related to domestic pollution (Volkman et al. 2008; Ali et al. 2011; Thomes et al. 2019) as previously discussed. According to PCA and Pearson correlation analysis, sedimentological characteristics did not appear to influence sterols composition or levels (except for coprostanol).

## **Conclusions**

For the first time, fecal pollution was determined in surficial sediments from Aurá River using sterol biomarkers, diagnostic ratios, and statistical analysis. Sterol ratios and coprostanol levels permitted the identification of anthropogenic organic pollution from the Aurá Landfill and domestic sewage relied by riverine communities. Statistical analysis (PCA and Pearson correlation) corroborates with this result. In addition, PCA allowed to group the studied sites according to the main source of organic matter. Although the Aura landfill is currently out of service, there is evidence of organic contamination reaching Aurá River. The absence of efficient sewage treatment for the riverine communities and the metropolitan region of Belém (PA) represents an ecological threat to Aura River. Hence, this study provides a basis for future management of the studied area and its surroundings which is an important source of water supply.

## **Acknowledgments**

The authors thank the Postgraduate Program in Geology and Geochemistry of the Federal University of Pará, the Coordination of Support for Higher Education Research (CAPES) for the MSc grant for J. Agudelo Morales, and the Laboratory of Organic Pollutants Compounds Analysis from the Federal University of Sergipe.

## 6. CONCLUSÃO

Pela primeira vez, a poluição fecal foi determinada em sedimentos superficiais do rio Aurá através do uso de esteróis como biomarcadores, de razões diagnósticas e de análise estatística. A concentração dos esteróis avaliados (coprostanol, colesterol, colestanol, estigmastanol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol) e os níveis de coprostanol, máximo de 217,79 ng g<sup>-1</sup> e médio de 45,68 ng g<sup>-1</sup>, permitiram a identificação da influência do Aterro Sanitário do Aurá e de esgotos domésticos das comunidades ribeirinhas de forma distinta ao longo do rio Aurá. As análises estatísticas empregadas no estudo (Análise de componente Principal - PCA e Correlação de Pearson) corroboraram com esse resultado. Além disso, a PCA permitiu associar os locais estudados em dois grupos de acordo com a principal fonte de matéria orgânica aportada. O primeiro grupo abrange às estações com aporte de fontes terrestre e antropogênica e o segundo corresponde às estações com aporte somente de fontes terrestres.

Embora o aterro do Aurá esteja atualmente inativado, há evidências de contaminação orgânica proveniente do mesmo chegando ao rio Aurá através da lixiviação do solo pelas chuvas intensas e comuns na região. A ausência de tratamento de esgoto eficiente para as comunidades ribeirinhas e Região Metropolitana de Belém (RMB), estado do Pará, representa uma ameaça ecológica ao rio estudado. Assim, o presente estudo fornece uma base de dados para futura gestão da área estudada e de seu entorno, importante fonte de abastecimento de água para a RMB.

## REFERÊNCIAS

- Ali MM, Humrawali N, Latif MT, Zakaria MP. 2011. Composition and Sources of Sterols in Pulau Tinggi, Johor, Malaysia. Malaysia, *Sains Malaysiana*, **40**(2):111–118.
- Adnan, N.H., Zakaria, M.P., Juahir, H., Ali, M.M. 2012. Faecal sterols as sewage markers in the Langat River, Malaysia: Integration of biomarker and multivariate statistical approaches. *Journal of Environmental Sciences, Malaysia*, **24**(9): 1600–1608. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60979-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60979-0)
- Amano, K. O. A., Danso-Boateng, E., Adom, E., Kwame Nkansah, D., Amoamah, E. S., & Appiah-Danquah, E. 2021. Effect of waste landfill site on surface and ground water drinking quality. *Water and Environment Journal*, **35**(2): 715–729. <https://doi.org/10.1111/wej.12664>
- Antanasijević, D., Matić Bujagić, I., Grujić, S., Laušević, M. 2018. Effect of compositional data in the multivariate analysis of sterol concentrations in river sediments. *Microchemical Journal*, **139**: 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.02.031>
- Araujo, M.P., da Costa, T.L.F., Carreira, R.S. 2011. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos em sedimentos de um sistema estuarino-lagunar tropical (mundaú-manguaba, al), *Química Nova*, Rio de Janeiro, **34**(1): 64–70. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000100013>.
- Bataglion G.A., Koolen H.H.F., Weber R.R., Eberlin M.N. 2016. Quantification of sterol and triterpenol biomarkers in sediments of the Cananéia-Iguape estuarine-lagoonal system (Brazil) by UHPLC-MS/MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2016**: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/8361375>
- Brown R.C., Wade T.L. 1984. Sedimentary coprostanol and hydrocarbon distribution adjacent to a sewage outfall. *Water Research*, **18**(5): 621–632. doi:10.1016/0043-1354(84)90213-6
- Cabral, A.C., Wilhelm, M.M., Figueira, R.C.L., Martins, C.C. 2019. Tracking the historical sewage input in South American subtropical estuarine systems based on faecal sterols and bulk organic matter stable isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). *Science of the Total Environment*, **655**:855–864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.150>
- Canuel, E.A. 2001. Relations between river flow, primary production and fatty acid composition of particulate organic matter in San Francisco and Chesapeake bays: A

multivariate approach. *Organic Geochemistry* **32**(4): 563–583. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00195-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00195-9)

Carneiro, C.S., Soares, S., Corrêa, M.J.A. 2016. Occurrence and Sources of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediment Samples along the Aurá River (Northern Brazil), *Geochimica Brasiliensis*, Belém, **30**(1): 26–32. <https://doi.org/10.21715/GB2358-2812.2016301026>

Carreira, R.S., Albergaria-Barbosa, A.C.R., Arguelho, M.L.P.M., Garcia, C.A.B. 2015. Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. *Marine Pollution Bulletin*, **90**(1-2): 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.011>

Carreira, R.S., Araújo, M.P., Costa, T.L.F., Spörl, G., Knoppers, B.A. 2011. Lipids in the sedimentary record as markers of the sources and deposition of organic matter in a tropical Brazilian estuarine-lagoon system. *Marine Chemistry*, **127**(1-4): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.07.002>

Carreira, R.S., Cordeiro, L.G.M.S., Oliveira, D.R.P., Nudi, A.H., Farias, C.O., Scofield, A.L., Massone, C.G., Wagener, A.L.R. 2017. Origem e distribuição da matéria orgânica sedimentar usando indicadores geoquímicos. In: Falcão, A.P.C., Wagener, A.L.R., Carreira, R.S. (ed.). *Química ambiental: caracterização ambiental regional da Bacia de Campos, Atlântico Sudoeste*. Habitats, v. 6. p. 179-228. <https://doi.org/10.1016/b978-85-352-7563-6.50015-6>

Carreira, R.S., Ribeiro P., Silva C.E.M., Farias, C.O. 2009. Hydrocarbons and sterols as indicators of source and fate of organic matter in sediments from Sepetiba Bay. Rio de Janeiro, *Química Nova*, **32**(7):1805-1811. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000700023>

Chaloux, N., Takada, H., & Bayona, J. M. 1995. Molecular markers in Tokyo Bay sediments: Sources and distribution. *Marine Environmental Research*, **40**(1): 77–92. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)90001-8)

Cordeiro, L.G.S.M., Carreira, R.S., Wagener, A.L.R. 2008. Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southeastern Brazil. *Organic Geochemistry*, **39**(8): 1097–1103. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.02.022>

Da Silva S.M.R., 2006. *A precipitação climática na mesorregião metropolitana de belém e suas implicações socioambientais*. MS Dissertation Universidade Federal do Pará, Belém, 152 p.

- de Abreu-Mota, M.A., de Moura Barboza, C.A., Bícego, M.C., Martins, C.C. 2014. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. *Chemosphere*, **103**: 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.052>
- De Cassia Silva Bacha, D., Santos, S., de Alcantara Mendes, R., da Silva Rocha, C. C., Corrêa, J. A., Cruz, J. C. R., ... Oliva, P. A. C. 2021. Evaluation of the contamination of the soil and water of an open dump in the Amazon Region, Brazil. *Environmental Earth Sciences*, **80**(3): 1-12. <https://doi:10.1007/s12665-021-09401-3>
- de Melo, M.G., da Silva, B.A., Costa, G. de S., da Silva Neto, J.C.A., Soares, P.K., Val, A.L., Chaar, J. da S., Koolen, H.H.F., Bataglioni, G.A. 2019. Sewage contamination of Amazon streams crossing Manaus (Brazil) by sterol biomarkers. *Environmental Pollution*, **244**: 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.055>
- de Oliveira, R.S., Kiyatake, D.M., Harada, M.L., Ribeiro, K.T. 2013. Sanitary quality of the public groundwater supply for the municipality of Belém in Northern Brazil. *Cadernos Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, **21**(4): 377–383.
- Derrien, M., Yang, L., Hur, J. 2017. Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Research*, **112**: 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.023>
- dos Reis Souza, M.R., Santos, E., Suzarte, J.S., do Carmo, L.O., Soares, L.S., Santos, L.G.G.V., Júnior, A.R.V., Krause, L.C., Frena, M., Damasceno, F.C., Huang, Y., da Rosa Alexandre, M. 2020. The impact of anthropogenic activity at the tropical Sergipe-Poxim estuarine system, Northeast Brazil: Fecal indicators. *Marine Pollution Bulletin*, **154**. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111067>
- Dsikowitzky, L., Schäfer, L., Dwiyitno, Ariyani, F., Irianto, H.E., Schwarzbauer, J. 2017. Evidence of massive river pollution in the tropical megacity Jakarta as indicated by faecal steroid occurrence and the seasonal flushing out into the coastal ecosystem. *Environmental Chemistry Letters*. **15**(4): 703–708. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0641-3>
- Dume B, Ayele D, Regassa A, Berecha G (2017) Improving available phosphorus in acidic soil using biochar. *J Soil Sci Environ Manage* 8(4):87-94. doi: 10.5897/jssem2015.0540



- Edokpayi, J.N., Odiyo, J.O., Durowoju, O.S. 2017. Chapter 18: Impact of Wastewater on Surface Water Quality Developing Countries: A Case Study of South Africa. *In*: Tutu, H. (ed.). *Water Quality*, IntechOpen, Rijeka, p. 401-416.
- Fattore, E., Benfenati, E., Marelli, R., Cools, E., Fanelli, R. 1996. Sterols in sediment samples from Venice Lagoon, Italy. *Chemosphere*, **33**(12): 2383-2393. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(96\)00340-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(96)00340-2)
- Figueredo, D.B., Silva, J.A. 2009. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlacao de pearson (R). *Revista Política Hoje*. **18**(1): 115–146.
- Frena, M., Bataglioni, G.A., Tonietto, A.E., Eberlin, M.N., Alexandre, M.R., Madureira, L.A.S. 2016a. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). *Science of the Total Environment*, **544**: 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.137>
- Frena, M., Santos, A.P.S., Santos, E., Silva, R.P., Souza, M.R.R., Madureira, L.A.S., Alexandre, M.R. 2016b. Distribution and sources of sterol biomarkers in sediments collected from a tropical estuary in Northeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(22): 23291–23299. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7744-4>
- Frena, M., Santos, A.P.S., Souza, M.R.R., Carvalho, S.S., Madureira, L.A.S., Alexandre, M.R. 2019. Sterol biomarkers and fecal coliforms in a tropical estuary: Seasonal distribution and sources. *Marine Pollution Bulletin*, **139**: 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.007>
- Frena, M., Souza, M.R.R., Damasceno, F.C., Madureira, L.A.S., Alexandre, M.R. 2016c. Evaluation of anthropogenic contamination using sterol markers in a tropical estuarine system of northeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, **109**(1): 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.022>
- Froehner, S., Martins, R.F., Errera, M.R. 2009. Assessment of fecal sterols in Barigui River sediments in Curitiba, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, **157**(1-4): 591–600. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0559-0>
- Gilbert, J.R., McCaskill, D., Fishman, V.N., Brzak, K., Markham, D., Bartels, M.J., Winniford, B., Bano Mohsin, S., Godbey, J., Akinbo, O., Lewer, P. 2013. Industrial Applications of High-Resolution GC/MS. *Comprehensive Analytical Chemistry*, **61**: 403–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62623-3.00017-4>

- Gomes, H.G., Kawakami, S.K., Taniguchi, S., Filho, P.W.S., Montone, R.C. 2015. Investigation of sewage contamination using steroid indexes in sediments of the Guajará Estuary (Amazon coast, Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, **63**(4): 501–509. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592015097506304>
- Gomes, J. de L., Barbieri, J.C., 2004. Gerenciamento de recursos hídricos no Brasil e no Estado de São Paulo: um novo modelo de política pública. *Cadernos EBAPE.BR*, **2**(3): 1–21. <https://doi.org/10.1590/s1679-39512004000300002>
- Gordon, M.H., 2003. FATS | Classification, in: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier, 2287–2292 p. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00701-X>
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Bayona, J.M., Albaiges, J. 1990. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environmental Science & Technology*, **24**(3): 357–363. <https://doi.org/10.1021/es00073a011>
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H.N., Ellegrd, L., Jessup, W., Jones, P.J., Ltjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Born, J., Catapano, A.L., de Backer, G., Deanfield, J., Descamps, O.S., Kovanen, P.T., Riccardi, G., Tokgzoglu, L., Chapman, M.J. 2014. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, **232**(2): 346-360. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>
- Häder, D.-P., Banaszak, A. T., Villafane, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of The Total Environment*, **713**:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>
- Hatcher, P.G., Keister, L.E., McGillivray, P.A. 1977. Steroids as sewage specific indicators in New York Bight sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **17**:491–498. <https://doi.org/10.1007/BF01685943>
- He, D., Zhang, K., Tang, J., Cui, X., Sun, Y. 2018. Using fecal sterols to assess dynamics of sewage input in sediments along a human-impacted river-estuary system in eastern China. *Science of the Total Environment*, **636**: 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.314>
- Huang, M.Q., Patel, S., John Lin, Z. 2017. Steroid Biomarkers. In: Wen & Jian (ed.). *Targeted Biomarker Quantitation by LC-MS*. John Wiley & Sons, p. 307–319.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2012. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/>. Acesso em: 20 Dec 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html?=&t=o-que-e>. Acesso em: 21 Jan 2020.

Isobe, K.O., Tarao, M., Zakaria, M.P., Chiem, N.H., Minh, L.Y., Takada, H. 2002. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography - Mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environmental Science and Technology*, **36**(21): 4497–4507. <https://doi.org/10.1021/es020556h>

Kebede T, Ademe Y (2016) Evaluating land suitability for irrigation purpose in Abaya district, Borena zone, Ethiopia. *Afr J Agric Res* 11(46):4754-4761. doi: 10.5897/ajar2016.11438

Kitson, F.G., Larsen, B.Seliger., McEwen, C.N. (ed.). 1996. Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide. San Diego, Academic Press, 370 p.

Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., & Nichols, P. 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research*, **30**(12): 2893–2900. [https://doi:10.1016/s0043-1354\(96\)00011-5](https://doi:10.1016/s0043-1354(96)00011-5)

Leeming, R., Bate, N., Hewlett, R., Nichols, P. 1998. Discriminating faecal pollution: A case study of stormwater entering Port Phillip Bay, Australia. *Water Science and Technology*, **38**(10): 15-22. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00728-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00728-8)

Lehninger, Albert L., David L. Nelson, and Michael M. Cox. 2000. Principles of biochemistry. New York, Worth Publishers, 1119p

Lima Da Costa, R., Carreira, R.S. 2005. A comparison between faecal sterols and coliform counts in the investigation of sewage contamination in sediments. *Brazilian Journal of Oceanography*, Rio de Janeiro, **53**(3-4): 157-167.

Lim, F., Ong, S., Hu, J. 2017. Recent Advances in the Use of Chemical Markers for Tracing Wastewater Contamination in Aquatic Environment: A Review. *Water*, **9**(2): 1-26. <https://doi.org/10.3390/w9020143>

- Liyanage, C.P., Yamada, K. 2017. Impact of Population Growth on the Water Quality of Natural Water Bodies. *Sustainability*, **9**(8): 1-14. <https://doi.org/10.3390/su9081405>
- Martins, C.D.C., Cabral, A. C., Barbosa-Cintra, S. C. T., Dauner, A. L. L., & Souza, F. M. 2014. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environmental Pollution*, **188**: 71–80. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.022>
- Martins, C.D.C., Bicego, M.C., Figueira, R.C.L., Angelli, J.L.F., Combi, T., Gallice, W.C., Mansur, A. v., Nardes, E., Rocha, M.L., Wisnieski, E., Ceschim, L.M.M., Ribeiro, A.P. 2012. Multi-molecular markers and metals as tracers of organic matter inputs and contamination status from an Environmental Protection Area in the SW Atlantic (Laranjeiras Bay, Brazil). *Science of the Total Environment*, **417**: 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.086>
- Martins, C.D.C., Braun, J.A.F., Seyffert, B.H., Machado, E.C., Fillmann, G. 2010. Anthropogenic organic matter inputs indicated by sedimentary fecal steroids in a large South American tropical estuary (Paranaguá estuarine system, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, **60**(11): 2137–2143. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.027>
- Martins, C.D.C., Fillmann, G., Montone, R.C. 2007. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **18**(1): 106–115. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100012>
- Martins, C.D.C., Gomes, F.B.A., Ferreira, J.A., Montone, R.C. 2008. Marcadores orgânicos de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da Baía de Santos, São Paulo. *Química Nova*, **31**(5): 1008–1014. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500012>
- Matić Bujagić I, Grujić S, Jauković Z, Laušević M. 2016. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia. *Environmental Pollution*, **213**:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.036>
- Moon, H.B., Yoon S.P., Jung, R.H., Choi, M. 2008. Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. *Chemosphere*, **73**:880–889. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.07.038>

- Moreno, A.S. 2013. *Análise geoquímica de biomarcadores em sedimentos na região de Coari - Amazonas, Brasil*. MS Dissertation, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 177p.
- Morrison, R.T., & Boyd, R.N. 1983. *Organic chemistry* 5. ed. Boston, Allyn and Bacon, 1174 p.
- Mudge, S.M., Seguel, C.G. 1999. Organic contamination Vicente Bay. Chile, *Marine Pollution Bulletin*, 38(11): 1011-1021
- Mudge, S.M., Norris, C.E. 1997. Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): A comparison between fatty alcohols and sterols. *Marine Chemistry*, **57**(1-2): 61–84. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00010-8)
- Muniz, P., Pires-Vanin, A. M. S., Martins, C. C., Montone, R. C., & Bicego, M. C. 2006. Trace metals and organic compounds in the benthic environment of a subtropical embayment (Ubatuba Bay, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, **52**(9): 1098–1105. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.05.0
- Nogarotto, D.C., de Lima, M.R.G., Pozza, S.A. 2020. Análise de componentes principais para verificar relação entre variáveis meteorológicas e a concentração de MP10. *Holos*, **1**: 1–17. <https://doi.org/10.15628/holos.2020.8649>
- Peng, X., Zhang, G., Mai, B., Hu, J., Li, K., & Wang, Z. 2005. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(8):856–865. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.031>
- Pereira, F.V.S., Mendes, R.L.R., Fernandes, L.L., Bello, L.A.L., Duarte, C.K.A. do R. 2018. Potencial do aproveitamento de água de chuva nos municípios de Curuçá e Igarapé Açu no estado do Pará. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, **12**: 7–14.
- Polo, L.M. 2015. *Fundamentos de cromatografia*. Madrid, Dextra Editorial S.L, 412 p.
- Rada, J.P.A., Duarte, A.C., Pato, P., Cachada, A., Carreira, R.S. 2016. Sewage contamination of sediments from two Portuguese Atlantic coastal systems, revealed by fecal sterols. *Marine Pollution Bulletin*, **103**(1-2): 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.010>
- Ranney, R.W. 1969. Organic carbon-organic matter conversion equation for Pennsylvania surface soils. *Soil Science Society of America*, **33**: 809-811.

- Reeves, A.D., Patton, D. 2001. Measuring change in sterol input to estuarine sediments. *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere*, **26**(9): 753–757. [https://doi.org/10.1016/S1464-1909\(01\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S1464-1909(01)00081-8)
- Reichwaldt, E.S., Ho, W.Y., Zhou, W., Ghadouani, A. 2017. Sterols indicate water quality and wastewater treatment efficiency. *Water Research*, **108**: 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.029>
- Řezanka, T., Pádrová, K., Sigler, K. 2016. Derivatization in Gas Chromatography of Lipids. *Encyclopedia of Lipidomics*, 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1\\_71-1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_71-1)
- Ribani, M., Bottoli., C.BG., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, **27**(5):771–780.
- Santos, E. S., Carreira, R. da S., & Knoppers, B. A. 2008. Sedimentary sterols as indicators of environmental conditions in Southeastern Guanabara Bay, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, **56**(2): 97–113. doi:10.1590/s1679-87592008000200003
- Santos de Sousa, T., Leão Bordalo, C.A. 2014. Os impactos socioambientais nos lagos Bolonha e Água Preta: O processo de degradação na reserva do Utinga, localizada em Belém do Pará. In: VII Congresso Brasileiro de Geógrafos, Vitória. Disponível em: [http://www.cbg2014.agb.org.br/resources/anais/1/1404148620\\_ARQUIVO\\_THAYSSASOUS A-ARTIGOCBG.pdf](http://www.cbg2014.agb.org.br/resources/anais/1/1404148620_ARQUIVO_THAYSSASOUS A-ARTIGOCBG.pdf)
- Scott, R.P.W. 1996. *Chromatographic detectors : Design: function, and operation*. New York, Marcel Dekker, 532 p.
- Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C., Toledo, M. 2001. Tracing sewage in the marine environment: Altered signatures in Concepción Bay, Chile. *Water Research*, **35**(17): 4166–4174. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00146-4)
- Shah, V. G., Hugh Dunstan, R., Geary, P. M., Coombes, P., Roberts, T. K., & Von Nagy-Felsobuki, E. 2007. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Research*, **41**(16):3691–3700. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.006>
- Silva, G. M., Rocha, M.Y.T., Albuquerque, A.R.C. 2018. Diagnóstico socioambiental da comunidade do cresso, Manaus/Amazonas. *Geoambiente On-line*, Goiânia, **32**: 1-14.

Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/geoambiente/article/view/48606>. Acesso em: 8 jun. 2022.

Soares E.A. & Tatumi S.H. 2010. OSL age determinations of pleistocenefluvial deposits in Central Amazonia. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82 (3): 691-699. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v82n3/17.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2011.

Simoneit, B.R.T. 2004. Biomarkers (molecular fossils) as geochemical indicators of life. *Advances in Space Research*, 33(8): 1255–1261. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2003.04.045>

Singh, P., Milishna, Y., Tian, K., Gusain, D., Bassin, J.P. (ed.). 2020. Water conservation and wastewater treatment in BRICS nations : technologies, challenges, strategies and policies. Amsterdam, Elsevier, 364 p.

Siqueira, G., Aprile, F., Darwich, A., Santos, V., Menezes, B. 2016. Environmental Diagnostic of the Aurá River Basin (Pará, Brazil): Water Pollution by Uncontrolled Landfill Waste. *Archives of Current Research International*, 5: 1–13. <https://doi.org/10.9734/acri/2016/28249>

Siqueira, G.W., Aprile, F. 2013. Avaliação de risco ambiental por contaminação metálica e material orgânico em sedimentos da bacia do Rio Aurá, Região Metropolitana de Belém-PA. *Acta Amazonica*, 43: 51–62.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2008. Principles of instrumental analysis, 6th ed. Belmont, Thomson Brooks/Cole, 1056 p.

Sojinu, S.O., Sonibare, O.O., Ekundayo, O., Zeng, E.Y. 2012. Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with fecal sterols and n-alkanes as indicators. *Science of the Total Environment*, 44: 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.015>

Sousa, L., Carneiro, C.S., Mendes, R., Corrêa M.J.A. 2020. PAH Profiles in Suspended Particulate Matter from an Urbanized River Within the Brazilian Amazon. Belém, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 105(1): 86-94.

Sparkman, O.D., Penton, Z., Kitson, F.G. 2011. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-17039-3>

- Stauffer, E. 2013. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition* 596–602. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00249-X>
- Steinbrenner, R.M.A., Brito, R. de S., Castro, E.R. de. 2020. Lixo, racismo e injustiça ambiental na Região Metropolitana de Belém. *Cadernos Metrópole*, **22**: 935–961. <https://doi.org/10.1590/2236-9996.2020-4912>
- Stefens J.L. 2006. *Caracterização Molecular de Compostos Biogênicos e Antropogênicos em Sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ)*. MS Dissertation Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127 p.
- Suguio, K. 1973. Introdução à sedimentologia. Edgard Blucher/EDUSP, Sao Paulo, 317 p.
- Sullivan, D., Brooks, P., Tindale, N., Chapman, S., & Ahmed, W. 2010. Faecal sterols analysis for the identification of human faecal pollution in a non-sewered catchment. *Water Science and Technology*, **61**(5), 1355–1361. doi:10.2166/wst.2010.227
- Takada, H., Farrington, J. W., Bothner, M. H., Johnson, C. G., & Tripp, B. W. 1994. Transport of Sludge-Derived Organic Pollutants to Deep-Sea Sediments at Deep Water Dump Site 106. *Environmental Science & Technology*, **28**(6): 1062–1072.
- Thomes, M.W., Vaezzadeh, V., Zakaria, M.P., Bong, C.W. 2019. Use of sterols and linear alkylbenzenes as molecular markers of sewage pollution in Southeast Asia. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**: 31555–31580. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05936-y>
- Volkman, J.K. 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry*, **9**(2): 83-89.
- Volkman JK. 2005. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry*, **36**:139–159. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.06.013>
- Volkman, J.K. 2006. Lipid Markers for Marine Organic Matter, in: Volkman J.K. (ed.). *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, p. 27–70. [https://doi.org/10.1007/698\\_2\\_002](https://doi.org/10.1007/698_2_002)
- Volkman, J.K., Revill, A.T., Holdsworth, D.G., Fredericks, D. 2008. Organic matter sources in an enclosed coastal inlet assessed using lipid biomarkers and stable isotopes. *Organic Geochemistry*, **39**:689–710. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.02.014>



Wang, Z., Jocelyn Paré, J.R. 1997. Chapter 3 Gas chromatography (GC): Principles and applications, in: Paré, J.R.J & Bélanger, J.M.R (ed.). *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Ottawa, 61–91 p. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80012-1)

Wen, X., Bai, Y., Zhang, S., Ding, A., Zheng, L., Li, J., 2020. Distributions and Sources of Sedimentary Sterols as well as Their Indications of Sewage Contamination in the Guanting Reservoir, Beijing. *Journal of Chemistry*, **2020**: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/3050687>

Writer, J.H., Leenheer, J. A., Barber, L. B., Amy, G. L., & Chapra, S. C. 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Water Research*, **29**(6), 1427–1436. doi:10.1016/0043-1354(94)00304-p

Yao, X., Lu, J., Liu, Z., Ran, D., & Huang, Y. 2013. Distribution of sterols and the sources of pollution in surface sediments of Ulungur lake, Xinjiang. *Water Science and Technology*, **67**(10), 2342–2349. <https://doi:10.2166/wst.2013.107>

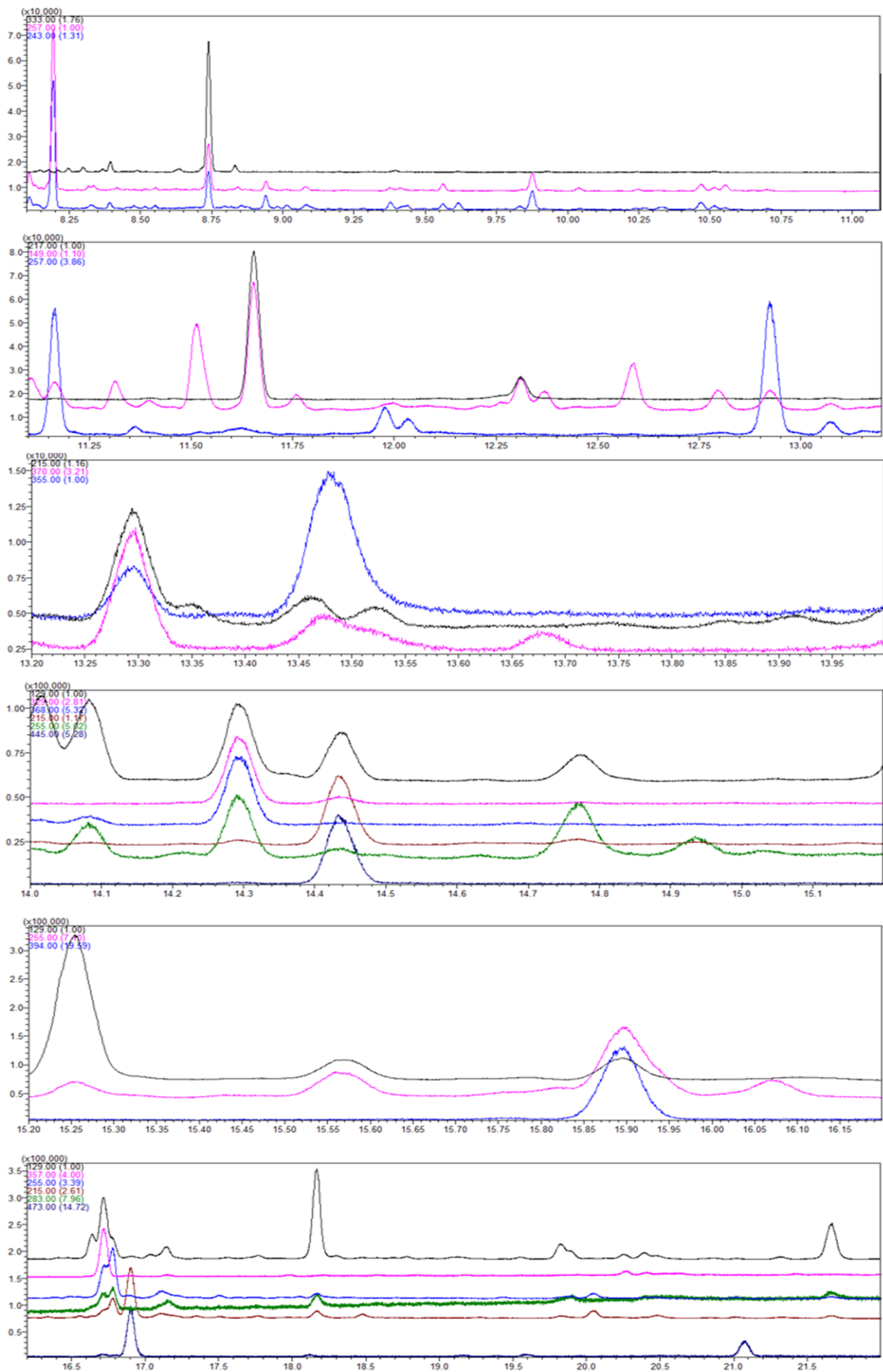
Zhang, C., Wang, Y., Qi, S., 2008. Identification and significance of sterols in MSW landfill leachate. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **874**(1-2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.08.014>

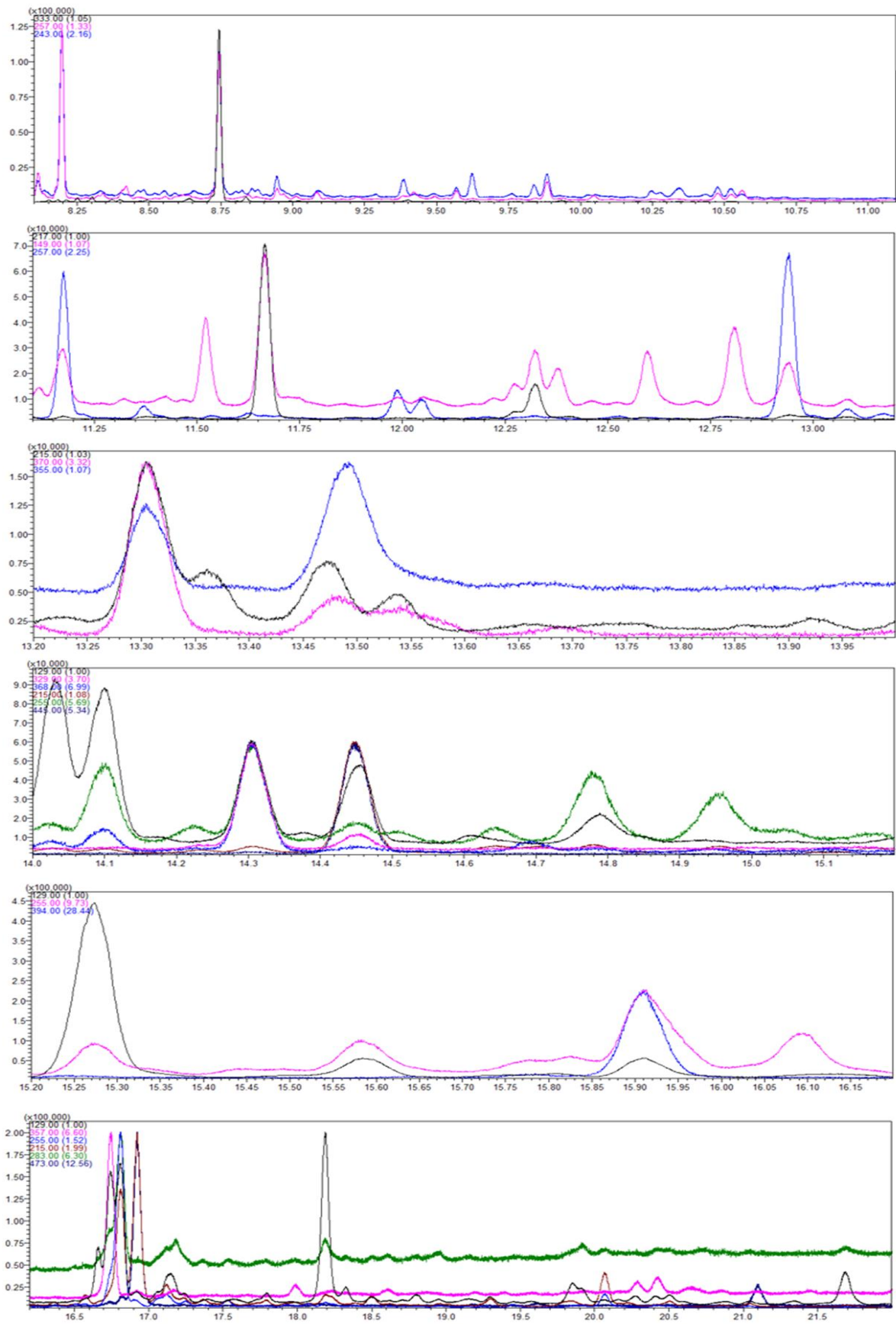
## ANEXOS

### ANEXO A – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS ANALITOS ESTUDADOS

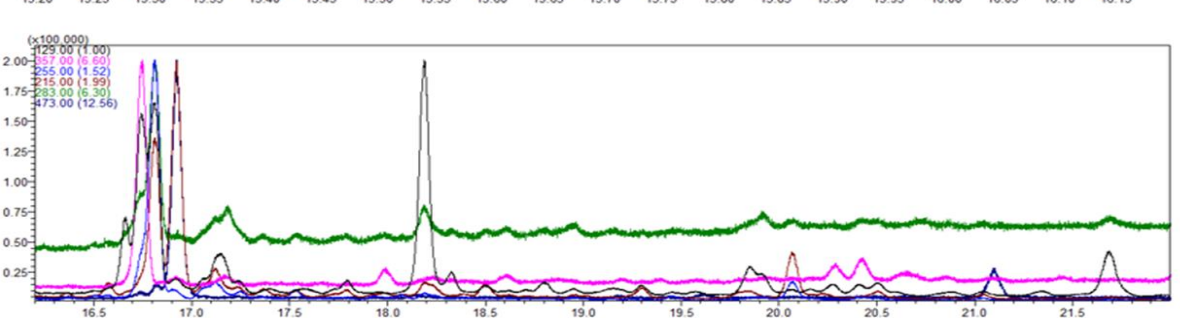
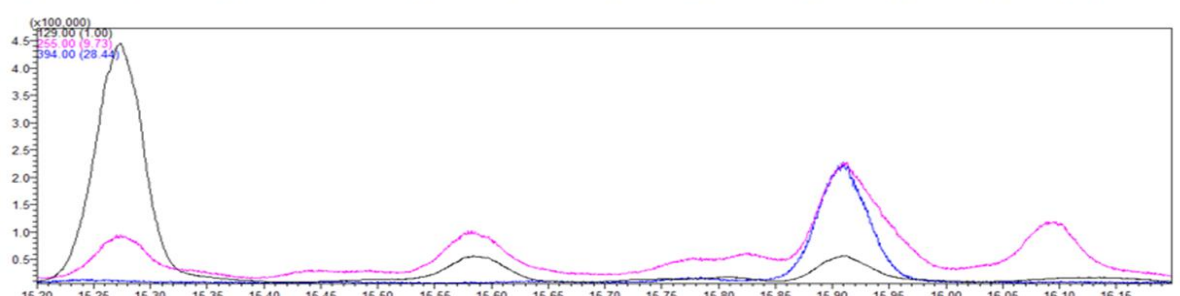
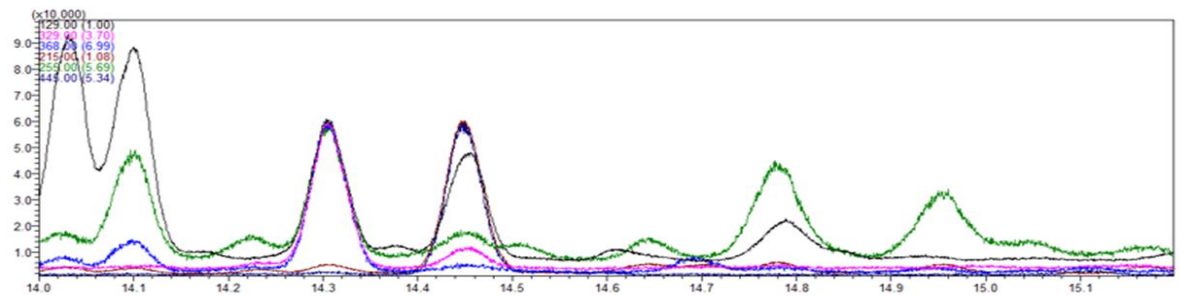
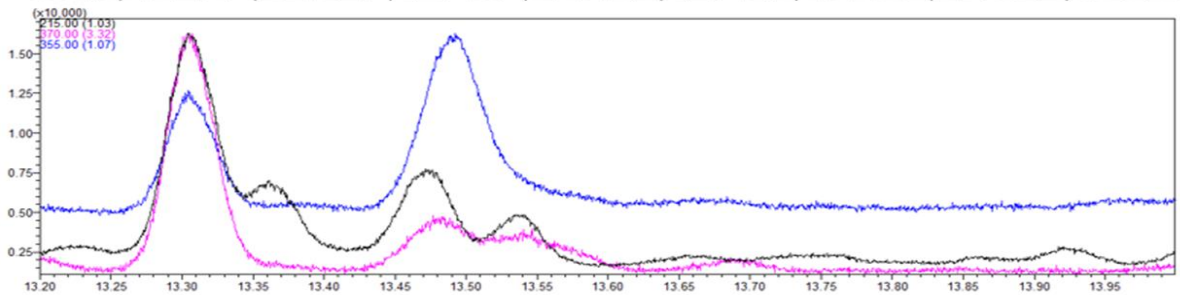
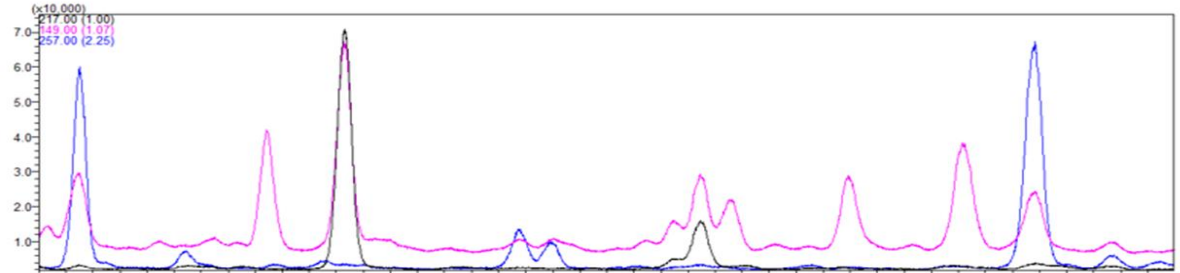
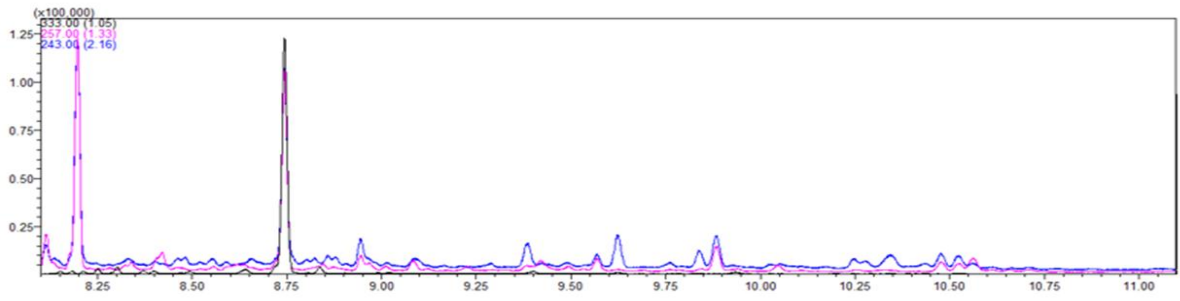
<b>Analito</b>	<b>TR (min)</b>
Androstanol	8,739
5- $\alpha$ -Colestano	11,658
Coprostanol	13,472
Colesterol	14,293
Colestanol	14,439
Stigmasterol	15,892
$\beta$ -Sitosterol	16,785



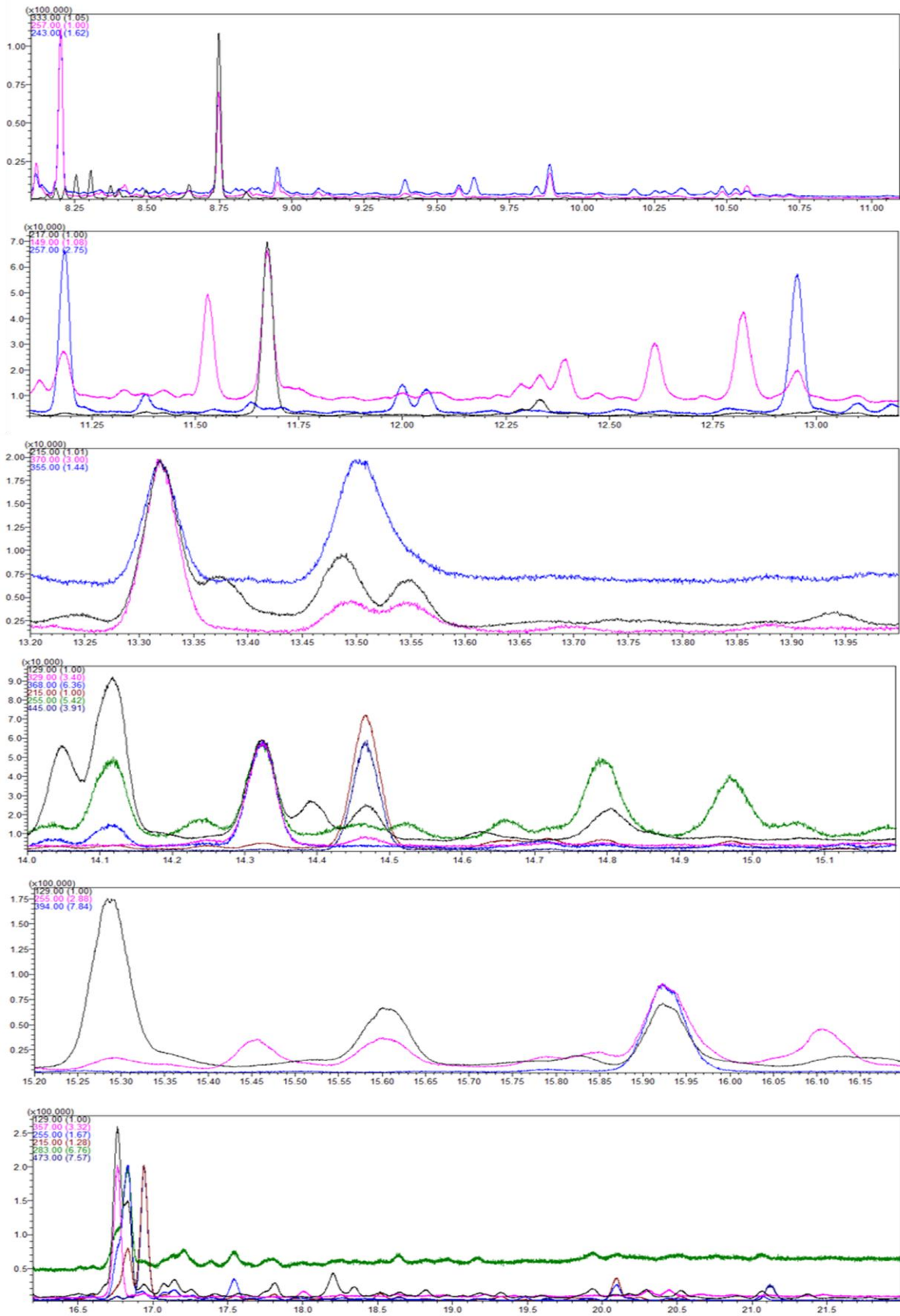
*Amostra P2*

*Amostra P3*

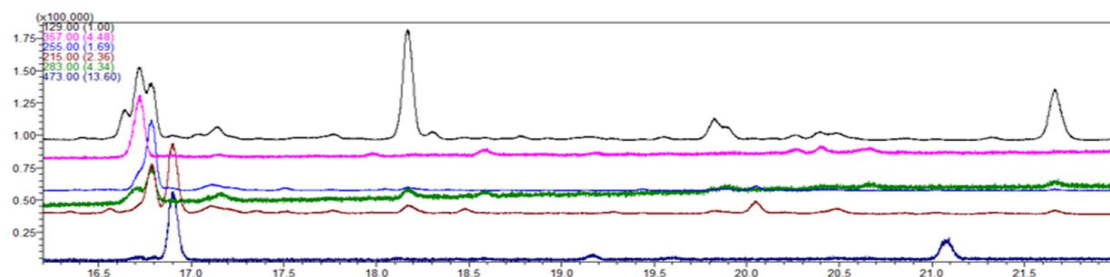
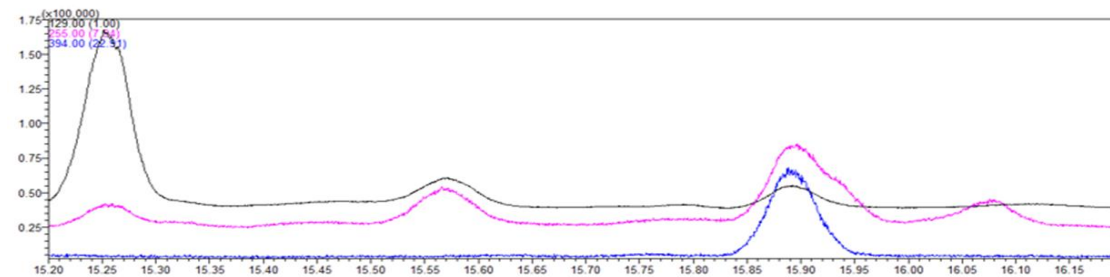
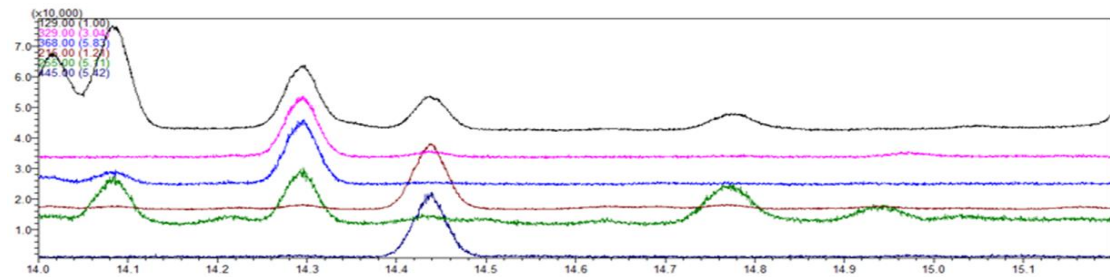
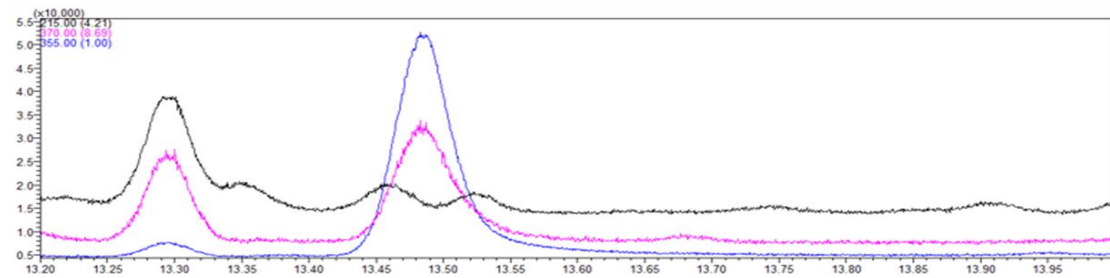
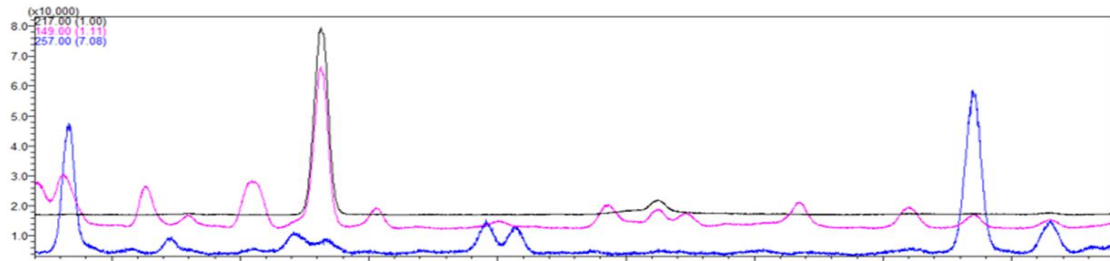
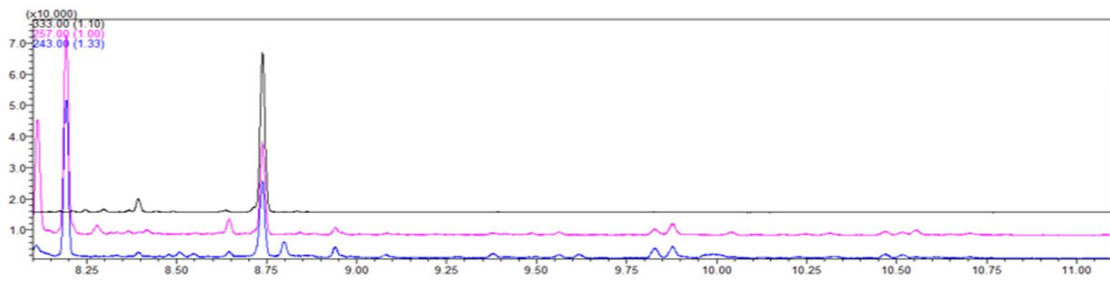
*Amostra P3*



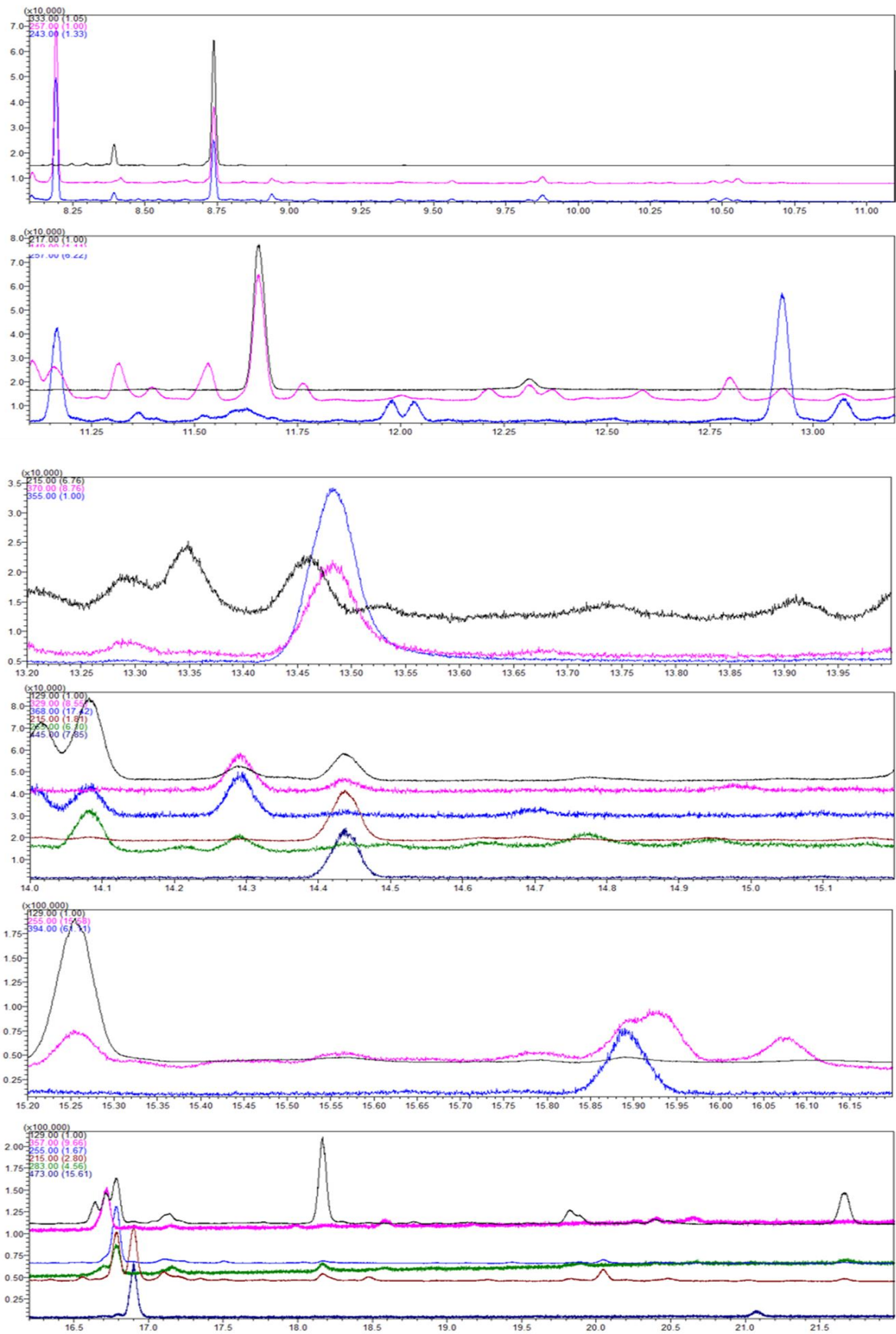
## Amostra P4





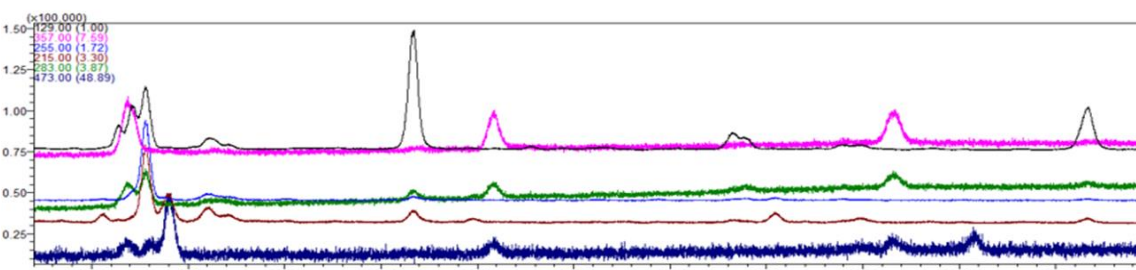
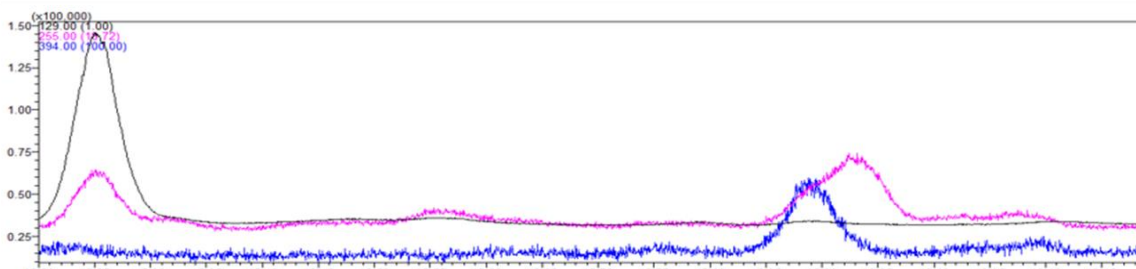
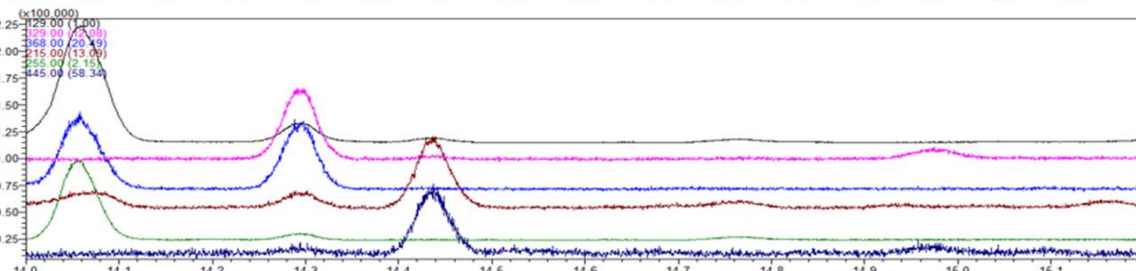
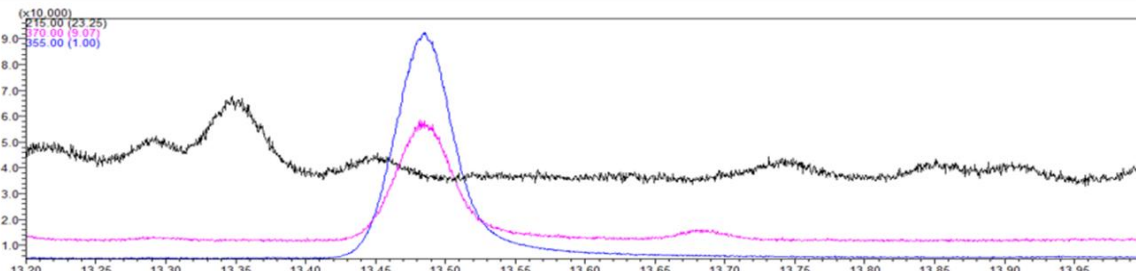
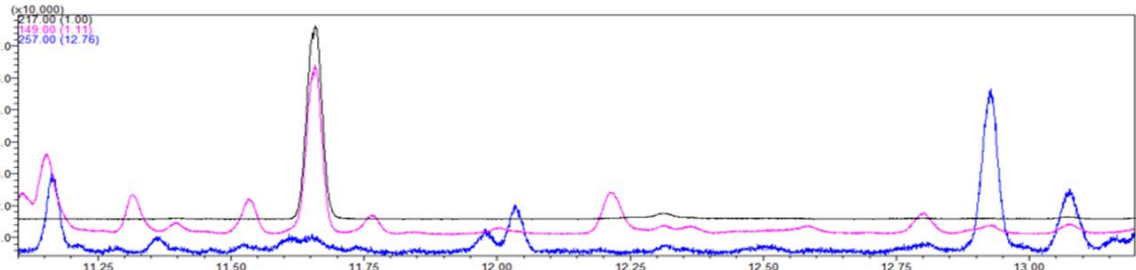
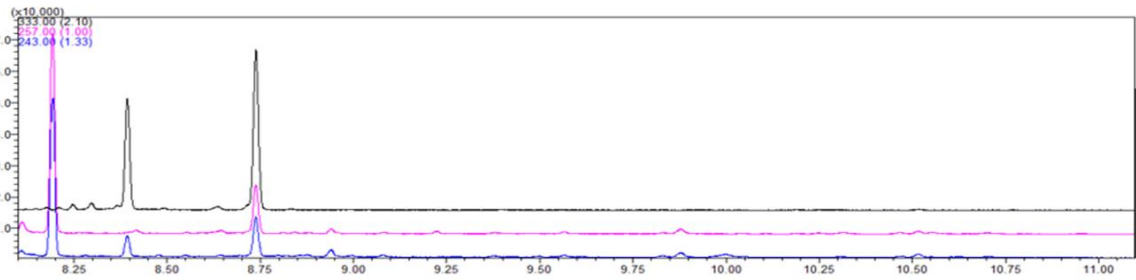
*Amostra P5*

*Amostra P6*

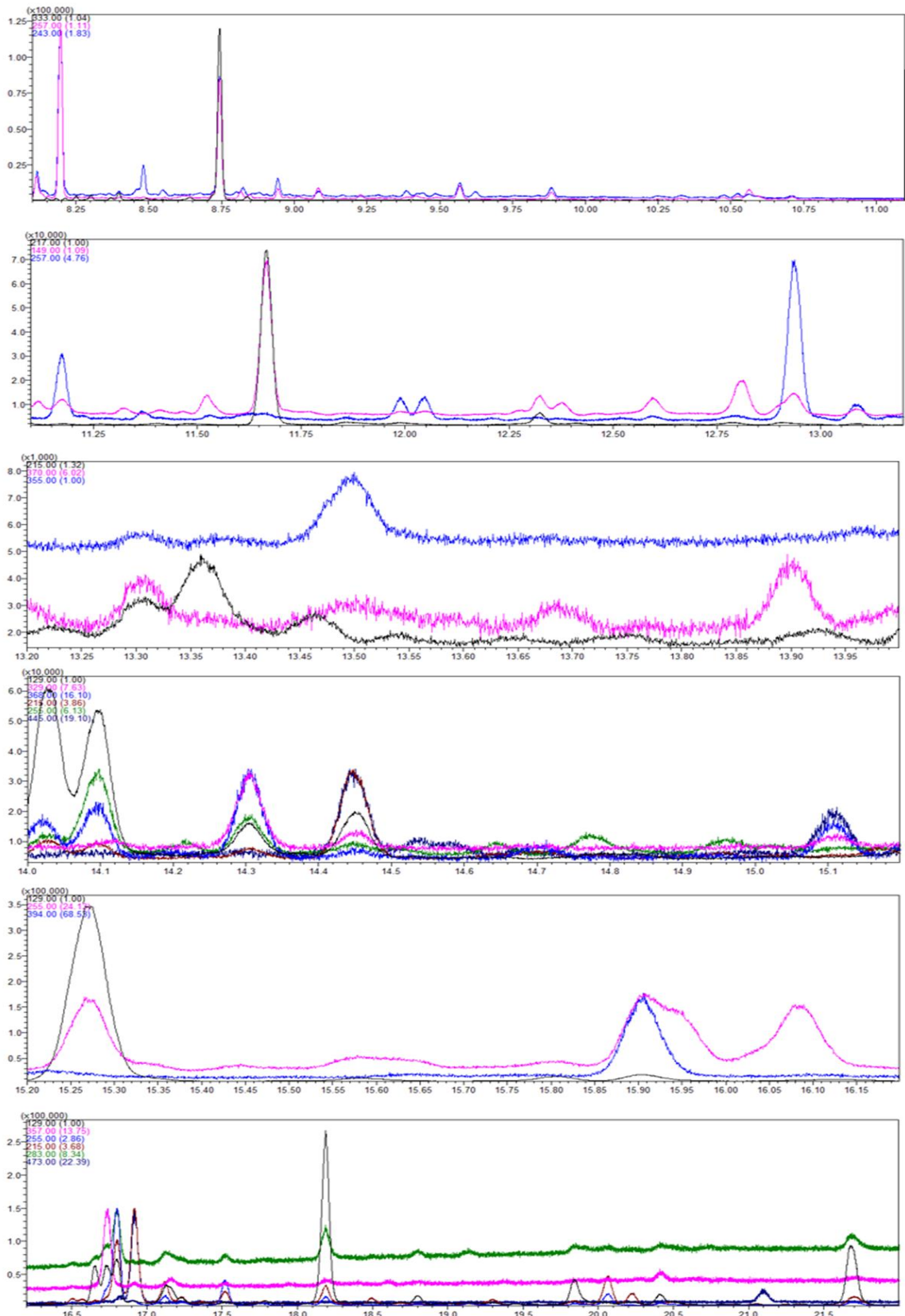




*Amostra P7*





*Amostra P9*

**ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO RESULTANTE  
DESTE TRABALHO DE MESTRADO**

**Environmental Science and Pollution Research**

**A sterol marker assessment of anthropogenic pollution in surface sediments from an  
urbanized Amazon River (Northern Brazil)**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	A sterol marker assessment of anthropogenic pollution in surface sediments from an urbanized Amazon River (Northern Brazil)
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Keywords:</b>	Sterol markers; surface sediments; organic pollution, domestic riverine sewage; ecological and human health risk; Amazonian aquatic systems
<b>Corresponding Author:</b>	Jorge Hernando Agudelo Morales Universidade Federal do Pará Belem, PA BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Pará
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Jorge Hernando Agudelo Morales
<b>First Author Secondary Information:</b>	