

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química

Avaliação da Decomposição de *Spartina alterniflora* Loisel. com
Relação à Perda de Massa, Teor de Nitrogênio e Composição
Lipídica, na Enseada de Ratones, Ilha de Santa Catarina/SC

Alexandre Nunes Villela

Florianópolis, 2003

Avaliação da Decomposição de *Spartina alterniflora* Loisel. com
Relação à Perda de Massa, Teor de Nitrogênio e Composição
Lipídica, na Enseada de Ratonés, Ilha de Santa Catarina/SC

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de mestre em química analítica.

Alexandre Nunes Villela

Florianópolis, 2003

Avaliação da Decomposição de *Spartina alterniflora* Loisel. com Relação à Perda de Massa, Teor de Nitrogênio e Composição Lipídica, na Enseada de Ratonés, Ilha de Santa Catarina/SC

Alexandre Nunes Villela

Dissertação julgada e aprovada, em sua forma final, pelo orientador e membros da banca examinadora.

Coordenador do curso

Dr. Faruk José Nome Aguilera
Departamento de Química - UFSC

Orientador

Dr. Eduardo Juan Soriano-Sierra
Núcleo de Estudos do Mar – UFSC

Banca examinadora

Dr. Sérgio Antônio Netto
Lab. de Ciências Marinhas - UNISUL

Dr^a. Vilma Edite Fonseca Heinzen
Departamento de Química - UFSC

Dr. Luiz A. dos Santos Madureira
Departamento de Química - UFSC

À Vó Elcy,
que não chegou a ver a conclusão deste projeto.

Prefácio

Bom, cheguei aqui. Mas na verdade esse é só o primeiro passo no sentido de onde realmente quero ir.

A vontade de trabalhar com ecologia, pela química, é antiga. O interesse pela ecologia é, no entanto, mais ainda. Talvez me acompanhe há mais de 10 anos.

Por ter fé e saber que só estou aqui graças à Ele, agradeço a Deus em primeiro lugar, por tudo. O mestrado é só uma pequena parte...

Já estava na química havia anos e já não achava mais os caminhos que tinham me levado até ela. Um dia, em um papo com meu pai, provavelmente na praia, ele insistiu para que eu fizesse uma matéria eletiva da analítica, química marinha. Obrigado pai por ter me mostrado, novamente, as trilhas a serem percorridas. Na verdade, obrigado família, por tudo. Em especial mãe e pai, por terem me dado as condições de chegar até aqui.

Daí então, entrou a Cristina... Obrigado Cristina, por me ter feito decidir novamente pelos caminhos, ou melhor, pelas águas da química marinha.

Neste momento, agradeço ao Eduardo por ter aceito o projeto e provido os recursos financeiros necessários. Obrigado CAPES, pelo apoio financeiro.

Na verdade, o importante é que,

Há muito tempo que eu saí de casa

Há muito tempo que eu caí na estrada

Há muito tempo que eu estou na vida

Foi assim que eu quis

E assim eu sou feliz.

E nessa, cada vez mais,

Aprendi que se depende sempre

De tanta muita diferente gente

Toda pessoa sempre é as marcas

Das lições diárias de outras tantas pessoas.

Em boa parte dessa estrada, tem uma pessoa, uma deliciosa companheira, me estimulando, caminhando e, sem saber, viabilizando a realização de todos os meus sonhos. Dani, obrigado!

Bom, então à essa tanta muita diferente gente, nem um pouco menos importante por isso,

Graça; Cláudio, Roberto e restante do pessoal da Estação Ecológica de Carijós; Vanessa; Fabrício, Madureira, Sandro, Renato e todo o pessoal do laboratório 216 e anexo, anfitriões como poucos; amigos de perto e de longe; Tião; Nair; pessoal da Central de Análises; Rogério, Fran, Buch & Cia.; Paulo & Ale; funcionários do Departamento de Química, xerox do CFM e biblioteca setorial; Luciano, Roseane e pessoal do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, que cumprem melhor que encomenda o papel de universidade para a comunidade; Cris e Thiago; pessoal do Laboratório Físico, Químico e Biológico da CIDASC; Trebien; CASAN; professores de lá e de cá que deixaram saudades; bons colegas, também de lá e de cá que deixaram ou deixarão saudades,

muito obrigado!

Alexandre,
com o apoio fundamental de
Gonzaguinha (1945-1991).

Resumo

A decomposição de *Spartina alterniflora* Loisel. foi estudada em uma marisma da enseada de Ratonas, Ilha de Santa Catarina, SC. A enseada se localiza na porção noroeste da ilha, entre as coordenadas 27°27'-27°29'S e 48°32'-48°33'O. A metodologia dos sacos de decomposição foi utilizada. Determinou-se as variações de massa e teor de cinzas do material em decomposição ao longo do tempo. O modelo exponencial simples linearizado ($\ln \text{PSSC}_t / \text{PSSC}_0 = m \cdot t$) foi ajustado aos dados da perda de massa, com relação ao peso seco sem cinzas, ao longo do tempo. Desta maneira, a constante de decaimento (k) do material foi determinada e a meia-vida (τ), calculada. Os resultados foram, respectivamente, $91 \cdot 10^{-4} \text{ dias}^{-1}$ e 76 dias. A variação do teor de nitrogênio do material em decomposição ao longo do tempo foi determinada. Os resultados apresentam o perfil de uma diminuição inicial rápida, seguida de um aumento gradativo. Este aumento do teor de nitrogênio do material em decomposição é atribuído à incorporação de nitrogênio dissolvido e à fixação de nitrogênio, por parte da comunidade microbiana colonizadora. Estes resultados, aliados aos dados de perda de massa, evidenciam as três fases da degradação de detritos, que são: perda de compostos solúveis nos primeiros 10–14 dias; degradação microbiana e, fragmentação ou consumo por heterótrofos maiores. Em termos qualitativos, foram identificadas as seguintes classes lipídicas: álcoois; ácidos graxos; ácidos graxos hidroxilados e, esteróis. Foi identificado ainda, um fenol de cinamila. No entanto, somente parte dos lipídios identificados foi quantificada. Os lipídios quantificados foram: ácidos 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e metóxi cinâmico e, álcool-C32. Atribuiu-se a presença destes lipídios à *Spartina alterniflora*. A geração de dados sobre a marisma estudada é importante por contribuir com a compreensão das similaridades globais desses ecossistemas, bem como suas especificidades locais.

Abstract

The decomposition of *Spartina alterniflora* Loisel. was studied in a saltmarsh at the estuary of Ratonnes river, Santa Catarina's Island, SC. The estuary is situated at the Northwest region of the island, at 27°27'-27°29'S and 48°32'-48°33'W. The litter bags methodology was used. The changes of mass and ash content of the material submitted to decomposition with time, were determined. The simple exponential model, in its linear form ($\ln AFDW_t / AFDW_0 = -kt$), was adjusted to the data of mass' loss, with respect to ash free dry weight, over time. By doing so, the decaying constant (k) of the material was determined and the half-life (τ), calculated. The results were, respectively, $91 \cdot 10^{-4} \text{ days}^{-1}$ and 76 days. The change of the nitrogen content of the decomposing matter over time, was determined. The results show a profile of a fast initial decrease, followed by a slow increase. This increase of the nitrogen content of the material under decomposition is believed to be due to an incorporation of dissolved nitrogen and to a fixation of nitrogen, by the colonising microbial community. These results, together with the mass' loss data, make the three phases of detritus' decomposition evident, which are: leaching of soluble components in the first 10-14 days; microbial degradation and, fragmentation or consumption by larger heterotrophs. Qualitatively, the following classes of lipids were identified: alcohols; fatty acids; hydroxy fatty acids and, sterols. Yet, a cinnamyl phenol was identified. Nevertheless, only part of the identified lipids was quantified. The quantified lipids were: acids 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 and methoxy cinnamic and, alcohol-C32. It is believed that these lipids were derived from *Spartina alterniflora*. The data's generation concerning the studied saltmarsh is important as it contributes for the comprehension of the global similarities of these ecosystems, as well as their local specificities.

Índice

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Notação	xv
Introdução	1
. Marismas	1
. <i>Spartina alterniflora</i>	3
. Base das teias alimentares das marismas	4
. Formas de avaliação do processo de decomposição	5
. Lipídios e sua ocorrência	6
. Contribuição de fontes externas e alteração dos teores de lipídios na decomposição	7
. Objetivo geral	9
. Objetivos específicos	9
Parte Experimental	10
. Coleta de <i>Spartina alterniflora</i> e experimento de decomposição	10
. Tratamento das amostras no laboratório e determinação do peso seco	11
. Preparação das amostras e determinação do teor de cinzas	12
. Determinação do teor de nitrogênio	13
. Extração e preparação dos lipídios para análise	14
. Identificação e análise quantitativa dos lipídios	16
Tratamento dos Dados	18
. Peso seco	18
. Teor de cinzas	19
. Peso seco sem cinzas	20
. Teor de nitrogênio	21
. Lipídios	22
Resultados e Discussão	25
. Peso seco	25
. Teor de cinzas	27

. Peso seco sem cinzas	28
. Teor de nitrogênio	32
. Lipídios	34
Considerações Finais	43
Recomendações	45
Referências Bibliográficas	46
Anexo 1	50
Anexo 2	54
Anexo 3	70

Lista de Figuras

1. Localização geográfica da enseada de Ratonés, Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	2
2. Vista da marisma estudada na enseada de Ratonés e localização do experimento.	3
3. Variação da área do pico referente ao androstanol contra o tempo.	23
4. Variação da área do pico referente ao colestano contra o tempo.	23
5. Variação do PS com o processo de decomposição.	26
6. Variação do teor de cinzas ao longo do processo de decomposição de <i>S. alterniflora</i> .	27
7. Variação do PSSC ao longo do processo de decomposição de <i>S. alterniflora</i> .	29
8. Dados experimentais de PSSC, contra o tempo, linearizados e reta ajustada.	30
9. Variação do teor de N com relação ao PSSC no processo de decomposição de <i>S. alterniflora</i> .	32
10. Variação da concentração dos ácidos 14:0, 16:0, 18:0 e 20:0 ao longo do processo de decomposição. A escala da esquerda é válida para o ác. 16:0 e a da direita, para os demais.	38
11. Variação da concentração dos ácidos 15:0 e 17:0 ao longo do processo de decomposição.	38
12. Variação da concentração do ác. MeO Cin. e álcool-C32 ao longo do processo de decomposição.	39
13. Cromatograma da amostra t_3 . Os picos referentes aos ácidos 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e metóxi cinâmico, álcool-C32 e padrão usado na quantificação, são indicados.	50
14. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do dotriacontanol, ou álcool-C32, e sua estrutura química.	51
15. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do ácido α -hidróxi lignocérico, ou 2-OH-24:0, metilado, bem como sua estrutura química.	51

16. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do ácido ω -hidróxi palmítico, ou 16-OH-16:0, metilado, bem como sua estrutura química.	52
17. Espectro de massas e estrutura do éster metílico do ácido palmítico, ou 16:0.	52
18. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do 5-sitosten-3-ol, ou $C_{29}\Delta^5$, bem como sua estrutura química.	53
19. Espectro de massas do éster metílico do ácido metóxi cinâmico e suas possíveis estruturas, em função da incerteza da localização da metoxila e da trimetil-siloxila.	53
20. Variação mensal da umidade relativa do ar em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	70
21. Variação mensal das temperaturas do ar média, mínima e máxima em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	71
22. Variação mensal da velocidade média do vento máximo em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	71
23. Variação mensal da altura pluviométrica (mm) em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	72
24. Variação mensal na distribuição das horas de insolação em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	72
25. Variação mensal dos valores médios da amplitude de marés em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	73
26. Variação mensal da evaporação (mm) em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.	73

Lista de Tabelas

1. Valores do PS ao longo da decomposição.	25
2. Teores de cinzas ao longo da decomposição.	27
3. Valores do peso seco sem cinzas ao longo da decomposição.	28
4. Variação dos dados do peso seco sem cinzas linearizados ao longo da decomposição.	30
5. Valores dos teores de nitrogênio, com relação ao peso seco sem cinzas, do material em decomposição de <i>S. alterniflora</i> .	32
6. Valores das concentrações dos lipídios na decomposição de <i>S. alterniflora</i> .	37
7. Dados obtidos para a determinação do peso seco.	54
8. Determinação da incerteza da balança analítica para a primeira série de pesagens.	55
9. Determinação da incerteza da balança analítica para a segunda série de pesagens.	55
10. Dados obtidos para a determinação do teor de cinzas.	56
11. Cálculos para a obtenção do peso seco sem cinzas.	57
12. Padronização da solução 1 de ácido clorídrico.	58
13. Padronização da solução 2 de ácido clorídrico.	58
14. Dados obtidos para avaliar a contribuição de nitrogênio devido ao solvente, papel e reagentes usados.	59
15. Dados obtidos para verificação da exatidão do método, com relação a ausência de perda de sais de amônio.	59
16. Dados obtidos para a determinação do teor de nitrogênio.	60
17. Preparação da solução-padrão de 5 α -colestano.	61
18. Áreas e tempos de retenção dos picos referentes à contaminações e padrões.	62
19. Determinação da incerteza associada às áreas obtidas por cromatografia a gás.	63
20. Escolha do padrão para a determinação quantitativa dos teores de lipídio.	63

21. Determinação da incerteza da razão A_i/A_p .	64
22. Determinação da incerteza da balança analítica.	64
23. Massas das amostras usadas nas análises de lipídios.	65
24. Dados obtidos para a amostra do t_0 .	66
25. Dados obtidos para a amostra do t_1 .	66
26. Dados obtidos para a amostra do t_2 .	67
27. Dados obtidos para a amostra do t_3 .	67
28. Dados obtidos para a amostra do t_4 .	68
29. Dados obtidos para a amostra do t_5 .	68
30. Dados obtidos para a amostra do t_6 .	69

Notação

A	fração do material vegetal em decomposição lábil ou mais facilmente decomposta, no modelo matemático exponencial duplo; área de um pico, em análises feitas por cromatografia a gás; designação de um dos quatro anéis dos esteróis
álcool-Ci	álcool com i átomos de carbono na cadeia hidrocarbônica
anteiso	tipo de ácido graxo saturado mono-ramificado que apresenta a ramificação em uma posição qualquer da cadeia hidrocarbônica, que não a vizinha ao carbono terminal
b	expoente da variável independente na equação usada para o cálculo do ajuste do modelo cinético aos resultados experimentais pelo método dos mínimos quadrados; coeficiente linear na expressão usada para o cálculo do ajuste do modelo cinético linearizado aos resultados experimentais pelo método dos mínimos quadrados
B	designação de um dos quatro anéis dos esteróis
c	constante na equação usada para o cálculo do ajuste do modelo cinético aos resultados experimentais pelo método dos mínimos quadrados
$C_i\Delta^j$ e $C_i\Delta^{i,l}$	esteróis, sendo: i, o número de átomos de carbono do esterol e, j e l, as posições das insaturações
D	designação de um dos quatro anéis dos esteróis
$f(x,y)$	função de x e y
i:j	ácidos graxos de cadeia normal ou ramificada, sendo: i, o número de átomos de carbono da cadeia hidrocarbônica e, j, o número de insaturações
i-OH-j:l	ácidos graxos hidroxilados, sendo: i, a posição do grupamento hidroxila; j, o número de átomos de carbono da cadeia hidrocarbônica e, l, o número de insaturações

<i>iso</i>	tipo de ácido graxo saturado mono-ramificado que apresenta a ramificação no carbono vizinho ao carbono terminal da cadeia hidrocarbônica
<i>k</i>	constante de decaimento
M e m	massa; coeficiente angular na expressão usada para o cálculo do ajuste do modelo cinético linearizado aos resultados experimentais pelo método dos mínimos quadrados
m/z	razão massa/carga, em espectrometria de massas
PA, PB e PC	no ambiente, pontos entre os quais o experimento foi distribuído
R ²	quadrado do coeficiente de correlação
t _i	coletas; t ₀ se referindo ao material vegetal usado no experimento de decomposição
x, y e z	variáveis
α	na cadeia hidrocarbônica, carbono adjacente ao grupamento funcional; em estereoquímica de esteróis, as ligações que se afastam do plano da molécula, com relação ao observador, para trás
β	na cadeia hidrocarbônica, carbono subsequente ao carbono α; em estereoquímica de esteróis, as ligações que saem do plano da molécula no sentido do observador
δx, δy e δz	incertezas associadas à x, y e z, respectivamente
τ	tempo de meia-vida
ω	carbono terminal da cadeia hidrocarbônica
[M] ⁺	em espectrometria de massas, íon molecular
[M-i]	em espectrometria de massas, fragmento relativo ao pico do íon molecular com perda de i u.m.a
[M-q] ⁺	em espectrometria de massas, fragmento relativo ao pico do íon molecular com perda da parte q da molécula
[q] ⁺	em espectrometria de massas, fragmento relativo à parte q da molécula
% p/p	percentual peso/peso
% p/v	percentual peso/volume

Sobre e subscritos

and	androstanol
i, j, l, m e n	índices numéricos; no caso de i, lipídio
k, k1 e k2	constantes de decaimento
p	padrão
t	momento qualquer do experimento de decomposição; tempo
0	momento inicial do experimento de decomposição

Abreviações

ác. MeO cin.	ácido metóxi cinâmico
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoro acetamida
CG	cromatógrafo a gás
CG-EM	cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas
CL	cadeia lateral
Conc.	concentração
FID	sigla, em inglês, para detector por ionização em chama
GPS	Global Positioning System
Loisel.	Loiseleur
Me	metila
PS	peso seco
PSSC	peso seco sem cinzas
t	tempo
TMSi	trimetil-silila
S.	<i>Spartina</i>

Introdução

Marismas

As marismas constituem ecossistemas costeiros caracterizados pela presença de vegetação herbácea sujeita a inundação periódica, como resultado de variações no nível do corpo de água salina adjacente (Adam, 1990). O seu desenvolvimento é melhor em um meio abrigado e com baixa energia de ondas, facilitando o acúmulo de sedimentos finamente particulados, que permitem o estabelecimento das raízes das gramíneas de marisma e seu crescimento (Alongi, 1998). Tais condições podem ser encontradas em estuários, que são constituídos da interface entre o mar e a terra firme, onde as águas de ambos os sistemas se misturam (Cordazzo e Seeliger, 1988). Ainda, as marismas se desenvolvem melhor em latitudes altas (Alongi, 1998), onde, por conta das temperaturas mais baixas do que nas zonas tropicais e subtropicais, não há a presença de manguezais densos (Costa e Davy, 1992).

Teal (1962) estimou em 45%, a remoção da produção de marismas pelas marés. Isto aconteceria antes que os consumidores das marismas tivessem a chance de usá-la. Hoje, acredita-se que, embora a maior parte das marismas exporte material, muitas outras não o fazem (Alongi, 1998). Segundo este autor, algumas marismas são retentores de matéria orgânica. De qualquer forma, em termos tróficos e energéticos, as marismas estão ligadas aos ecossistemas costeiros adjacentes de muitas maneiras (Alongi, 1998).

As marismas representam recursos valiosos por múltiplas razões ecológicas e econômicas, uma vez que propiciam: habitat para diversas espécies estuarinas e marinhas; controle de inundação, movimento de tempestades e erosão costeira; atuam como filtro para nutrientes, poluentes e alguns patógenos e, constituem áreas para recreação e educação (Alongi, 1998).

A marisma estudada se localiza na enseada de Ratoes, entre as coordenadas 27°27' - 27°29' S e 48°32' - 48°33' O, na porção noroeste da Ilha de Santa Catarina, Brasil. Este estuário recebe aporte de sedimentos trazidos em parte pelo mar, através de marés e correntes litorâneas e, de outra parte pelas águas

continentais dos rios Ratoes e Veríssimo, principais formadores da enseada (Bussolo Jr., 2002). A figura 1 mostra a localização geográfica da área de estudo.

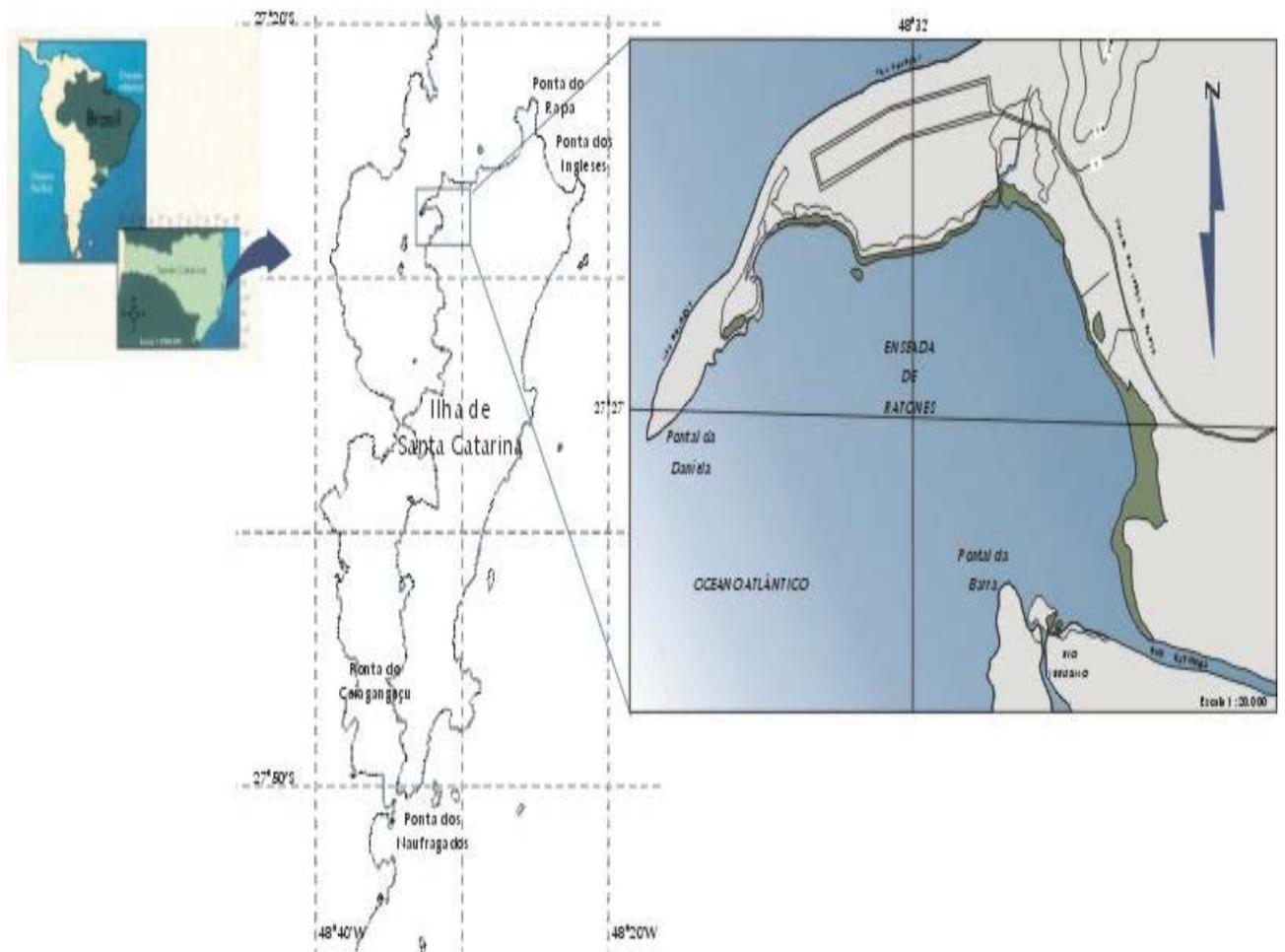


Figura 1. Localização geográfica da enseada de Ratoes, Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

Spartina alterniflora

Spartina alterniflora Loisel. pertence a família Gramineae e é vernacularmente chamada de capim-praturá. A espécie apresenta diversidade morfométrica, sendo conhecidas duas formas, uma “curta” e outra “longa”. É a espécie pioneira das marismas da costa Atlântica, onde é a planta mais frequente, não sofrendo competição com nenhuma outra espécie em locais de águas salgadas (Cordazzo e Seeliger, 1988). No sul do Brasil, *Spartina alterniflora* Loisel. floresce entre fevereiro e maio (Reitz, 1981).



Figura 2. Vista da marisma estudada na enseada de Ratoles e localização do experimento.

Base das teias alimentares das marismas

Segundo Alongi (1998), em adição às gramíneas, macroalgas, microalgas bênticas, fitoplâncton, epífitas e neuston também contribuem para a produção primária dos ecossistemas de marisma. Em alguns sistemas, estes autótrofos podem ser responsáveis por mais da metade da produção primária (Alongi, 1998).

Dadas as condições extremas de grandes variações de salinidade, temperatura e exposição, a fauna de marismas apresenta baixa diversidade de espécies (Teal, 1962). A herbivoria pode ter um impacto indireto grande na produção primária, entre outros, pela danificação ou mortalidade das sementes, raízes e folhas e, remoção de novos indivíduos em potencial pela predação de sementes (Alongi, 1998). No entanto, apenas uma pequena parte da produção de *Spartina* é consumida diretamente por herbívoros (Pomeroy e Wiegert, 1981).

Antes de *Spartina* se disponibilizar para a maior parte dos consumidores das marisma, deve ser decomposta por processos físicos e biológicos (Squires e Good, 1974). Segundo Burkholder e Bornside (1957), bactérias heterotróficas aeróbicas participam desta decomposição. Segundo Alongi (1998), adicionalmente à estas, outras bactérias e comunidades fúngicas e de protozoários também atuam na degradação de *Spartina*.

Embora, provavelmente, haja um considerável consumo direto dos detritos com pouca, ou nenhuma modificação microbiana, uma parte destes detritos ricos em microorganismos é utilizada por vários consumidores (Alongi, 1998). Segundo este autor, a decomposição dos detritos ocorre nas seguintes fases: perda de compostos solúveis (açúcares, taninos simples,...) durante os primeiros 10-14 dias; degradação microbiana, causada, em sua maioria, por hidrólise mediada por enzimas extracelulares liberadas pelos microorganismos e, fragmentação ou consumo por heterótrofos maiores.

Segundo Alongi (1998), embora as cadeias alimentares pelágicas e bênticas em marismas sejam abastecidas por material vegetal morto e vivo, acredita-se que muitos organismos complementem seu sustento com várias micro e macroalgas, de forma a obter uma dieta balanceada. Ainda assim, os detritos de marismas constituem a principal fonte de energia e carbono para os organismos decompositores, que processam este material, governam a ciclagem e troca de

nutrientes e, o fluxo energético entre esses sistemas e as águas costeiras adjacentes (Alongi, 1998).

Os biodetritos imobilizam grandes quantidades de nitrogênio de fontes externas. Isto sugere que, embora o nitrogênio do material vegetal em decomposição possa se perder na marisma, uma quantidade substancial de nitrogênio não-vegetal pode ser sequestrado e retido nos detritos, tornando-se disponível para novo crescimento vegetal na primavera e verão seguintes (White e Howes, 1994).

Formas de avaliação do processo de decomposição

Buth e De Wolf (1985), Panitz (1986) e Soriano-Sierra (1992) estudaram o processo de decomposição de espécies do gênero *Spartina* em ambientes de marisma. Análises elementares, como de nitrogênio por exemplo, de compostos orgânicos e determinação das taxas de decomposição foram feitas. As análises do material em decomposição realizadas por Squires e Good (1974) revelam teores de proteína equivalentes ou até maiores do que em amostras de plantas vivas. Segundo os autores, o aumento dos teores de nitrogênio em amostras de detritos de solos, está ligado ao surgimento de uma fauna microbiana rica que assimila nitrogênio do ambiente, bem como usa nitrogênio protéico vegetal.

O acondicionamento de material foliar em sacos de decomposição com o objetivo de simular o processo de decomposição natural é uma técnica usual (Buth e De Wolf, 1985; Soriano-Sierra, 1992). Em estudos que utilizam esta técnica, a análise mais apropriada para determinar as constantes de decaimento é o ajuste de modelos matemáticos aos dados experimentais (Wieder e Lang, 1982). Dentre os vários modelos possíveis, os exponenciais simples e duplo são os que melhor descrevem a perda de massa com o tempo e ainda fornecem informações sobre a biologia do processo de decomposição (Wieder e Lang, 1982). Tais modelos são descritos pelas seguintes equações:

$$M_t = M_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$M_t = A e^{-k_1 t} + (1-A) e^{-k_2 t} \quad (2)$$

que representam, respectivamente, os modelos simples e duplo, sendo: M_t , a massa restante em um momento qualquer do experimento; M_0 , a massa inicial; k , k_1 e k_2 , as constantes de decaimento e, A , a fração lábil ou mais facilmente decomposta (Wieder e Lang, 1982). No entanto, estes autores acreditam que a não consideração da possibilidade de conversão de compostos lábeis em materiais recalcitrantes, como pode ocorrer durante a síntese de biomassa microbiana, seja um ponto desfavorável ao modelo exponencial duplo (Wieder e Lang, 1982).

Lipídios e sua ocorrência

Segundo revisão feita por Brondz (2002), há mais de uma definição para lipídios. Contudo, nenhuma delas é totalmente inclusiva. Na definição mais abrangente, os lipídios são definidos como sendo óleos imobilizados, gorduras e graxas. No entanto, esta definição exclui lipopolissacarídeos, lipoproteínas, glicerofosfolipídios, glicoglicerolipídios e compostos afins e, esfingolipídios, que também são lipídios.

Os ácidos graxos hidroxilados, que constituem uma classe de lipídios, podem ser encontrados na natureza nas formas saturada ou insaturada, em cadeias hidrocarbônicas normais ou ramificadas (Brondz, 2002). As posições possíveis do grupamento hidroxila são α ou C_2 , β ou C_3 , ω ou carbono terminal da cadeia hidrocarbônica (oposto ao grupamento carboxila) e $(\omega-1)$. Goosens *et al.* (1986) atribuem os ácidos β -hidroxilados, que se encontram ligados por meio de ligações químicas lábeis por ataque ácido, à bactérias.

Segundo Brondz (2002), muitos dos ácidos graxos saturados de cadeia normal são amplamente distribuídos na natureza e, com frequência encontrados nas bactérias. Existem três tipos de ácidos graxos saturados mono-ramificados (Brondz, 2002), sendo eles: a série *iso*, com fórmula $(CH_3)_2CH(CH_2)_nCOOH$; a série *anteiso*, com fórmula $CH_3CH_2CHCH_3-(CH_2)_nCOOH$ e, a série *anteiso* que apresenta ramificação no meio da cadeia, com fórmula $CH_3(CH_2)_nCHCH_3(CH_2)_mCOOH$. No sedimento entremarés, existem também os ácidos graxos mono-insaturados, sendo os de isomeria *trans*, preferencialmente de bactérias (Volkman *et al.*, 1980). Estes autores identificaram os ácidos graxos C_{16} poli-insaturados com insaturação na

posição 7, como sendo biomarcadores específicos de algas verdes. Volkman *et al.* (1980) identificaram ácidos graxos em culturas de diatomáceas, algas verdes e bactérias heterotróficas totais, cultivadas a partir do sedimento. Estes autores identificaram diversos ácidos, sendo alguns dos saturados: 14:0, 15:0, 16:0, 17:0 e 18:0; ramificados: *iso* e *anteiso* 15:0 no caso das diatomáceas e bactérias heterotróficas totais, que também apresentam *iso* 14:0, *iso* 16:0, *iso* 17:0 e *anteiso* 17:0; diversos mono-insaturados e diversos poli-insaturados no caso das diatomáceas e algas verdes. No entanto, as bactérias heterotróficas totais não apresentaram ácidos poli-insaturados.

A revisão feita por Volkman (1986), mostra que os esteróis podem ser originários de vários organismos diferentes. Algas unicelulares de diversos gêneros podem sintetizar esteróis, como: $C_{27}\Delta^5$, $C_{28}\Delta^5$, $C_{29}\Delta^5$, $C_{28}\Delta^{5,22}$, $C_{29}\Delta^{5,22}$, $C_{28}\Delta^{5,24}$ e $C_{29}\Delta^{5,24}$. Segundo sua revisão, existem muito poucos dados para inferir que um esterol em particular seja característico de uma determinada classe de algas. Uma possível exceção à isso, contudo, é o dinosterol, que parece ser um biomarcador confiável para os dinoflagelados.

Contribuição de fontes externas e alteração dos teores de lipídios na decomposição

Os lipídios bacterianos podem ser usados para estimar a quantidade de matéria orgânica devida às bactérias. Ainda, as bactérias não só contribuem com os seus próprios metabólitos, mas também alteram a característica da matéria orgânica presente por transformações diagenéticas mediadas por micróbios (Canuel e Martens, 1993). Os metabólitos primários ou secundários, que podem ser usados como biomarcadores, fornecem uma fonte melhor de informação do que parâmetros como teor de nitrogênio, por exemplo. Entretanto, o uso de biomarcadores é limitado pelo desconhecimento da natureza de alguns; dificuldades em corrigir os efeitos de processos diagenéticos e informações limitadas da composição de organismos vivos (Canuel e Martens, 1993).

Após quatro meses de decomposição de *Spartina alterniflora*, Schultz e Quinn (1973) observaram que a composição de ácidos graxos era consideravelmente

diferente da inicial. De Leeuw *et al.* (1995) também observaram que a macrófita marinha, *Zostera marina* L., em decomposição apresenta uma composição lipídica diferente do que a da espécie viva. Estes autores observaram ainda, um aumento nos teores dos ácidos β e ω -hidroxilados e, α,ω -di-hidroxilados, com a decomposição. De Leeuw *et al.* (1995), portanto, atribuem estes lipídios à bactérias ou à transformação bacteriana.

Como o trabalho de Goosens *et al.* (1986) indicou que os ácidos hidroxilados *iso*, *anteiso* e, especialmente, os que têm ramificações incomuns não são tão facilmente encontrados, eles podem ser valiosos marcadores de distintos grupos bacterianos. Com os dados quantitativos dos lipídios bacterianos, pode-se inferir quanto à biomassa microbiana, já que a atividade bacteriana tende a aumentar o teor de lipídios devido à estes organismos (Kawamura *et al.*, 1987).

De acordo com Volkman (1986), a distinção entre os esteróis derivados de plantas vasculares e os de fitoplâncton marinho é uma tarefa difícil. Uma alternativa é determinar a razão dos três esteróis: $C_{28}\Delta^5$, $C_{29}\Delta^{5,22}$ e $C_{29}\Delta^5$. Quando o teor de $C_{29}\Delta^5$ for menor do que o dos outros dois, pode-se ter confiança de que a contribuição de algas (marinhas ou não) é importante. Outra alternativa para verificar se os esteróis são de origem marinha é procurar por esteróis com cadeias laterais incomuns. Entretanto, a melhor forma de equacionar o problema é usar biomarcadores de outras classes lipídicas, que não a dos esteróis. Como exemplo, podem ser usados ácidos hidroxilados e dicarboxílicos, β -dicetonas, alcanos de cadeia longa apresentando grande desproporção de cadeias com número ímpar de átomos de carbono, entre outros (Volkman, 1986).

Embora leveduras, fungos e bactérias anaeróbicas também componham a comunidade microbiana, são responsáveis somente por uma pequena parte da inserção de lipídios no sedimento. As contribuições significativas são dadas pelas diatomáceas e bactérias aeróbicas (Volkman *et al.*, 1980). Estes autores sugerem que a identificação de biomarcadores e a análise da razão percentual dos dados de composição, sejam técnicas úteis na elucidação das contribuições relativas das diversas fontes às classes lipídicas do sedimento.

Objetivo geral

Estudar a decomposição de *Spartina alterniflora* em marisma da enseada de Ratonés, com base em parâmetros químicos.

Objetivos específicos

1. Determinar a taxa de decomposição de *Spartina alterniflora* no ambiente estudado;
2. Determinar a variação do teor de nitrogênio do material em decomposição com o tempo;
3. Analisar o conteúdo lipídico do material em decomposição.

Parte Experimental

Coleta de Spartina alterniflora e experimento de decomposição

No dia 05 de março, final do verão de 2001, 2 kg (peso seco) de biomassa epígea de *Spartina alterniflora* viva foram coletados em uma marisma da enseada de Ratoles, nas coordenadas: 27°27,180' S e 48°31,915' O. No laboratório do Núcleo de Estudos do Mar/UFSC, coordenado pelo professor Eduardo Sierra, as folhas e os colmos da gramínea foram cortados em pedaços de 15-20 cm, secos a 50-60°C até obtenção de peso constante e acondicionados em sacos de decomposição. Estes sacos foram feitos de tela de nylon branca com 1 mm de abertura e medindo pouco menos de 25 x 20 cm. Em cada saco, foram acondicionados (20 ± 1) g de material.

Os sacos de decomposição foram identificados com fita plástica para roturadora e, na enseada de Ratoles, distribuídos em três pontos: PA (27°27,708' S - 48°31,151' O), PB (27°27,700' S - 48°31,141' O) e PC (27°27,689' S - 48°31,127' O), distantes 23 m entre si, no interior da marisma, em área circadiariamente inundada. Os três pontos, PA, PB e PC, se encontravam aproximadamente equidistantes do limite inferior do banco de marisma. Contudo, havia uma grande diferença entre eles com relação à frequência e duração das inundações à que estavam sujeitos, sendo: PA, ponto que se encontrava em nível mais baixo, ficando inundado por mais tempo; PB, ponto que se encontrava em nível intermediário e, PC, ponto que se encontrava em nível mais alto, ficando exudado por mais tempo. Em cada um dos pontos, os sacos foram presos por meio de fios de nylon a estacas de bambu, enterradas no substrato. Este acondicionamento dos sacos no ambiente se deu no dia 20 de abril de 2001. A cada coleta, seis sacos escolhidos ao acaso foram retirados do ambiente, sendo que dois de cada um dos pontos PA, PB e PC. As coletas foram feitas nos dias 27 de abril (t_1), 04 de maio (t_2), 17 de maio (t_3), 19 de junho (t_4), 11 de setembro (t_5) e 13 de novembro (t_6) de 2001. Portanto, as coletas se deram, respectivamente, 7, 14, 27, 60, 144 e 207 dias após o início do experimento. O t_0 se refere ao material vegetal usado no experimento, ou seja, sem ter sido submetido à decomposição. Para o transporte ao laboratório e acondicionamento até o momento do processamento das amostras, os sacos eram

aconicionados em frascos de vidro. Água do ambiente também era coletada em frascos de vidro.

A gramínea era sempre manipulada por meio de luvas plásticas, rinçadas previamente com água. A rinçagem das luvas era feita para minimizar a contaminação das amostras por ftalato. Os vidros para as coletas de água e sacos de decomposição eram previamente lavados no laboratório com solução de detergente Detertec, soda alcoólica (hidróxido de sódio em álcool comercial e água) 10% p/v, solução de ácido clorídrico 5-10% p/v e água deionizada. À volta do campo, tanto os frascos que continham os sacos de decomposição, quanto os que continham água do ambiente, eram guardados em refrigerador até o momento do processamento das amostras. Este processamento era realizado em até dois dias. O aparelho de Global Positioning System (GPS) utilizado foi um AccuNav Sport da Eagle, com incerteza de 100 m. A precisão, que poderia ser de 15 m, é propositalmente piorada para usos civis pela “Disponibilidade Seletiva”.

Tratamento das amostras no laboratório e determinação do peso seco

Nos laboratórios do Núcleo de Estudos do Mar/UFSC, coordenado pelo professor Eduardo Sierra, o conteúdo de cada saco de decomposição foi lavado cuidadosamente com, no máximo, 2-2,5 L de água coletada no ambiente. Adicionalmente, com o objetivo de reduzir a grande quantidade de sedimento agregado, os sacos coletados no t_5 e t_6 sofreram um procedimento suave de pré-lavagem no campo. Durante a lavagem, coletava-se a fauna contida nos sacos de decomposição em uma peneira de 0,5 mm de abertura (resultados não apresentados neste trabalho). As amostras foram então acondicionadas em bandejas metálicas e, secas por semanas, a aproximadamente 55°C, até obtenção de peso constante.

As amostras foram então agrupadas duas a duas e de maneira a se ter triplicata do material em quantidade suficiente para as análises pretendidas. Este agrupamento foi feito no seguinte formato: uma amostra do PA com uma do PB, uma amostra do PB com uma do PC e uma amostra do PA com uma do PC. A exceção foi o t_3 , em que foram agrupadas duas amostras do PA com duas do PB e uma do

PB com uma do PC. Neste momento e quando era o caso, a fauna que se encontrava junto ao material seco era retirada.

O peso seco (PS) foi determinado pela pesagem de cada amostra seca em balança de prato externo. As amostras eram sempre manipuladas por meio de luvas plásticas rinçadas previamente com água e, secas com papel-toalha.

Preparação das amostras e determinação do teor de cinzas

As amostras foram moídas no Laboratório de Solo, Água e Tecidos Vegetais do Departamento de Engenharia Rural do CCA/UFSC, coordenado pelo professor Darci Trebien e no Laboratório Físico, Químico e Biológico da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina – CIDASC, coordenado pelo químico Clóvis De Bem. Para tal, foi usado um moinho para tecidos vegetais com peneira de 1 mm de abertura. Para que não houvesse contaminação, a primeira parte das amostras moída era descartada. A limpeza prévia do moinho foi feita com álcool comercial. Depois, as amostras eram transferidas e guardadas em frascos do tipo “snap-cap”, que eram envoltos em papel-alumínio para evitar reações fotoquímicas. Estes frascos haviam sido lavados da mesma forma que os frascos de vidro usados nas coletas. As moagens se davam no mesmo dia em que as amostras eram retiradas da estufa para a determinação do peso seco.

As determinações dos teores de cinzas foram feitas, nos laboratórios do Núcleo de Estudos do Mar/UFSC, coordenado pelo professor Eduardo Sierra, segundo o procedimento descrito por Buth e De Wolf (1985) e conforme as recomendações de Williams (1984). Em cada análise, (100 ± 1) mg de amostra foram submetidos a 550°C por uma hora. Do mufla, os cadinhos eram diretamente transferidos para um dessecador e, depois da temperatura ambiente ser atingida, eram pesados. A balança analítica usada foi uma Sartorius GMBH Göttingen modelo 2434. Entre 12 e 24 horas antes do início das determinações, as amostras foram secas novamente em estufa a temperatura de $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$, por períodos entre 40 e 90 minutos. A incerteza da balança foi determinada pela utilização de brancos em triplicata ao início e término de cada série de análises. A lavagem dos cadinhos de porcelana era feita com: solução de Detertec, solução de HCl 5-10% p/v, enxágue,

rinçagem com água deionizada e aquecimento a 550°C por uma hora. Os cadinhos eram manipulados com pinças e eram transferidos do mufla diretamente para o dessecador.

Determinação do teor de nitrogênio

A determinação do teor de nitrogênio das amostras foi feita no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CCA/UFSC, coordenado pela professora Roseane Fett. O apoio para a preparação e realização das determinações foi dado pelo técnico em química Luciano Gonzaga e sua equipe do Laboratório de Físico-Química do mesmo departamento. O método utilizado foi o Kjeldahl, que quantifica N-orgânico e N-amoniacoal (Franson, 1998). Foi feita uma digestão ácida das amostras em um tubo de vidro. Para tal, foram misturados (2,00 ± 0,01) g de mistura catalítica (3,6 g de selenito de sódio, 4,0 g de sulfato de cobre e 48,5 g de sulfato de sódio), (0,60 ± 0,03) g de amostra e aproximadamente 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os papéis usados nas pesagens também foram adicionados à mistura. O tubo contendo a mistura era deixado em repouso de um dia para o outro com um funil simples em sua boca, com o intuito de minimizar a perda de analito. A partir daí, a mistura era aquecida em bloco digestor à temperatura de 350-380°C, geralmente por 3,5-4 horas. A temperatura era, na realidade, determinada pela razão ácido/sais. As balanças utilizadas foram Metler-Toledo AB 2045 e Shangping FA 2004, ambas com incertezas estimadas em 1mg. Com o objetivo de evitar a perda de analito (NH₄⁺) e depois da temperatura ter baixado, a mistura era ligeiramente diluída com água destilada pela rinçagem das paredes do tubo e da parte inferior do funil.

A destilação da amônia por arraste a vapor foi feita em destiladores de nitrogênio da marca Tecnal. Para a alcalinização do meio, utilizou-se solução de hidróxido de sódio 50% p/v e como solução absorvente, uma mistura de ácido bórico 4% p/v e dois indicadores: verde de bromocresol e vermelho de metila, ambos em concentração de 0,1% p/v. A quantificação do analito foi feita por meio de análise titrimétrica, em que o íon borato formado pela absorção de amônia na solução de ácido bórico (Ayres, 1978) era titulado com o uso de solução-padrão de ácido

clorídrico. A padronização da solução de HCl foi feita contra o padrão-primário carbonato de sódio, com alaranjado de metila como indicador. Foram feitos também positivos e brancos em triplicata. Os positivos foram feitos para que se tivesse noção da exatidão do método com relação aos sais de amônio presentes. Segundo a metodologia descrita em Cunniff (1999), foi utilizada uma mistura de $(0,850 \pm 0,001)$ g de sacarose e $(0,120 \pm 0,003)$ g de sulfato de amônio. Foram utilizados sacarose da marca Lafan, com grau de pureza PA e sulfato de amônio da Vetec (lote 972223), também com grau de pureza PA.

Extração e preparação dos lipídios para análise

A extração e preparação dos lipídios para análise foram feitas no Laboratório de Química Ambiental e Geoquímica Orgânica do Departamento de Química do CFM/UFSC, coordenado pelos professores Luiz Madureira e Marta Sierra. A extração foi feita segundo o procedimento descrito em Rodrigues Neto (1998). Aos tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo $(0,50 \pm 0,01)$ g de amostra adicionou-se as seguintes soluções-padrão: (40 ± 2) μL de solução (605 ± 9) mg L^{-1} de 5α -androstano- 3β -ol em tolueno, (40 ± 2) μL de solução (896 ± 9) mg L^{-1} de 5α -colestano em tolueno e (80 ± 4) μL de solução aproximadamente 500 mg L^{-1} de hexadecano deuterado. Para o cálculo das concentrações das soluções-padrão, suas densidades foram consideradas como sendo iguais às do tolueno puro ($0,865$ g cm^{-3}) e a incerteza da balança analítica Metler-Toledo modelo AT21 foi estimada em $0,01$ mg. Por pesagens de brancos em triplicata ao início e fim da pesagem das amostras, a incerteza da balança analítica da marca Bel Engineering foi determinada como sendo igual a $0,3$ mg.

Aos tubos de ensaio foi adicionada a mistura metanol/clorofórmio (1:1) até um volume total de aproximadamente três vezes o da amostra. Os tubos foram então agitados em agitador de tubos e postos no ultra-som por vinte minutos. O aparelho de ultra-som utilizado foi um Unique, modelo USC 1450, com frequência de 25 kHz e potência de 54 W. Os conjuntos foram então centrifugados e, por meio de pipetas Pasteur, as fases foram separadas. Este procedimento foi feito por um total de três vezes e os sobrenadantes foram combinados. A mistura solvente foi eliminada em

evaporador rotatório. O resíduo da evaporação foi transferido para tubo de ensaio, também de tampa rosqueada, por meio de quatro adições sucessivas de 1 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio seguidas de agitação. A mistura solvente foi eliminada por meio de fluxo de nitrogênio. Os solventes e gás utilizados foram os seguintes: metanol da Tedia (lote 006020) com grau de pureza HPLC/Spectro e da Carlo Erba Reagenti (lote V1G368091G) com grau de pureza Plus for HPLC; clorofórmio da Carlo Erba Reagenti (lote V5F299285F) com grau de pureza para HPLC e nitrogênio 4.6 da White Martins (lote 7764/02). Por fim, os volumes dos solventes indicados acima são aproximados devido às adições terem sido feitas com pipetas Pasteur.

A metilação foi feita pela adição de 1 mL de tolueno ao extrato sem solvente. Posteriormente, aproximadamente 2,5 mL de solução de cloreto de acetila em metanol foram adicionados à solução dos lipídios. A atmosfera do tubo reacional foi alterada com fluxo de nitrogênio e a mistura, posta na estufa a 50-60°C ao longo da noite. A solução de metilação foi feita pela adição, sob agitação constante e em banho de gelo, de 1 mL de cloreto de acetila a 10 mL de metanol gelado. Foi tomado cuidado nesta etapa para que projeções fossem evitadas. O solvente e o reagente utilizados foram os seguintes: tolueno da Tedia (lote 803030), com grau de pureza Absolvente e, cloreto de acetila da Fluka (lote 395377/1 43899), com grau de pureza Puriss. PA. Novamente, os volumes dos solventes e misturas reacionais indicados acima são aproximados, devido às adições terem sido feitas com pipetas Pasteur.

A recuperação dos lipídios metilados do meio reacional foi feita pela redução do volume do meio reacional com fluxo de nitrogênio, seguido da adição de 1 mL de solução aquosa de cloreto de potássio 10% p/p e 1 mL de clorofórmio. A extração dos produtos reacionais indesejados era feita em agitador de tubos. Depois, a mistura era centrifugada para auxiliar a separação de fases. Este procedimento, a menos da adição da solução de cloreto de potássio, era repetido por mais duas vezes com cada amostra e, as fases orgânicas eram secas e combinadas. A secagem da fase orgânica era feita por meio de uma coluna de sulfato de sódio e algodão de vidro. O sulfato de sódio era, geralmente, seco a aproximadamente 400°C por quatro horas e guardado em frascos de vidro. A fase orgânica, seca pela passagem através da coluna, era recebida em frascos de 2 mL. O conteúdo desses frascos era levado à secura por meio de fluxo de nitrogênio. Para melhor secagem, 1 mL de metanol era adicionado ao frasco de 2 mL e eliminado a seguir. Os frascos de

2 mL eram então guardados em freezer. A solução de cloreto de potássio foi preparada com o sal da Vetec (lote 950261) com grau de pureza PA e era guardada em uma mistura bifásica com diclorometano, para evitar contaminação por impurezas orgânicas da água. A coluna de secagem era montada com sulfato de sódio da Nuclear (lote 02030561) com grau de pureza PA e algodão de vidro da Labsynth (lote 19618) especificado como sendo reagente analítico.

Ao serem retiradas do freezer, as amostras eram submetidas a um fluxo de nitrogênio para a eliminação de umidade. A reação de silanização era feita pela adição de 60 μ L de bis(trimetilsilil)trifluoro acetamida (BSTFA) aos frascos de 2 mL contendo os lipídios extraídos e metilados. A atmosfera era alterada por fluxo de nitrogênio e os frascos de 2 mL eram postos em estufa a 50-60°C por 60-90 minutos. Com as amostras silanizadas ainda quentes e por meio de fluxo de nitrogênio, o excesso do reagente de silanização era eliminado. As soluções, para as injeções no cromatógrafo a gás (CG) e no cromatógrafo a gás acoplado ao espectômetro de massas (CG-EM), eram feitas com a solubilização do conteúdo dos frascos de 2 mL em 10 gotas de hexano. As silanizações eram feitas não mais que 24 horas antes das injeções no CG e no CG-EM. O BSTFA em ampolas utilizado era da marca Sigma (lote 15H34281). O hexano usado era da Merck KgaA (lote 41304) com grau de pureza Espectrofotometria/HPLC/Resíduos.

Identificação e análise quantitativa dos lipídios

A identificação e a análise quantitativa dos lipídios foi feita na Central de Análises do Departamento de Química do CFM/UFSC, no laboratório coordenado pelo professor Luiz Madureira. A identificação dos lipídios foi feita por meio de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu, modelo QP 2000A com 70 eV de impacto de elétrons e tendo hélio como gás de arraste. As colunas usadas tanto no cromatógrafo a gás (CG), quanto no CG-EM eram da marca Shimadzu, com as seguintes características: fase estacionária CBP1 (não-polar), espessura do filme de 0,25 μ m e comprimento de 25 m. A programação de temperatura usada, também em ambos os casos, foi a seguinte: o forno inicialmente a 40°C era aquecido à taxa de 10°C por minuto até 180°C; o

aquecimento até a temperatura final de 310°C era feito à taxa de 4°C por minuto e então; o forno era deixado em isoterma por 20 minutos. O volume de soluções de amostra injetado foi de 1,0 µL. As amostras foram injetadas sem divisão de fluxo.

As análises quantitativas foram feitas em um CG da Shimadzu, modelo GC-17A e equipado com um detector por ionização em chama (FID). O gás de arraste neste caso foi o nitrogênio. Foram analisadas as amostras t_0 (em triplicata), t_1 , t_2 , t_3 , $t_{3\text{-réplica}}$, t_4 , t_5 , t_6 e os brancos 1 e 2. Com exceção de duas amostras, o volume de soluções de amostra injetado também foi de 1,0 µL, como o injetor no modo splitless. Devido às perdas parciais de material durante o processamento das amostras, nos casos da amostra t_2 e do branco1, foram injetados 1,6 e 1,2 µL, respectivamente. Isto não se traduz em problemas na análise quantitativa em função de padrões terem sido adicionados às amostras.

Tratamento dos Dados

Os valores obtidos em todas as determinações realizadas foram tratados com o objetivo de se obter resultados mais exatos e de se conhecer suas incertezas. Para que as incertezas dos resultados obtidos fossem devidamente calculadas, as incertezas associadas aos processos básicos (pesagens, análise titrimétrica, etc.) foram propagadas. Nas seções a seguir, apresenta-se a forma de tratamento dos dados.

Peso seco

As amostras secas de cada tempo foram pesadas pela utilização de uma balança de prato externo, com incerteza estimada em 0,02 g. A incerteza de cada pesagem foi propagada então, pelo método apresentado por Baird (1995). Este autor sugere que a incerteza do resultado de uma função do tipo:

$$z = f(x,y) \quad (3)$$

pode ser calculada, de maneira simplificada, pela derivada parcial da função z , com relação a x e y . No caso de soma e subtração, as $f(x,y)$ são descritas, respectivamente, por:

$$z = x + y \quad (4)$$

$$z = x - y \quad (5)$$

Nestes casos, a incerteza do resultado z (δz) é dada por:

$$\delta z = \delta x + \delta y \quad (6)$$

onde δx e δy são, respectivamente, as incertezas das variáveis x e y . Este resultado é válido tanto para a soma quanto para a subtração, por considerar-se a hipótese pessimista de que as incertezas se somam. Desta forma, obtém-se o maior intervalo

de valores possível, onde têm-se a “quase certeza” de se encontrar o valor verdadeiro do resultado (Baird, 1995). Já no caso de multiplicação e divisão, funções descritas por:

$$z = x \cdot y \quad (7)$$

$$z = x \cdot y^{-1} \quad (8)$$

a incerteza do resultado é dada por:

$$\delta z = (\delta x/x + \delta y/y) \cdot z \quad (9)$$

Em cada coleta, foram retirados seis sacos de decomposição do ambiente. Como já foi explicado, estas amostras foram juntas duas a duas obtendo-se, em cada tempo, amostras em triplicata. O peso seco foi determinado para cada uma das três amostras de cada tempo. Segundo Meier e Zünd (1993), para um pequeno número de determinações, a mediana (valor intermediário) tende a ser mais próxima ao valor verdadeiro do que a média. Portanto, selecionou-se a mediana dos resultados das três determinações do peso seco, para cada tempo. O número de algarismos significativos dos resultados é consistente com o de suas incertezas que, por sua vez, é consistente com a precisão da incerteza básica, isto é, da balança de prato externo utilizada.

Teor de cinzas

Neste caso, a incerteza da balança foi determinada pela pesagem de três cadinhos de porcelana vazios (brancos) ao início e término de cada série de análises. Foram necessárias duas séries de análises, uma de oito e outra de seis dias para a determinação do teor de cinzas de todas as amostras. As medianas das duas triplicatas realizadas, ao início e término de cada uma destas séries, foram tomadas e a maior, selecionada como sendo a incerteza da balança. O ideal é que isso tivesse sido feito diariamente, juntamente com as análises. Como isso não era possível, ao menos determinou-se a incerteza da balança para o período em que as pesagens estavam sendo realizadas.

Também neste caso, a mediana dos três teores de cinzas obtidos para cada tempo foi selecionada. A propagação das incertezas foi feita segundo o método apresentado anteriormente. O número de algarismos significativos dos resultados e incertezas foi expresso de forma consistente relativamente às incertezas das balanças utilizadas.

Peso seco sem cinzas

O peso seco sem cinzas foi calculado pela subtração da quantidade de cinzas, do peso seco. Os resultados foram expressos em termos percentuais com relação às quantidades originais. Também neste caso, a mediana dos valores obtidos para cada tempo foi selecionada. Com relação ao número de algarismo significativos dos resultados e à propagação das incertezas, foi feito o mesmo que nos casos anteriores.

Com a finalidade de avaliar a adequação do modelo exponencial simples na descrição da variação do peso seco sem cinzas ao longo da decomposição, foi feito o ajuste deste modelo cinético aos resultados experimentais. Para tal, utilizou-se o programa Microsoft Excel 97, que calcula o ajuste por mínimos quadrados através de pontos usando a equação:

$$y = c \cdot x^b \quad (10)$$

Este método pode ser aplicado pelo fato do modelo exponencial simples ser intrinsecamente linear (Wieder e Lang, 1982).

Com o objetivo de calcular a constante de decaimento e o tempo de meia-vida do material, conforme feito por Buth e De Wolf (1985), o modelo exponencial simples linearizado também foi ajustado aos dados experimentais. O ajuste deste modelo cinético também foi feito pelo programa acima citado e, calculado pelo método dos mínimos quadrados para uma linha, representada pela equação:

$$y = mx + b \quad (11)$$

As incertezas dos valores de peso seco sem cinzas linearizados foram determinadas pela equação:

$$\delta z = \delta x/x \quad (12)$$

obtida pela derivada da expressão (Baird, 1995):

$$z = \ln x \quad (13)$$

O número de algarismo significativos destes resultados foi definido com base nos mesmos critérios dos casos anteriores.

Teor de nitrogênio

As análises do teor de nitrogênio também foram feitas em triplicata. As incertezas das balanças analíticas usadas foram estimadas por analogia às obtidas para a balança analítica utilizada na determinação do teor de cinzas. A propagação das incertezas e a escolha do número de algarismos significativos dos resultados e incertezas também foram feitas como descrito anteriormente. Neste caso, contudo, foram usadas a incerteza das balanças, das buretas e da concentração da solução-padrão de ácido clorídrico.

Os valores obtidos para o teste da exatidão do método com relação à ausência de perdas de sais de amônio foram determinados como sendo $(100 \pm 3)\%$ p/p, $(101 \pm 3)\%$ p/p e $(100 \pm 3)\%$ p/p. A mediana destes resultados evidencia, portanto, a validade do método para a análise.

A mediana dos teores de nitrogênio encontrados nas análises dos brancos foram descontadas dos valores obtidos para as amostras. Desta forma, eliminou-se o erro positivo que seria causado pela contribuição de nitrogênio do solvente, papel e reagentes usados. A mediana dos resultados de teor de nitrogênio com relação ao peso seco sem cinzas, obtidos para cada tempo, foi selecionada.

Lipídios

Seguindo o mesmo procedimento dos casos anteriores, as incertezas das soluções-padrão usadas foram determinadas. A incerteza da balança analítica utilizada na pesagem das amostras foi determinada pela pesagem de três tubos-controle, ao início e término da série de pesagens. A mediana das discrepâncias observadas foi selecionada como sendo a incerteza da balança naquele dia. Desta forma, as incertezas das massas das amostras pesadas foram estimadas.

As incertezas das áreas obtidas pelo cromatógrafo a gás foram determinadas pela injeção, em triplicata, da amostra do tempo zero (t_0). Para tal, os picos referentes aos ácidos 14:0 e metóxi cinâmico, androstanol, colestano e álcool-C32 foram selecionados. A média das três áreas obtidas para cada um desses picos foi selecionada e o desvio-padrão, calculado. Neste caso, os desvios-padrão foram tomados como sendo as incertezas das áreas dos picos. A mediana das cinco incertezas percentuais apresentou o valor de 50% e, foi tomada como a incerteza da determinação das áreas pelo cromatógrafo a gás.

A concentração e as incertezas das soluções de androstanol e colestano eram conhecidas. Portanto, a escolha do padrão para quantificação foi feita pela análise das curvas de variação de suas áreas contra o tempo. Os resultados desta análise são apresentados nas figuras 3 e 4.

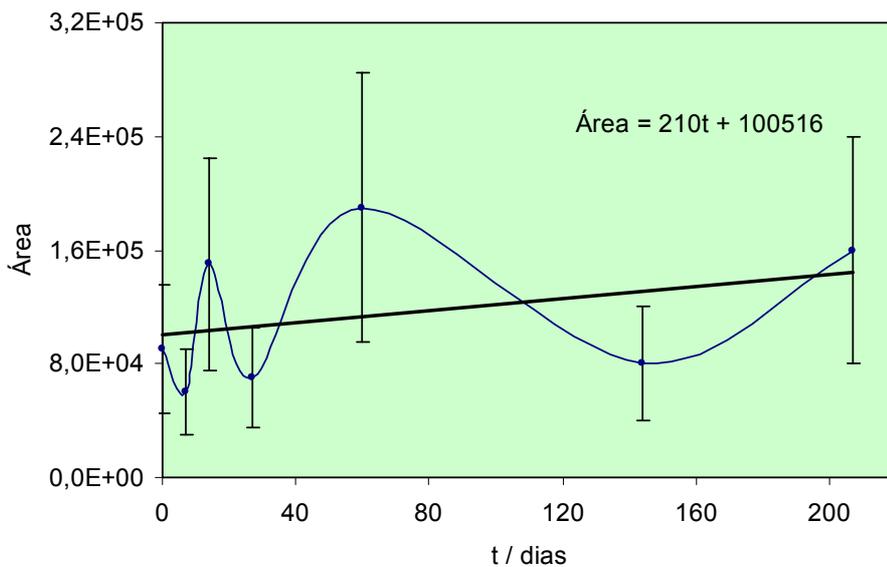


Figura 3. Variação da área do pico referente ao androstanol contra o tempo.

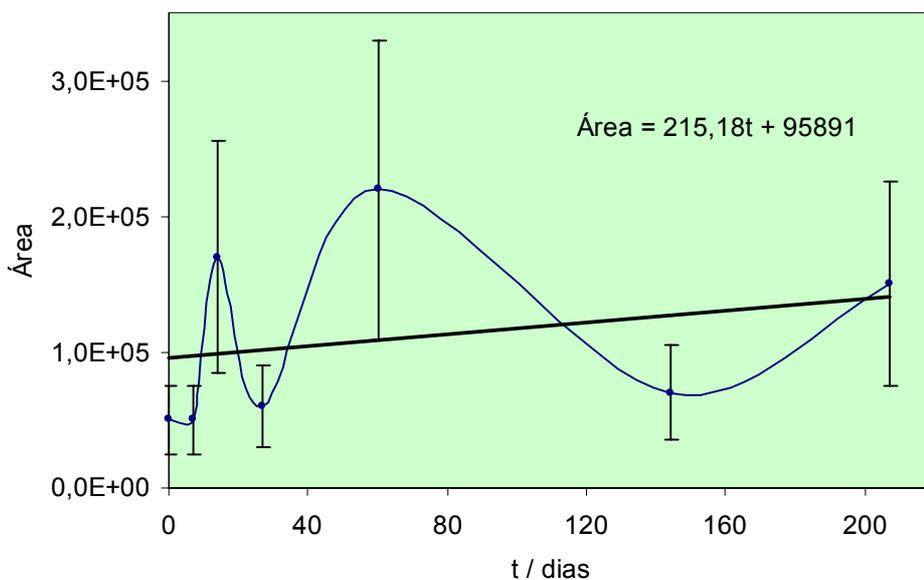


Figura 4. Variação da área do pico referente ao colestano contra o tempo.

As barras de incerteza observadas em ambas as figuras representam 50% dos valores das áreas. A inspeção gráfica permite constatar que a variação da área do pico referente ao androstanol contra o tempo foi menor do que a observada para o colestano. Os coeficientes angulares, obtidos para as retas de tendência dos pontos, apresentados nos gráficos do androstanol e do colestano foram,

respectivamente, de 210 e 215,18, o que confirma a inspeção gráfica. Como pode ser observado também, dentro das incertezas das áreas para cada tempo, praticamente não há variação da área do pico referente ao androstanol com o tempo. Isto é um indício de que o androstanol não co-elui com nenhum outro composto e é, portanto, adequado à quantificação.

Como a quantificação dos lipídios foi feita por meio do androstanol, um padrão adicionado à amostra, as concentrações dos lipídios e suas incertezas foram obtidas a partir da razão: área do lipídio/área do padrão (A_i/A_p). Embora Nass *et al.* (1998) tenham calculado as incertezas de forma diferente, também usaram a razão A_i/A_p para calcular as quantidades de lipídios em seu trabalho. Para cada tempo, a massa de cada um dos oito lipídios quantificados foi determinada pela equação:

$$m_i = m_{\text{and}} \cdot (A_i/A_p) \quad (14)$$

A concentração desses lipídios foi calculada com relação ao peso seco sem cinzas.

A determinação da incerteza da razão A_i/A_p foi feita de maneira semelhante à determinação da incerteza das áreas. Ou seja, pela análise em triplicata da amostra do tempo zero (t_0), as razões A_i/A_p foram calculadas para, neste caso, cada um dos oito lipídios quantificados. As médias e os desvios-padrão foram calculados. Calculou-se ainda, os percentuais dos desvios-padrão, com relação às médias. A mediana desses oito percentuais, que apresentou valor de 20%, foi tomada como sendo a incerteza da razão A_i/A_p . Foram feitas também análises de dois brancos. Foram detectados dois picos com potencial de interferência nos resultados. Para cada um desses picos, a média das duas áreas encontradas foi descontada da área do lipídio quantificado, quando foi o caso. As concentrações dos lipídios com relação ao peso seco sem cinzas e suas incertezas são apresentados na seção a seguir. A propagação de todas as incertezas envolvidas (balanças, cromatógrafo a gás - A_i/A_p e seringa), bem como os arredondamentos, foram feitos segundo as recomendações de Baird (1995), como já descrito.

Resultados e Discussão

Peso seco

A variação de massa do material em decomposição ao longo do tempo foi determinada através do peso seco (PS). Os valores encontrados, bem como suas incertezas, estão apresentados na tabela 1. Na figura 5, somente os resultados são apresentados. As incertezas, por serem muito pequenas, foram omitidas.

Tabela 1. Valores do PS ao longo da decomposição.

Tempo de Decomposição / dias	Peso Seco / % p/p
0	100,0 ± 0,4
7	88,5 ± 0,4
14	90,2 ± 0,4
27	73,2 ± 0,3
60	67,3 ± 0,3
144	42,1 ± 0,3
207	27,5 ± 0,3

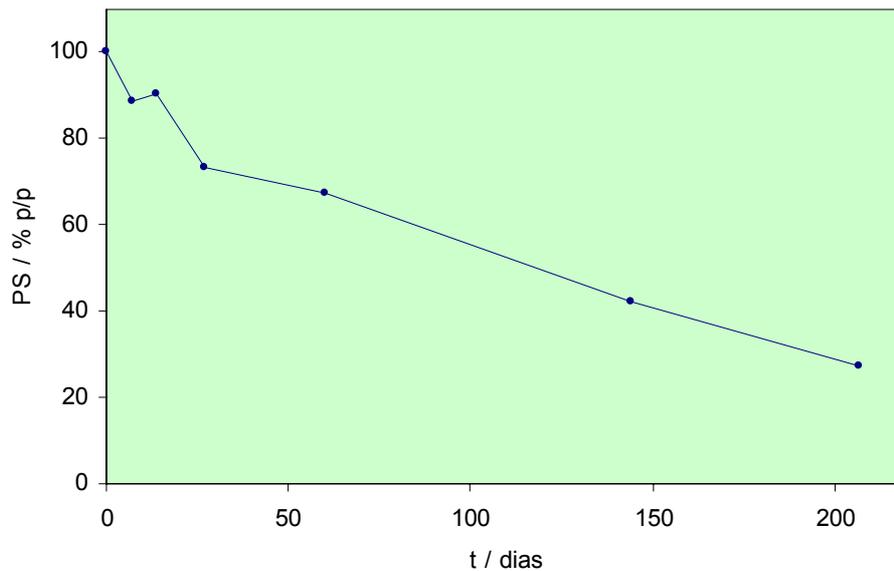


Figura 5. Variação do PS com o processo de decomposição.

Os resultados mostram uma perda de massa inicial acelerada, que a seguir se torna mais lenta, mas contínua ao longo do tempo. Em seu trabalho, White e Howes (1994) também observaram essa perda acelerada de massa no momento inicial da decomposição, que acreditam se dever à perda de componentes solúveis. Já a diminuição da taxa de decomposição absoluta com o tempo, provavelmente se deve ao aumento da proporção relativa de materiais recalcitrantes, como: celulose, gorduras, graxas, taninos e ligninas (Wieder e Lang, 1982).

Como parte do peso seco se deve às cinzas, presentes tanto em *Spartina alterniflora* quanto no material em decomposição (Panitz, 1986; Soriano-Sierra, 1992), determinou-se o teor de cinzas. Desta forma, seria possível saber quanto do peso seco se deveria à matéria orgânica e sais inorgânicos utilizáveis ou solúveis, ou seja, o peso seco sem cinzas.

Teor de cinzas

Os resultados das determinações dos teores de cinzas e suas incertezas são apresentados na tabela 2 e na figura 6.

Tabela 2. Teores de cinzas ao longo da decomposição.

Tempo de Decomposição / dias	Teor de Cinzas / % p/p
0	16 ± 2
7	27 ± 2
14	31 ± 2
27	30 ± 2
60	38 ± 2
144	49 ± 2
207	50 ± 2

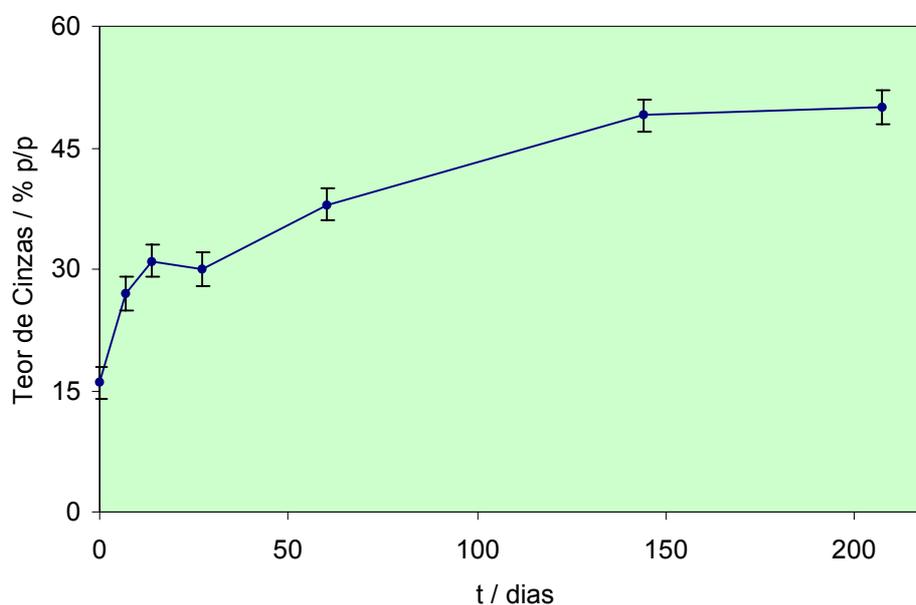


Figura 6. Variação do teor de cinzas ao longo do processo de decomposição de *S. alterniflora*.

Tal aumento no teor de cinzas com o tempo não foi observado por outros autores, dentre os quais Panitz (1986). Atribui-se este perfil ao procedimento

diferencial de lavagem do material em decomposição, por ocasião do seu processamento no laboratório. Buscou-se padronizar a perda de biomassa vegetal e de microorganismos por um procedimento de lavagem com quantidade padronizada de água. Desta forma, com o passar do tempo a quantidade de sedimento agregado ao material em decomposição aumentou.

Embora não se tenha feito nenhum experimento neste sentido, acredita-se que esse procedimento de lavagem do material em decomposição com um volume de água padronizado tenha contribuído no sentido da uniformização das amostras no que diz respeito às perdas ocorridas durante o processamento. Para que fosse possível avaliar a variação de matéria orgânica adicionada dos sais utilizáveis ou solúveis e de outros parâmetros relacionados à ela com o tempo, calculou-se o peso seco sem cinzas.

Peso seco sem cinzas

O peso seco sem cinzas (PSSC) foi obtido pela subtração da quantidade de cinzas, do peso seco. Os valores do peso seco sem cinzas e suas incertezas são apresentados na tabela 3 e na figura 7.

Tabela 3. Valores do peso seco sem cinzas ao longo da decomposição.

Tempo de Decomposição / dias	Peso Seco sem Cinzas / % p/p
0	100 ± 6
7	79 ± 5
14	74 ± 5
27	64 ± 4
60	48 ± 3
144	27 ± 2
207	17 ± 2

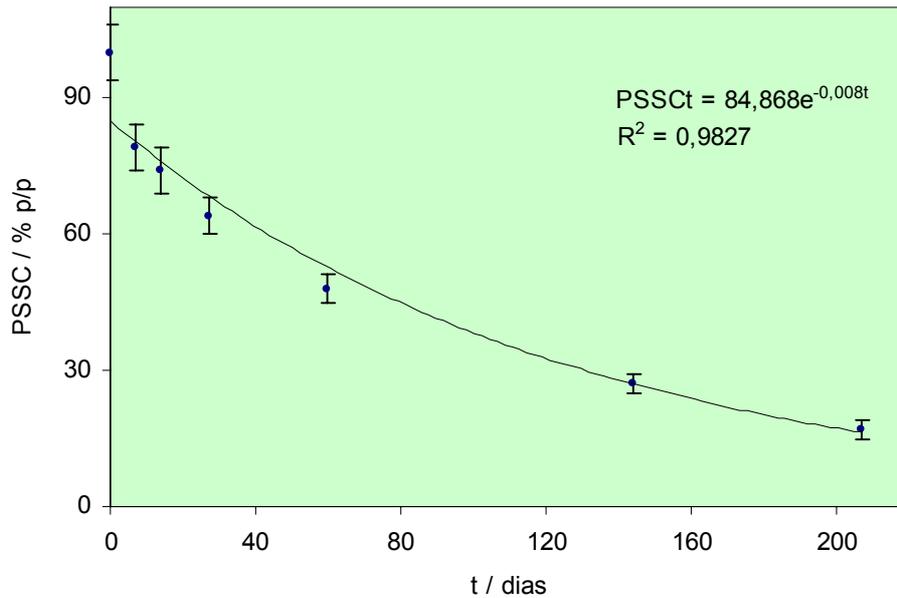


Figura 7. Variação do PSSC ao longo do processo de decomposição de *S. alterniflora*.

Observa-se o mesmo perfil, embora quantitativamente diferente, da variação do peso seco ao longo da decomposição de *S. alterniflora*. Adicionalmente, observa-se o ajuste do modelo exponencial simples aos dados experimentais. O modelo exponencial simples pode ser descrito por:

$$PSSC_t = PSSC_0 e^{-kt} \quad (15)$$

onde, $PSSC_t$ e $PSSC_0$ são, respectivamente, PSSC em um tempo t qualquer e no tempo inicial ($t=0$) e, k é a constante de decaimento. O valor de R^2 encontrado (0,9827) mostrou uma boa adequação do modelo aos resultados experimentais (Panitz, 1986; Soriano-Sierra, 1992).

Buth e De Wolf (1985) ajustaram o modelo exponencial simples linearizado, aos dados de decomposição, para calcular a constante de decaimento do material. Com o mesmo objetivo, os dados obtidos neste trabalho também foram linearizados e a relação linear entre $\ln(PSSC_t/PSSC_0)$ e o tempo, foi ajustada. Os valores dos dados linearizados e suas incertezas são vistos na tabela 4 e na figura 8. A figura 8 contém ainda, a reta ajustada.

Tabela 4. Variação dos dados do peso seco sem cinzas linearizados ao longo da decomposição.

Tempo de Decomposição / dias	$\ln(\text{PSSC}_t/\text{PSSC}_0)$
0	$0,0 \pm 0,1$
7	$-0,2 \pm 0,1$
14	$-0,3 \pm 0,1$
27	$-0,4 \pm 0,1$
60	$-0,7 \pm 0,1$
144	$-1,3 \pm 0,1$
207	$-1,8 \pm 0,2$

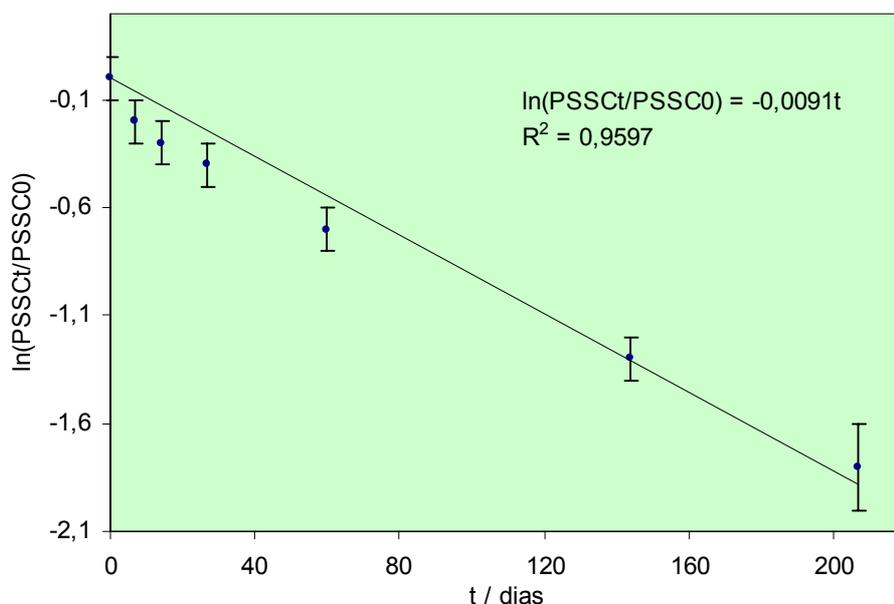


Figura 8. Dados experimentais de PSSC, contra o tempo, linearizados e reta ajustada.

O ajuste da reta aos dados linearizados da variação do peso seco sem cinzas com a decomposição de *Spartina alterniflora*, apresentou um R^2 de 0,9597. A interseção da reta ajustada com o eixo y em $t = 0$, foi definida como sendo igual a $\ln 1$ (zero). Tal definição foi feita para adequar o modelo à realidade experimental de que em $t = 0$, $\text{PSSC}_t/\text{PSSC}_0 = 1$, ou seja, que havia 100% de massa no início da decomposição. Neste caso, está-se obtendo um valor de k mais alto do que se a interseção fosse estimada simplesmente como mais um parâmetro (Wieder e Lang,

1982). No entanto, isso não representa um problema de superestimativa da constante de decaimento, uma vez que o valor de R^2 obtido para o ajuste é equivalente ao determinado por Buth e De Wolf (1985). Como a equação da reta ajustada é:

$$\ln(\text{PSSC}_t/\text{PSSC}_0) = -0,0091t \quad (16)$$

a constante de decaimento (k) determinada é de $91 \cdot 10^{-4} \text{dias}^{-1}$.

Segundo Buth e De Wolf (1985), o tempo de meia-vida (τ) pode ser determinado pela equação:

$$\tau = \ln 2/k \quad (17)$$

O τ , calculado desta forma, é igual a 76 dias. Em outras palavras, com relação ao PSSC, o material atinge 50% da quantidade original em 76 dias. Este valor é aproximadamente a metade dos obtidos por Buth e De Wolf (1985), Panitz (1986) e Soriano-Sierra (1992). A maior velocidade de decomposição encontrada pode se dever ao fato de ter-se utilizado, no experimento de decomposição, *Spartina alterniflora* viva, que é mais nutritiva do que o material senescente, usado na maioria dos estudos. Embora não se saiba se a temperatura média do ambiente, durante o experimento, foi maior do que a de outros trabalhos, sabe-se que, por exemplo, a atividade microbiana é maior em temperaturas mais altas (Canuel e Martens, 1993).

Teor de nitrogênio

Os valores obtidos na determinação do teor de nitrogênio, com relação ao peso seco sem cinzas, se encontram na tabela 5. A figura 9 apresenta a variação do teor de nitrogênio, com relação ao peso seco sem cinzas, ao longo do tempo.

Tabela 5. Valores dos teores de nitrogênio, com relação ao peso seco sem cinzas, do material em decomposição de *S. alterniflora*.

Tempo de Decomposição / dias	Teor de Nitrogênio* / % p/p
0	1,7 ± 0,1
7	1,20 ± 0,07
14	1,33 ± 0,08
27	1,31 ± 0,08
60	1,35 ± 0,09
144	1,6 ± 0,1
207	1,6 ± 0,1

* Com relação ao peso seco sem cinzas.

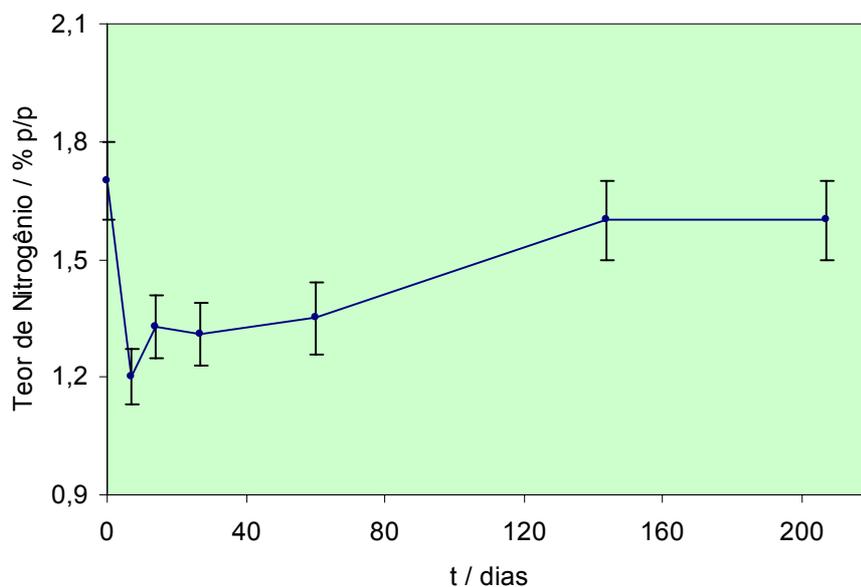


Figura 9. Variação do teor de N com relação ao PSSC no processo de decomposição de *S. alterniflora*.

Pela inspeção gráfica é possível observar claramente as duas primeiras duas fases de decomposição dos detritos. Como pode ser visto, na primeira fase ocorre uma rápida diminuição do teor de nitrogênio devido, segundo Alongi (1998), à perda de compostos solúveis como, por exemplo, açúcares e taninos simples. Na sequência, e até o final do experimento, observa-se um aumento gradual no teor de nitrogênio. Este aumento indica a colonização dos detritos por parte dos microorganismos.

De acordo com a estimativa de White e Howes (1994), 50 a 65% do nitrogênio total dos detritos de *S. alterniflora* em estado avançado de decomposição são provenientes de fontes externas. Seus resultados são coerentes com a hipótese de que, com o tempo, quantidades significativas de nitrogênio de fontes externas se incorporam ao nitrogênio do material em decomposição. Estas fontes externas de nitrogênio em potencial, incluem fixação de N₂ e incorporação de nitrogênio dissolvido, orgânico e inorgânico. Uma parte dessa incorporação de nitrogênio ao material em decomposição, que se disponibiliza para mineralização e ciclagem, se deve ao enriquecimento da comunidade microbiana (Squires e Good, 1974; White e Howes, 1994).

Pelas diminuições observadas dos valores de peso seco e peso seco sem cinzas com o tempo, acredita-se que, simultaneamente à este enriquecimento microbiano, os detritos vão sendo fragmentados ou consumidos por heterótrofos maiores. Justamente conforme descrito por Alongi (1998), estes resultados indicam que os detritos são consumidos desde com pouca ou nenhuma modificação microbiana até quando estão ricos em microorganismos. Ou seja, os detritos vão sendo submetidos à terceira fase de sua decomposição. O mesmo perfil foi observado por Buth e De Wolf (1985).

Lipídios

A derivatização dos compostos a serem analisados por espectrometria de massas é feita para aumentar a volatilidade, facilitar a identificação por meio de sequências de fragmentação previsíveis ou simplificadas ou conferir maior estabilidade ao íon molecular (Silverstein *et al.*, 1994). Além disso, no caso da análise dos lipídios hidroxilados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, a derivatização aos éteres de trimetil-silila é feita para melhorar a separação cromatográfica (Nass *et al.*, 1998).

Os éteres de trimetil-silila de álcoois normalmente não exibem o pico do íon molecular. Contudo, o pico [M-15], devido a perda de uma metila do grupamento trimetil-silila, é bastante proeminente. Clivagens fáceis em ambos os lados do átomo de carbono ligado à trimetil-siloxila permitem a determinação da posição do grupamento na cadeia hidrocarbônica (Eglinton e Hunneman, 1968). Os fragmentos m/z 73 $[(CH_3)_3Si]^+$ e m/z 75 $[(CH_3)_2SiOH]^+$ são comuns (Silverstein *et al.*, 1994) e vistos nos espectros dos éteres de trimetil-silila de álcoois. Desta forma, a presença de álcoois tais como o tetracosanol ou álcool-C24; triacontanol ou álcool-C30 e, dotriacontanol ou álcool-C32 foi identificada. Entretanto, destes só o álcool-C32 pode ser quantificado por não co-eluir com nenhuma outra substância.

Uma vantagem adicional da derivatização dos compostos hidroxilados aos éteres de trimetil-silila é a presença do átomo de silício, que permite a identificação dos picos sem ambiguidade por medições precisas de massa (Eglinton e Hunneman, 1968). Os espectros de massas dos ésteres metílicos dos ácidos hidroxilados alifáticos, cujas hidroxilas tenham sido silanizadas, apresentam uma série de características em comum. Os picos-base são, geralmente, o m/z 73 $[(CH_3)_3Si]^+$ ou o m/z 75 $[(CH_3)_2SiOH]^+$. Os picos m/z 89 $[(CH_3)_3SiO]^+$ e m/z 129 $[CH_2(CH)_2OSi(CH_3)_3]^+$ são observados com frequência. O pico [M-15] é sempre observado. No caso dos ésteres α -hidroxilados (trimetil-siloxila no carbono α com relação à carboxila esterificada), também são vistos os picos [M-43] e [M-59] (perda de CO_2CH_3). Já no caso dos ésteres β e ω -hidroxilados (trimetil-siloxila no carbono terminal da cadeia hidrocarbônica, oposto com relação à carboxila esterificada), também observa-se os picos [M-31] e [M-47] (Eglinton e Hunneman, 1968). Com isso, foram identificados nas amostras os seguintes ácidos hidroxilados: ácido ω -hidróxi palmítico ou 16-OH-16:0; ácido ω -hidróxi esteárico ou 18-OH-18:0; ácido ω -hidróxi cerótico ou 26-OH-

26:0; ácido α -hidróxi octadecenóico ou 2-OH-18:1; ácido α -hidróxi behênico ou 2-OH-22:0; ácido α -hidróxi tricosanóico ou 2-OH-23:0 e, ácido α -hidróxi lignocérico ou 2-OH-24:0. No entanto, todos estes ácidos hidroxilados co-eluíam com outras substâncias. Desta forma, suas determinações quantitativas não foram possíveis.

Embora seja difícil analisar os ácidos graxos livres diretamente por cromatografia a gás, sem derivatização da amostra, por conta da alta polaridade, baixa volatilidade e de haver os ácidos que formam ligação hidrogênio, muitas análises dos ácidos graxos não-derivatizados têm sido feitas (Bronz, 2002). Segundo Silverstein *et al.* (1994), o pico do íon molecular de um éster metílico de um ácido alifático de cadeia linear é, em geral, observado. O pico mais característico dessa classe de compostos se deve ao rearranjo de McLafferty, com quebra da ligação β com relação à carboxila esterificada. Este pico, o pico-base dos espectros desses compostos, aparece em m/z 74 e é devido à espécie $[\text{CH}_2\text{COCH}_3\text{OH}]^+$. Em função de quebras sucessivas das ligações carbono-carbono, aparecem aglomerados hidrocarbônicos em intervalos de 14 u.m.a. e, em cada um deles, existe um $(\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{O}_2)$ intenso. O pico em m/z 87 é mais intenso que seus homólogos e se deve à $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^+$ (Silverstein *et al.*, 1994). Desta forma, o ácido palmítico ou 16:0 foi identificado. O tempo de retenção também foi usado na identificação dos ácidos mirístico ou 14:0; pentadecanóico ou 15:0; *iso* e *anteiso*-pentadecanóico; margárico ou 17:0; esteárico ou 18:0; octadecenóico (sem posicionar a insaturação) ou 18:1; arácido ou 20:0; behênico ou 22:0 e, lignocérico ou 24:0. Destes, somente os ácidos *iso* e *anteiso*-15:0, 18:1, 22:0 e 24:0 não puderam, por co-eluição com outros compostos, ser quantificados.

Em função do perfil de fragmentação e da intensidade de alguns picos característicos, a identificação de esteróis livres por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas é mais fácil do que a dos esteróis derivatizados. Contudo, na análise dos esteróis livres, as amostras estão mais sujeitas a desidratação e quebra nos “sítios ativos” do equipamento. A derivatização ao éter de trimetil-silila está entre as mais usadas (Goad e Akihisa, 1997). Estes autores apresentam as propostas de fragmentação de diversos esteróis, bem como de seus derivados. Segundo os autores, no caso dos éteres de trimetil-silila de esteróis, observa-se os picos devido aos seguintes fragmentos: $[\text{M}]^+$, $[\text{M-Me}]^+$, $[\text{M-TMSiOH}]^+$ e $[\text{M-Me-TMSiOH}]^+$. Mais especificamente no caso dos esteróis com uma insaturação na

posição cinco (Δ^5), observa-se também o pico referente ao fragmento $[M-122-TMSiO]^+$, que se deve à perda dos anéis A e B e do grupamento TMSiO. Na maior parte dos esteróis que não tem um grupamento metila na posição 14 e após as perdas do grupamento TMSiO, do anel D e de um átomo de hidrogênio, observa-se o pico devido ao fragmento $[M-CL-42-TMSiOH]^+$ (Goad e Akihisa, 1997). A perda de CL lateral saturada ou não, seguida das perdas do grupamento TMSiO e de um átomo de hidrogênio, leva ao aparecimento do pico referente à $[M-CL-TMSiOH]^+$ (Goad e Akihisa, 1997). Com isso, foram identificados o 5-sitosten-3-ol ou $C_{29}\Delta^5$, o 5-ergosten-3-ol ou $C_{28}\Delta^5$ e o 5,22-estigmasdien-3-ol ou $C_{29}\Delta^{5,22}$. Ainda, foi evidenciada a presença do 5-colesten-3-ol ($C_{27}\Delta^5$) ou 4-colesten-3-ol ($C_{27}\Delta^4$). Entretanto, não foi possível diferenciá-los. Devido a co-eluição, não foi possível quantificar nenhum dos esteróis encontrados.

Por meio da coleção de espectros organizada por Ausloos *et al.* (1994), o ácido metóxi cinâmico (ác. MeO cin.) foi identificado. No entanto, restou a dúvida se a hidroxila está na posição quatro e a metoxila na posição 3, ou vice-versa.

A quantificação dos ácidos graxos, ácido metóxi cinâmico e álcool-C32 foi feita com um detector por ionização em chama (FID), que segundo a revisão de Eder (1995), é o detector mais conveniente para a análise dos ésteres metilados de ácidos graxos e apresenta uma larga faixa de linearidade. Para o cálculo das quantidades dos ácidos graxos presentes, utilizou-se a razão: Área do pico a ser quantificado/Área do 5α -androstan- 3β -ol (A_i/A_p). Desta forma, não se obteve a real massa dos ácidos nas amostras. Para que a quantificação real fosse feita, deveria-se utilizar os fatores-resposta, que corrigem a diferença de sinal pela queima diferencial no FID, oriunda das diferenças estruturais entre os analitos e o padrão (Canuel e Martens, 1993; Eder, 1995). Contudo, o método usado é válido, não para efeitos de concentração absoluta, mas de concentração relativa para avaliação da variação da concentração dos ácidos graxos ao longo do processo de decomposição. Sempre que possível, as estruturas eram confirmadas pela comparação dos espectros obtidos com aqueles disponíveis na coleção de espectros organizada por Ausloos *et al.* (1994).

Os resultados quantitativos da análise de lipídios estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores das concentrações dos lipídios na decomposição de *S. alterniflora*.

Tempo / dias	Conc. 14:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. 15:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. 16:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. 17:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. 18:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. 20:0 / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. ác. MeO cin. / $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc. álcool- C32 / $\mu\text{g g}^{-1}$
0	40 ± 10	28 ± 8	600 ± 200	28 ± 8	60 ± 20	40 ± 10	140 ± 50	80 ± 30
7	110 ± 30	50 ± 20	800 ± 200	50 ± 10	110 ± 30	80 ± 30	80 ± 30	190 ± 60
14	50 ± 10	40 ± 10	400 ± 100	30 ± 10	90 ± 20	90 ± 30	80 ± 20	300 ± 100
27	80 ± 20	50 ± 20	600 ± 200	40 ± 10	90 ± 30	80 ± 30	80 ± 30	130 ± 30
60	60 ± 20	40 ± 10	270 ± 80	30 ± 10	80 ± 30	80 ± 30	60 ± 20	270 ± 80
144	60 ± 20	29 ± 8	290 ± 80	25 ± 8	60 ± 20	60 ± 20	90 ± 30	210 ± 80
207	40 ± 10	30 ± 10	300 ± 100	22 ± 5	60 ± 20	50 ± 20	60 ± 20	130 ± 40

A variação das concentrações dos ácidos graxos, ácido metóxi cinâmico e álcool-C32 com o tempo é vista nas figuras 10, 11 e 12. A apresentação dos resultados em três gráficos têm, como único objetivo, simplificar a observação.

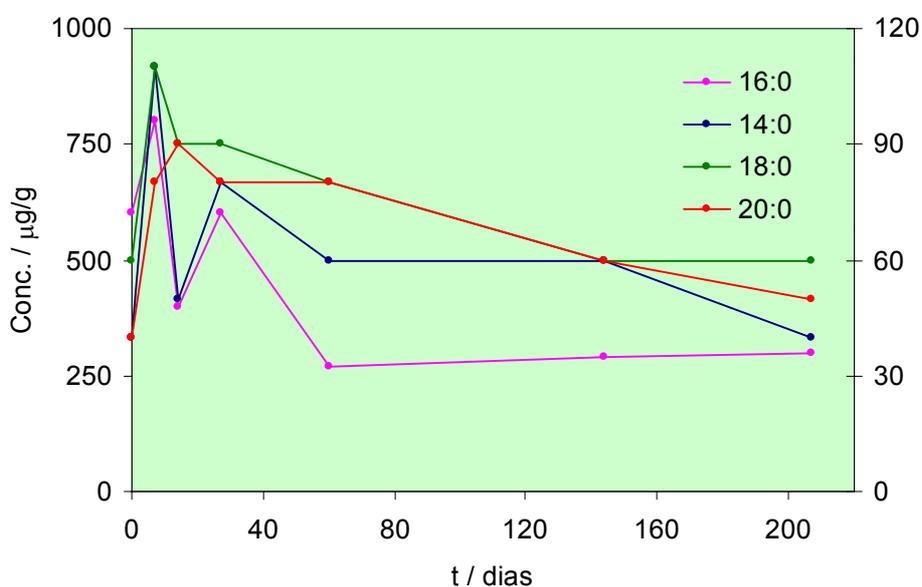


Figura 10. Variação da concentração dos ácidos 14:0, 16:0, 18:0 e 20:0 ao longo do processo de decomposição. A escala da esquerda é válida para o ác. 16:0 e a da direita, para os demais.

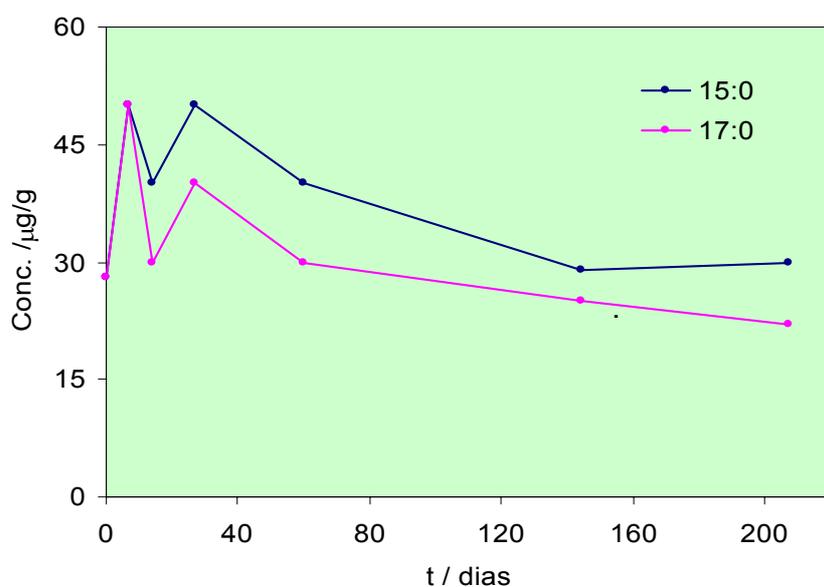


Figura 11. Variação da concentração dos ácidos 15:0 e 17:0 ao longo do processo de decomposição.

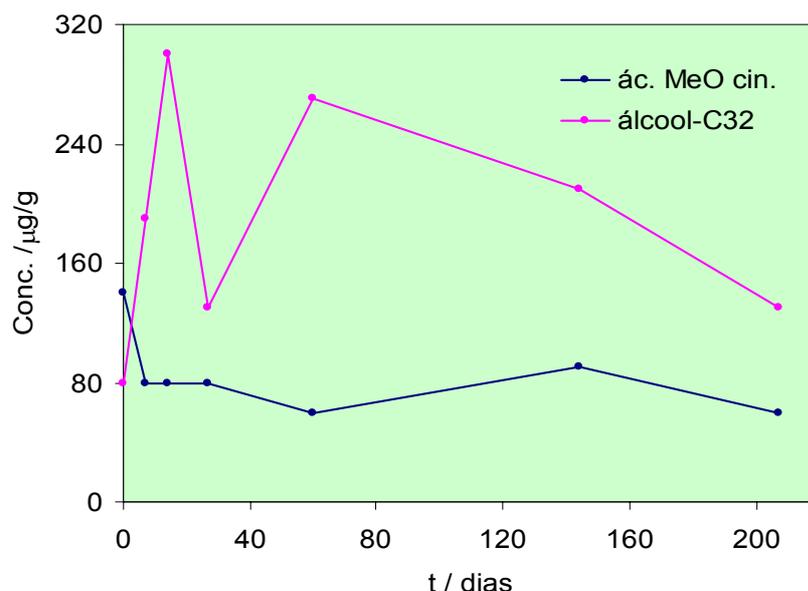


Figura 12. Variação da concentração do ác. MeO Cin. e álcool-C32 ao longo do processo de decomposição.

Em geral, observa-se um aumento inicial das concentrações dos lipídios seguido de uma tendência progressiva de diminuição. Atribui-se este perfil ao fato de, no início da decomposição de *Spartina alterniflora* haver um rápida solubilização dos componentes solúveis e de simultaneamente haver uma perda, à taxa mais lenta, dos compostos recalcitrantes (Wieder e Lang, 1982). Estes autores incluem entre tais compostos recalcitrantes, celulose, gorduras, graxas, taninos e ligninas. Os lipídios estão, portanto, justamente incluídos nesta classe de compostos. Desta forma, acredita-se que haja um enriquecimento relativo do material em decomposição em um primeiro momento com relação à estes compostos, que seriam lentamente perdidos a seguir. Atribui-se a diminuição abrupta das concentrações, de quase todos os lipídios, observada na análise da amostra do t_2 (14 dias) à um erro experimental. Acredita-se que este decréscimo pontual não teria sido observado caso as análises não tivessem sido feitas, em cada tempo, em amostra única, mas em triplicata. O perfil da variação da concentração do ácido metóxi cinâmico com o tempo observado, difere dos demais. Atribui-se a diminuição na concentração deste lipídio já no primeiro momento da decomposição ao fato do ácido metóxi cinâmico também, ser um composto com características polares e que, portanto, é facilmente solubilizado.

Foi identificada a presença de diversos ácidos α e ω -hidroxilados, embora nenhum deles tenha sido quantificado. Goosens *et al.* (1986) analisaram os ácidos hidroxilados de bactérias e sedimentos, ligados por meio de ligações lábeis por ataque ácido. No material original, tais lipídios ocorrem ligados à aminas ou por meio de ligações glicosídicas. Goosens *et al.* (1986) concluíram que os ácidos β -hidroxilados extraídos desta forma, são biomarcadores específicos de bactérias. Ainda segundo Goosens *et al.* (1986), a maior parte dos ácidos hidroxilados encontra-se ligada por ligações lábeis somente por ácido e em função disso, seus teores geralmente são subestimados ou nem são detectados. Já que há bactérias nos detritos de *Spartina alterniflora* (Burkholder e Bornside, 1957; Schultz e Quinn, 1973; White e Howes, 1994), talvez não se tenha detectado a presença dos ácidos β -hidroxilados por, neste trabalho, só se ter extraído os lipídios livres.

Schultz e Quinn (1973) determinaram o teor de ácidos graxos livres e ligados de *Spartina alterniflora* mensalmente, por um ano. Calculou-se a média dos resultados encontrados por eles entre os meses de agosto e setembro, meses em que a gramínea deveria estar em um estado de desenvolvimento semelhante ao encontrado aqui no hemisfério sul em março, quando a coleta do material deste trabalho foi feita. Os valores encontrados por Schultz e Quinn (1973) em seu trabalho foram, portanto: 14:0, 1.250 $\mu\text{g g}^{-1}$; 15:0 *iso*, *anteiso* e normal (com pequena quantidade de 14:1), 750 $\mu\text{g g}^{-1}$; 16:0, 23.850 $\mu\text{g g}^{-1}$; 16:1, 1.450 $\mu\text{g g}^{-1}$; 16:2, 200 $\mu\text{g g}^{-1}$; 18:0, 2.600 $\mu\text{g g}^{-1}$; 18:1, 4.850 $\mu\text{g g}^{-1}$; 18:2, 20.800 $\mu\text{g g}^{-1}$; 18:3, 42.400 $\mu\text{g g}^{-1}$; 20:0, 1.900 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 22:0, 1.500 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os valores são expressos em μgrama de ácido graxo por grama de peso seco de *S. alterniflora*. Os resultados se assemelham aos apresentados por Canuel e Martens (1993), em que, por ordem de abundância, os principais ácidos graxos encontrados em *Spartina alterniflora* foram: 18:1, 16:0, 18:0, 14:0 e 20:0. Em termos qualitativos, a composição da gramínea obtida neste trabalho se assemelha aos apresentados por Schultz e Quinn (1973) e Canuel e Martens (1993). Quantitativamente, contudo, os resultados obtidos neste trabalho são muito menores do que os de Schultz e Quinn (1973). Uma possível explicação para isso, seria uma subestimativa, se for o caso, dos ácidos graxos por conta da análise quantitativa não ter levado em conta o fator-resposta devido à queima diferencial entre os ésteres dos ácidos graxos e o 5 α -androstano-3 β -ol, o padrão utilizado. No entanto, isto é meramente especulativo por não se saber se, no caso

dos ácidos graxos, as concentrações obtidas neste trabalho foram sub ou superestimadas. Um outro fator, que aumentaria ainda mais a discrepância dos resultados, pode ser o fato de Schultz e Quinn (1973) terem usado um método de quantificação diferente do usado neste trabalho. Eles calcularam as áreas dos picos obtidos dos cromatogramas pela multiplicação da altura pela largura da metade da altura do pico. Contudo, se é que isso traz erro aos seus resultados, o erro é no sentido da subestimativa dos valores. Isto, portanto, não ajuda em nada o esforço de tentar esclarecer a origem da discrepância quantitativa observada. A fonte dessa discrepância deve residir então, no fato de Schultz e Quinn (1973) terem quantificado, não só os ácidos livres, como feito neste trabalho, mas também os ligados. A amplitude dessa diferença de valores é, entretanto, surpreendente.

Schultz e Quinn (1973) observaram ainda que a parte senescente tem a mesma composição de ácidos graxos do que a gramínea intacta. Contudo, observaram que na gramínea viva, entre maio e outubro, a concentração de ácidos é maior do que o dobro do que na morta, entre dezembro e abril, o que revela uma diferença sazonal drástica. Estes resultados de Schultz e Quinn (1973) indicam que as concentrações dos ácidos graxos obtidas neste trabalho, no que diz respeito à simulação do processo de decomposição natural de *Spartina alterniflora* em ambiente de marisma, estão superestimadas. Isto se deve ao fato de que é a parte senescente da gramínea a que entra na cadeia detritívora e se transforma em detritos após se desprender do restante das folhas, sendo portanto o material usado nos estudos de decomposição de diversos autores, como: Buth e De Wolf (1985), Panitz (1986) e Soriano-Sierra (1992).

Canuel e Martens (1993) identificaram os esteróis $C_{29}\Delta^5$, $C_{28}\Delta^5$ e $C_{29}\Delta^{5,22}$, que são os principais esteróis encontrados em plantas superiores em geral (Volkman, 1986), como sendo os principais componentes desta classe de lipídios de *Spartina alterniflora*. Pequenas quantidades de $C_{27}\Delta^5$ também já foram encontradas em outras espécies vegetais (Volkman, 1986). Portanto, acredita-se que ao menos parte da presença destes esteróis no material em decomposição estudado se deva à gramínea. Não é possível afirmar que a totalidade deles seja atribuída à gramínea pelo fato de algas unicelulares de diversos gêneros poderem sintetizá-los (Volkman, 1986; Canuel e Martens, 1993) e que em qualquer ambiente sedimentar, existem muitas fontes de matéria orgânica em potencial, como: fitoplâncton, macroalgas, plantas vasculares, leveduras, fungos, protozoários, plantas inferiores, zooplancton,

fauna bêntica e bactérias (Volkman, 1986). Ainda segundo a revisão de Volkman (1986), este material pode ser produzido *in situ* ou trazido de áreas distantes por correntes marinhas ou deposição eólica.

Como os fenóis de cinamila são os mais abundantes fenóis derivados de lignina em *Spartina alterniflora* (Canuel e Martens, 1993), atribui-se o ácido metóxi cinâmico quantificado à gramínea. Este, contudo, não pode ser considerado um biomarcador de *Spartina alterniflora* por haver, no próprio sistema estuarino estudado, outras fontes deste lipídio em potencial, como, por exemplo, serapilheira de plantas superiores do manguezal.

No anexo 1, apresenta-se o cromatograma obtido com a análise da amostra do tempo 3 (t_3), coletada 27 dias após o início do experimento de decomposição. Ainda, são apresentados os espectros de massas obtidos, de alguns lipídios identificados, representando todas as principais classes lipídicas encontradas. Os dados brutos gerados neste trabalho, bem como todos os resultados obtidos a partir deles, encontram-se no anexo 2. Os fatores climatológicos relevantes na decomposição estudada e a variação das médias de maré se encontram no anexo 3. Desta forma, os fatores podem ser acessados mais facilmente, quando da necessidade de comparação com outros estudos.

Considerações Finais

Neste estudo, *Spartina alterniflora* se decompôs mais rapidamente do que o observado por outros autores. Isto pode ser atribuído ao fato de estar-se em uma região subtropical, mais quente do que as regiões temperadas do hemisfério norte, onde a maioria dos trabalhos da área é feita e, de ter-se usado gramínea viva, portanto, mais nutritiva do que o material senescente avaliado em outros trabalhos.

As três fases de decomposição dos detritos de marismas foram observadas com clareza. A primeira fase, de perda de compostos solúveis, foi evidenciada pelos rápidos decréscimos iniciais de peso seco, peso seco sem cinzas e teor de nitrogênio do material em decomposição. A segunda fase, caracterizada pelo enriquecimento microbiano dos detritos, foi marcada pelo aumento gradual do teor de nitrogênio ao longo do tempo. Este aumento deve ser devido à fixação de nitrogênio atmosférico por meio dos microorganismos e à incorporação de nitrogênio dissolvido. Embora este nitrogênio incorporado não se deva exclusivamente ao enriquecimento da comunidade microbiana, parte, certamente pode ser atribuído a isto. A terceira fase, atribuída à fragmentação ou consumo dos detritos por heterótrofos maiores, ocorreu simultaneamente à fase dois e se caracterizou pelas contínuas diminuições do peso seco e peso seco sem cinzas, ao longo do tempo. Este resultado está de acordo com o esperado, já que acredita-se que os detritos sejam consumidos desde com pouca ou nenhuma ação microbiana, até enriquecidos por microorganismos.

Dentre os diversos lipídios identificados, mas não passíveis de quantificação, encontram-se os ácidos *iso* e *anteiso*-15:0. Concentrações elevadas destes ácidos podem se dever à algas unicelulares e bactérias heterotróficas. Embora não se tenha podido quantificar tais ácidos, acredita-se que suas concentrações tenham aumentado com a decomposição. Os esteróis são outra classe de lipídios identificada, que não pode ser quantificada. A quantificação destes lipídios seria interessante, pois embora certamente, ao menos parte, se deva a *Spartina alterniflora*, uma alteração na proporção entre os esteróis $C_{29}\Delta^5$, $C_{28}\Delta^5$ e $C_{29}\Delta^{5,22}$ com o tempo poderia se dever a uma contribuição importante de algas unicelulares.

Atribui-se os oito lipídios quantificados, ácidos 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e metóxi cinâmico e, álcool-C32, à *Spartina alterniflora*. Devido à natureza

recalcitrante desses lipídios, foi observado um aumento de suas concentrações, com relação ao peso seco sem cinzas, simultaneamente à primeira fase da degradação dos detritos. Posteriormente, acompanhando as segunda e terceira fases da decomposição, os teores destes lipídios foram progressivamente diminuindo. A exceção foi o ácido metóxi cinâmico que, devido à sua alta polaridade, teve uma diminuição rápida de seu teor no primeiro momento. Embora atribua-se todos esses lipídios ao material vegetal, nenhum deles pode ser considerado um biomarcador de *Spartina alterniflora*, em função de haver, no próprio sistema estuarino estudado, outras fontes desses lipídios em potencial, como por exemplo, serapilheira de plantas superiores do manguezal.

As informações geradas sobre a marisma da enseada de Ratonés são importantes por estar-se gerando dados específicos para este sistema, localizado em região com clima subtropical, possibilitado a comparação com dados obtidos para marismas de outras regiões. Desta maneira, amplia-se as informações sobre as marismas, contribuindo na identificação das similaridades globais desses ecossistemas e de suas especificidades locais.

Recomendações

O teor de nitrogênio foi bem determinado titrimetricamente e o perfil esperado, foi observado. Desta forma, recomenda-se a utilização do método analítico utilizado, para sistemas semelhantes.

Muitos lipídios identificados não puderam ser quantificados devido à co-eluição com outros compostos. Ainda, alguns lipídios não puderam ser identificados pelo mesmo motivo. Assim, recomenda-se que seja feito um fracionamento prévio das amostras por cromatografia em coluna. Este método de separação permite que um número muito maior de dados, tanto qualitativos quanto quantitativos, seja gerado.

Por fim, para que se possa verificar a presença de compostos ligados ao material em decomposição por ligações lábeis por ataque ácido ou básico, recomenda-se que, além dos lipídios livres, os ligados também sejam extraídos. Desta maneira, ganha-se muito mais informações sobre o sistema, bem como pode-se detectar a presença de compostos como os ácidos β -hidroxilados, biomarcadores específicos de bactérias.

Referências Bibliográficas

- Adam, P. 1990. Saltmarsh Ecology. 1^a ed. University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Alongi, D. 1998. Coastal Ecosystem Processes. 1^a ed. CRC Press LLC, Estados Unidos.
- Ausloos, P., Clifton, C., Lias, S.G., Shamim, A. e Stein, S.E. 1994. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database. Versão para computador 4.5 (MS 4.5). National Institute of Standards and Technology, Estados Unidos.
- Ayres, G.H. 1978. Analisis Quimico Cuantitativo. 2^a ed. Ediciones del Castillo, S.A., Madri, Espanha.
- Baird, D.C. 1995. Experimentation – An Introduction to Measurement Theory and Experiment Design. 3^a ed. Prentice-Hall, Nova Jersey, Estados Unidos.
- Bronz, I. 2002. Development of Fatty Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography, and Related Techniques – Review. *Analytica Chimica Acta* 465: 1-37.
- Burkholder, P.R. e Bornside, G.H. 1957. Decomposition of Marsh Grass by Aerobic Marine Bacteria. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 84 (5): 366-383.
- Bussolo Jr., G. 2002. Contribuição ao Estudo Morfosedimentar do Fundo da Enseada de Ratoles, Ilha de Santa Catarina-SC-Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- Buth, G.J.C. e De Wolf, L. 1985. Decomposition of *Spartina anglica*, *Elytrigia pungens* and *Halimione portulacoides* in a Dutch Salt March with Faunal and Habitats Influences. *Vegetatio* 62: 337-355.
- Canuel, E.A. e Martens, C.S. 1993. Seasonal Variations in the Sources and Alteration of Organic Matter Associated with Recently-Deposited Sediments. *Organic Geochemistry* 20 (5): 563-577.
- Cordazzo, C.V. e Seeliger, U. 1988. Guia Ilustrado da Vegetação Costeira no Extremo Sul do Brasil. Ed. da FURG, Rio Grande, Brasil.

- Costa, C.S.B. e Davy, A.J. 1992. Coastal Saltmarsh Communities of Latin America, Capítulo 12 *in* Coastal Plant Communities of Latin America. Seeliger, U. (ed). Academic Press, Inc., Estados Unidos.
- Cunniff, P., ed. 1999. Official Methods of Analysis of AOAC International - Volume 1. 16^a ed. The Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, Estados Unidos.
- De Leeuw, J.W., Rijpstra, I.C. e Nienhuis, P.H. 1995. Free and Bound Fatty Acids and Hydroxy Fatty Acids in the Living and Decomposing Eelgrass *Zostera marina* L. *Organic Geochemistry* 23 (8): 721 – 728.
- Eder, K. 1995. Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids Methyl Esters – Review. *Journal of Chromatography B* 671: 113 - 131.
- Eglinton, G. e Hunneman, D.H. 1968. Gas Chromatographic – Mass Spectrometric Studies of Long Chain Hydroxy Acids – III The Mass Spectra of the Methyl Esters Trimethylsilyl Ethers of Aliphatic Hydroxy Acids. A Facile Method of Double Bond Location. *Organic Mass Spectrometry* 1: 593-611.
- Franson, M. A. H., ed. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20^a ed. United Book Press, Inc., Baltimore, Estados Unidos.
- Goad, L. J. e Akihisa, T. 1997. Analysis of Sterols. Blackie Academic and Professional, Londres, Inglaterra.
- Goossens, H., Rijpstra, W.I.C., Düren, R.R., De Leeuw, J.W. e Scheck, P.A. 1986. Bacterial Contribution to Sedimentary Organic Matter; a Comparative Study of Lipids Moieties in Bacteria and Recent Sediments. *Organic Geochemistry* 10: 683-696.
- Kawamura, K., Ishiwatari, R. e Ogura, K. 1987. Early Diagenesis Of Organic Matter in the Water Column and Sediments: Microbial Degradation and Resynthesis of Lipids in Lake Haruma. *Organic Geochemistry* 11 (4): 251-264.
- Lide, D.R., ed. 1995. CRC Handbook of Chemistry and Physics: a Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data: 1995 – 1996. 76^a ed. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.

- Meyer, P. C. e Zünd, R. E. 1993. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Nova Iorque, Estados Unidos.
- Nass, R., Markstädter, C., Hauke, V. e Riederer, M. 1998. Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Plant Cuticular Waxes Containing Long-chain Aldehydes. *Phytochemical Analysis* 9: 112-118.
- Panitz, C.M. 1986. *Produção e Decomposição de Serapilheira no Mangue do Rio Itacorubi, Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil (27° 35' S – 48° 31' W)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, Brasil.
- Pomeroy, L.R. e Wiegert, R.G., eds. 1981. *The Ecology of a Salt Marsh*. 1ª ed. Springer-Verlag, Inc., Nova Iorque, Estados Unidos.
- Reitz, R. 1981. *Flora Ilustrada Catarinense – I. Parte: As Plantas. Fascículo: Gramínea*. 1ª ed. Oficinas Gráficas da IOESC, Itajaí, Brasil.
- Rodrigues Neto, R. 1998. *Determinação de Feopigmentos, Proteínas Solúveis e Lipídios em Sedimentos da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina-SC*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- Schultz, D. M. e Quinn, J. G. 1973. Fatty acid Composition of Organic Detritus from *Spartina alterniflora*. *Estuarine and Coastal Marine Science* I: 177-190.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. e Morrill, T.C. 1994. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil.
- Soriano-Sierra, E.J. 1992. *Etude Ecologique de Marais Salés du Bassin d'Arcachon: Structure et Evolution de Schorres, Production e Degradation de Leur Vegetation et Echanges de Matières Particulaires entre les Schorres et le Bassin*. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux I. Bordeaux, França.
- Squiers, E. R. e Good, R.E. 1974. Seasonal Changes in the Productivity, Caloric Content, and Chemical Composition of a Population of Salt-March Cord-Grass (*Spartina alterniflora*). *Chesapeake Science* 15 (2): 63-71.

- Teal, J.M. 1962. Energy Flow in the Salt Marsh Ecosystem of Georgia. *Ecology* 43 (4): 614-624.
- Volkman, J.K. 1986. A Review of Sterol Markers for Marine and Terrigenous Organic Matter. *Organic Geochemistry* 9 (2): 83-99.
- Volkman, J.K., Johns, R.B., Gillan, F.T., Perry, G.J. e Bavor Jr., H.I. 1980. Microbial Lipids of na Intertidal Sediment – I. Fatty Acids and Hydrocarbons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44: 1133-1143.
- White, D. S. e Howes, B. L. 1994. Nitrogen Incorporation into Decomposing Litter of *Spartina alterniflora*. *Limnology and Oceanography* 38 (1): 133-140.
- Wieder, R.K. e Lang, G.E. 1982. A Critique of the Analytical Methods Used in Examining Decompositional Data Obtained from Litter Bags. *Ecology* 63 (6): 1.636-1.642.
- Williams, S., ed. 1984. Official Methods of Analysis of AOAC International. 14^a ed. The Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, Estados Unidos.

Anexo 1

Apresenta-se o cromatograma da amostra coletada 27 dias após o início de experimento (t_3), onde indica-se os picos referentes aos lipídios quantificados. A seguir, são apresentados os espectros de massas obtidos para alguns representantes das principais classes de lipídios encontradas, bem como suas estruturas químicas.

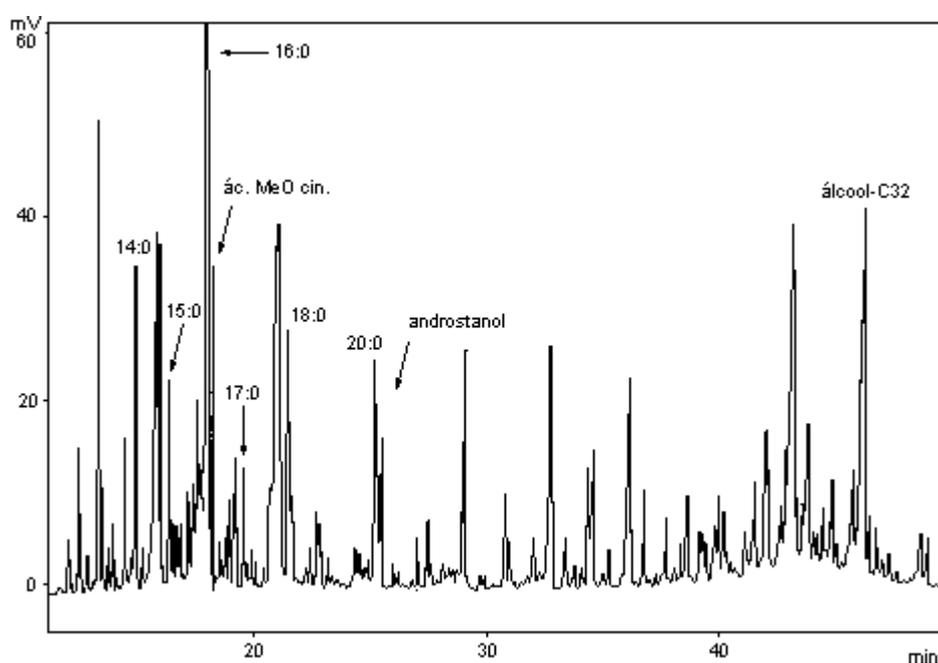


Figura 13. Cromatograma da amostra t_3 . Os picos referentes aos ácidos 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0 e metóxi cinâmico, álcool-C32 e padrão usado na quantificação, são indicados.

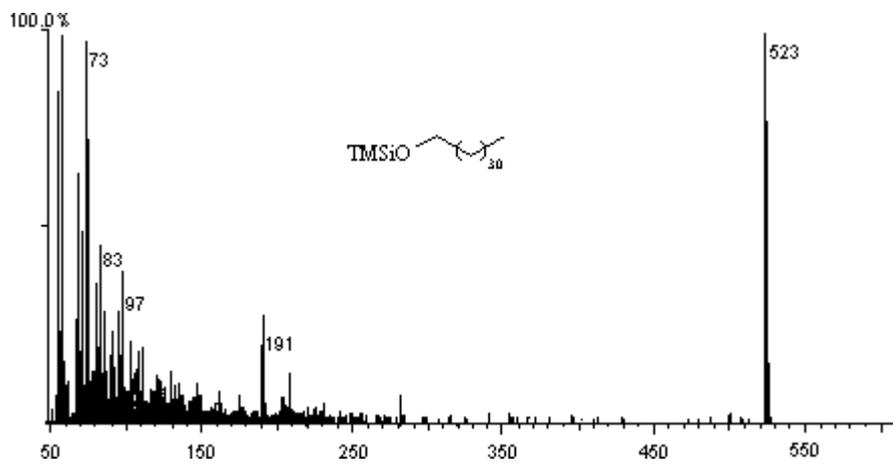


Figura 14. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do dotriacontanol, ou álcool-C32, e sua estrutura química.

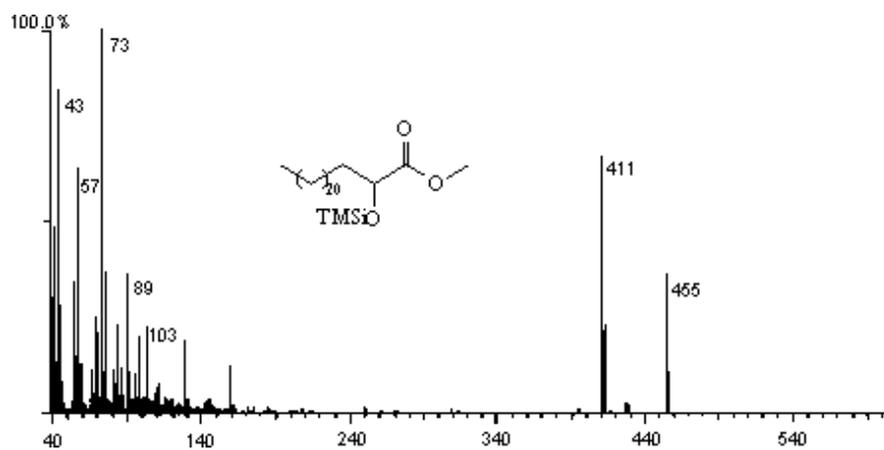


Figura 15. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do ácido α -hidróxi lignocérico, ou 2-OH-24:0, metilado, bem como sua estrutura química.

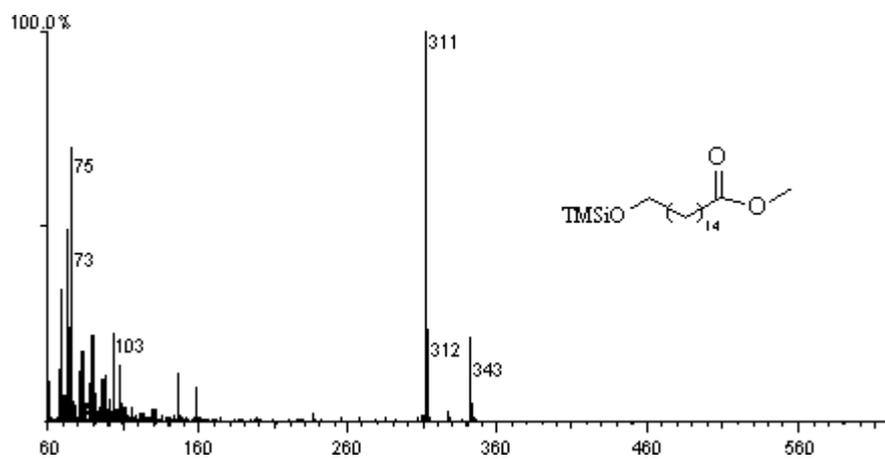


Figura 16. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do ácido ω -hidróxi palmítico, ou 16-OH-16:0, metilado, bem como sua estrutura química.

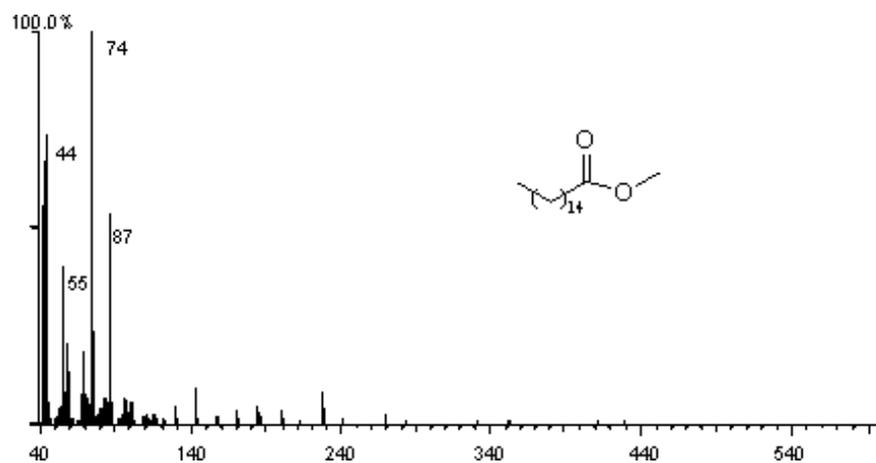


Figura 17. Espectro de massas e estrutura do éster metílico do ácido palmítico, ou 16:0.

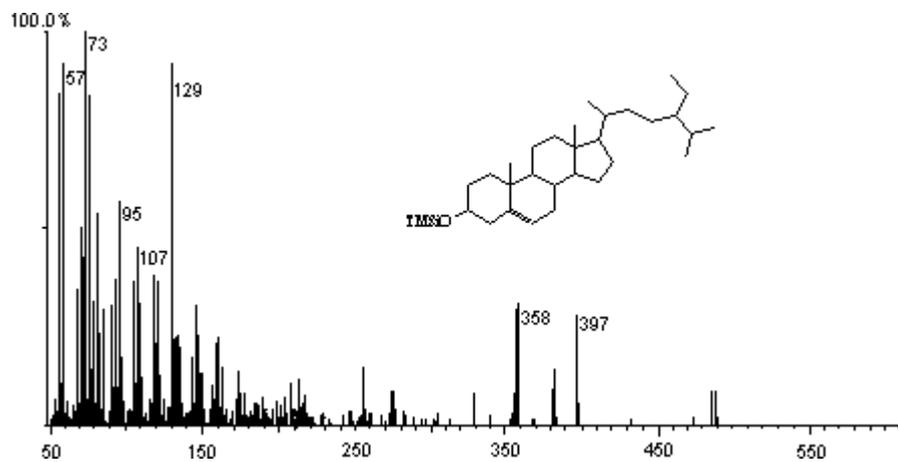


Figura 18. Espectro de massas do éter de trimetil-silila do 5-sitosten-3-ol, ou $C_{29}\Delta^5$, bem como sua estrutura química.

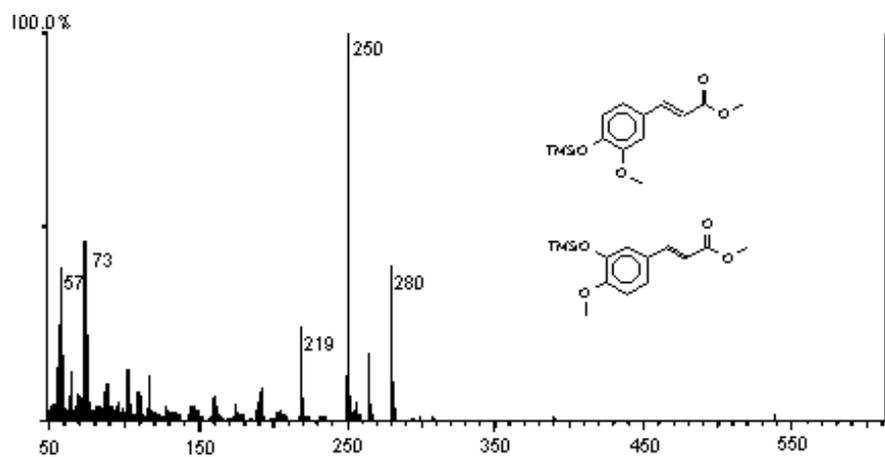


Figura 19. Espectro de massas do éster metílico do ácido metóxi cinâmico e suas possíveis estruturas, em função da incerteza da localização da metoxila e da trimetil-siloxila.

Anexo 2

Neste anexo, apresenta-se os dados brutos do trabalho e os resultados calculados a partir desses dados.

Peso seco

Tabela 7. Dados obtidos para a determinação do peso seco.

Amostra	Massa Original / g	Massa Residual / g	Peso Seco / % p/p
t ₀ -1	-	-	100,0 ± 0,4
t ₀ -2	-	-	100,0 ± 0,4
t ₀ -3	-	-	100,0 ± 0,4
t ₁ -0730	40,12 ± 0,08	36,61 ± 0,08	91,3 ± 0,4
t ₁ -0915	40,21 ± 0,08	34,85 ± 0,08	86,7 ± 0,4
t ₁ -8448	39,80 ± 0,08	35,23 ± 0,08	88,5 ± 0,4
t ₂ -4654	39,56 ± 0,08	34,57 ± 0,08	87,4 ± 0,4
t ₂ -2164	40,98 ± 0,08	36,96 ± 0,08	90,2 ± 0,4
t ₂ -4070	39,21 ± 0,08	35,79 ± 0,08	91,3 ± 0,4
t ₃ -8820	40,80 ± 0,08	27,88 ± 0,08	68,3 ± 0,3
t ₃ -2333	40,39 ± 0,08	29,56 ± 0,08	73,2 ± 0,3
t ₃ -3431	41,91 ± 0,08	33,04 ± 0,08	78,8 ± 0,3
t ₄ -7828	38,94 ± 0,08	20,38 ± 0,08	52,3 ± 0,3
t ₄ -3229	40,31 ± 0,08	28,10 ± 0,08	69,7 ± 0,3
t ₄ -2702	38,82 ± 0,08	26,11 ± 0,08	67,3 ± 0,3
t ₅ -1344	38,90 ± 0,08	16,37 ± 0,08	42,1 ± 0,3
t ₅ -1642	40,88 ± 0,08	26,80 ± 0,08	65,6 ± 0,3
t ₅ -1945	40,64 ± 0,08	13,88 ± 0,08	34,2 ± 0,3
t ₆ -3638	41,24 ± 0,08	11,16 ± 0,08	27,1 ± 0,2
t ₆ -7662	39,60 ± 0,08	14,75 ± 0,08	37,2 ± 0,3
t ₆ -0879	38,94 ± 0,08	10,70 ± 0,08	27,5 ± 0,3

A incerteza da balança de prato externo utilizada foi considerada como sendo o dobro da menor leitura, 0,02 g.

Teor de cinzas

Determinação da incerteza da balança analítica

Tabela 8. Determinação da incerteza da balança analítica para a primeira série de pesagens.

Cadinho	Pesagem 1 / g	Pesagem 2 / g
1	40,62802	40,62775
2	43,31680	43,31705
3	37,70005	37,70033
4	41,88550	41,88623
5	40,54495	40,54368
6	40,74628	40,74652

A mediana (arredondada) das diferenças entre as pesagens 1 e 2 dos três primeiros cadinhos apresentou valor de 0,0003 g. A mediana (arredondada) das diferenças entre as pesagens 1 e 2 dos três últimos cadinhos apresentou valor de 0,0007 g. Portanto, o valor 0,0007 g foi selecionado como sendo a incerteza da balança analítica, Sartorius GMBH Göttingen modelo 2434, para o período.

Tabela 9. Determinação da incerteza da balança analítica para a segunda série de pesagens.

Cadinho	Pesagem 1 / g	Pesagem 2 / g
1	40,62847	40,62835
2	37,70032	37,70104
3	43,31775	43,31507
4	40,74586	40,74661
5	40,54315	40,54500
6	41,88599	41,88582

A mediana (arredondada) das diferenças entre as pesagens 1 e 2 dos três primeiros cadinhos apresentou valor de 0,0007 g. A mediana (arredondada) das diferenças entre as pesagens 1 e 2 dos três últimos cadinhos apresentou valor de 0,0008 g. Portanto, o valor 0,0008 g foi selecionado como sendo a incerteza da balança analítica, Sartorius GMBH Göttingen modelo 2434, para o período.

Tabela 10. Dados obtidos para a determinação do teor de cinzas.

Amostra	Massa de Amostra / g	Massa de Cinzas / g	Teor de Cinzas / % p/p
t ₀ -1	0,0999 ± 0,0007	0,0172 ± 0,0007	17 ± 2
t ₀ -2	0,1000 ± 0,0007	0,0159 ± 0,0007	16 ± 2
t ₀ -3	0,0999 ± 0,0007	0,0155 ± 0,0007	16 ± 2
t ₁ -0730	0,1009 ± 0,0007	0,0268 ± 0,0007	27 ± 2
t ₁ -0915	0,0996 ± 0,0007	0,0219 ± 0,0007	22 ± 2
t ₁ -8448	0,1001 ± 0,0007	0,0267 ± 0,0007	27 ± 2
t ₂ -4654	0,0997 ± 0,0008	0,0325 ± 0,0008	33 ± 2
t ₂ -2164	0,1001 ± 0,0008	0,0313 ± 0,0008	31 ± 2
t ₂ -4070	0,1001 ± 0,0008	0,0260 ± 0,0008	26 ± 2
t ₃ -8820	0,0999 ± 0,0008	0,0297 ± 0,0008	30 ± 2
t ₃ -2333	0,1000 ± 0,0008	0,0231 ± 0,0008	23 ± 2
t ₃ -3431	0,1004 ± 0,0008	0,0324 ± 0,0008	32 ± 2
t ₄ -7828	0,1002 ± 0,0007	0,0313 ± 0,0007	31 ± 2
t ₄ -3229	0,0995 ± 0,0007	0,0415 ± 0,0007	42 ± 2
t ₄ -2702	0,1002 ± 0,0007	0,0384 ± 0,0007	38 ± 2
t ₅ -1344	0,1000 ± 0,0007	0,0459 ± 0,0007	46 ± 2
t ₅ -1642	0,1001 ± 0,0007	0,0558 ± 0,0007	56 ± 2
t ₅ -1945	0,0999 ± 0,0007	0,0485 ± 0,0007	49 ± 2
t ₆ -3638	0,1002 ± 0,0007	0,0543 ± 0,0007	54 ± 2
t ₆ -7662	0,1006 ± 0,0007	0,0505 ± 0,0007	50 ± 2
t ₆ -0879	0,1002 ± 0,0007	0,0486 ± 0,0007	49 ± 2

Peso seco sem cinzas

O peso seco sem cinzas foi obtido pela diminuição da quantidade de cinzas, do peso seco.

Tabela 11. Cálculos para a obtenção do peso seco sem cinzas.

Amostra	Massa Original sem Cinzas / g	Massa Residual sem Cinzas / g	Peso Seco sem Cinzas / % p/p
t ₀ -1	-	-	100 ± 6
t ₀ -2	-	-	100 ± 6
t ₀ -3	-	-	100 ± 6
t ₁ -0730	33,7 ± 0,9	26,7 ± 0,9	79 ± 5
t ₁ -0915	33,8 ± 0,9	27,2 ± 0,8	80 ± 5
t ₁ -8448	33,4 ± 0,9	25,7 ± 0,8	77 ± 4
t ₂ -4654	33,3 ± 0,9	23,2 ± 0,8	70 ± 4
t ₂ -2164	34,4 ± 0,9	25,5 ± 0,9	74 ± 5
t ₂ -4070	32,9 ± 0,9	26,5 ± 0,8	81 ± 5
t ₃ -8820	34,3 ± 0,9	19,5 ± 0,7	57 ± 4
t ₃ -2333	33,9 ± 0,9	22,8 ± 0,7	67 ± 4
t ₃ -3431	35 ± 1	22,5 ± 0,8	64 ± 4
t ₄ -7828	32,7 ± 0,9	14,1 ± 0,5	43 ± 3
t ₄ -3229	33,9 ± 0,9	16,3 ± 0,7	48 ± 3
t ₄ -2702	32,6 ± 0,9	16,2 ± 0,7	50 ± 4
t ₅ -1344	32,7 ± 0,9	8,9 ± 0,5	27 ± 2
t ₅ -1642	34,4 ± 0,9	11,8 ± 0,7	34 ± 3
t ₅ -1945	34,1 ± 0,9	7,1 ± 0,4	21 ± 2
t ₆ -3638	34,6 ± 0,9	5,2 ± 0,4	15 ± 2
t ₆ -7662	33,3 ± 0,9	7,4 ± 0,4	22 ± 2
t ₆ -0879	32,7 ± 0,9	5,5 ± 0,4	17 ± 2

Teor de nitrogênio

Por analogia à maior das incertezas determinadas para a balança analítica, Sartorius GMBH Göttingen modelo 2434, as incertezas das balanças, Metler-Toledo AB 2045 e Shangping FA 2004, foram estimadas em 1 mg.

Soluções-padrão de ácido clorídrico

Tabela 12. Padronização da solução 1 de ácido clorídrico.

Titulação	Massa de Na ₂ CO ₃ / g	Volume de Solução- Padrão / mL	Concentração / mol L ⁻¹
1	0,131 ± 0,001	24,63 ± 0,01	0,1003 ± 0,0009
2	0,134 ± 0,001	24,90 ± 0,01	0,1016 ± 0,0008

Concentração da solução-padrão-1 de ácido clorídrico: (0,1010 ± 0,0009) mol L⁻¹. A incerteza da bureta automática usada foi considerada como sendo a menor leitura, 0,01 mL.

Tabela 13. Padronização da solução 2 de ácido clorídrico.

Titulação	Massa de Na ₂ CO ₃ / g	Volume de Solução- Padrão / mL	Concentração / mol L ⁻¹
1	0,135 ± 0,001	24,88 ± 0,01	0,1025 ± 0,0008
2	0,127 ± 0,001	23,50 ± 0,01	0,1021 ± 0,0009
3	0,127 ± 0,001	23,44 ± 0,01	0,1024 ± 0,0009

Concentração da solução-padrão-2 de ácido clorídrico: (0,1024 ± 0,0009) mol L⁻¹.

Contribuição de nitrogênio devido ao solvente, papel e reagentes usados

Tabela 14. Dados obtidos para avaliar a contribuição de nitrogênio devido ao solvente, papel e reagentes usados.

Branco	Volume de Solução-Padrão / mL	Concentração da Solução-Padrão / mol L ⁻¹	Número de Mols de Nitrogênio / mol	Massa de Nitrogênio / g
1	0,39 ± 0,01	0,1024 ± 0,0009	(4,0 ± 0,2)·10 ⁻⁵	0,00056 ± 0,00003
2	0,3 ± 0,1	0,1010 ± 0,0009	(3 ± 1)·10 ⁻⁵	0,0004 ± 0,0001
3	0,3 ± 0,1	0,1010 ± 0,0009	(3 ± 1)·10 ⁻⁵	0,0004 ± 0,0001

Respectivamente, número de mols e massa de nitrogênio devidos ao solvente, papel e reagentes usados: (3 ± 1)·10⁻⁵ mol e (0,0004 ± 0,0001) g. A incerteza da bureta usada foi considerada como sendo a menor leitura, 0,1 mL.

Exatidão do método

Tabela 15. Dados obtidos para verificação da exatidão do método, com relação a ausência de perda de sais de amônio.

Positivo	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ Pesada / g	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ Real* / g	Volume de Solução-Padrão / mL	Massa de (NH ₄) ₂ SO ₄ Observada / g	Exatidão / %
1*	0,120 ± 0,001	0,119 ± 0,001	17,86 ± 0,01	0,119 ± 0,003	100 ± 3
2**	0,119 ± 0,001	0,118 ± 0,001	18,0 ± 0,1	0,119 ± 0,003	101 ± 3
3**	0,117 ± 0,001	0,116 ± 0,001	17,7 ± 0,1	0,116 ± 0,003	100 ± 3

* Levado em consideração o grau de pureza do (NH₄)₂SO₄, de 99%.

* Usada a solução-padrão-2 de ácido clorídrico, de concentração: (0,1024 ± 0,0009) mol L⁻¹.

** Usada a solução-padrão-1 de ácido clorídrico, de concentração: (0,1010 ± 0,0009) mol L⁻¹.

Exatidão do método, com relação à ausência de perdas de sais de amônio: (100 ± 3)%.

Teores de nitrogênio

Tabela 16. Dados obtidos para a determinação do teor de nitrogênio.

Amostra	Massa de Amostra / g	Teor de Cinzas / % p/p	Volume de Solução-Padrão / mL	Massa de Nitrogênio Corrigida* / g	Teor de Nitrogênio** / % p/p
t ₀ -1**	0,602 ± 0,001	16 ± 2	6,2 ± 0,1	0,0084 ± 0,0004	1,7 ± 0,1
t ₀ -2**	0,598 ± 0,001	16 ± 2	6,2 ± 0,1	0,0084 ± 0,0004	1,7 ± 0,1
t ₀ -3**	0,597 ± 0,001	16 ± 2	6,1 ± 0,1	0,0082 ± 0,0004	1,6 ± 0,1
t ₁ -0730°	0,601 ± 0,001	27 ± 2	4,30 ± 0,01	0,0058 ± 0,0002	1,32 ± 0,08
t ₁ -0915°	0,603 ± 0,001	22 ± 2	3,56 ± 0,01	0,0047 ± 0,0002	1,00 ± 0,06
t ₁ -8448°	0,602 ± 0,001	27 ± 2	3,96 ± 0,01	0,0053 ± 0,0002	1,20 ± 0,07
t ₂ -4654°	0,601 ± 0,001	33 ± 2	4,01 ± 0,01	0,0054 ± 0,0002	1,35 ± 0,08
t ₂ -2164°	0,610 ± 0,001	31 ± 2	4,19 ± 0,01	0,0056 ± 0,0002	1,33 ± 0,08
t ₂ -4070°	0,613 ± 0,001	26 ± 2	3,95 ± 0,01	0,0053 ± 0,0002	1,18 ± 0,07
t ₃ -8820**	0,597 ± 0,001	30 ± 2	4,2 ± 0,1	0,0055 ± 0,0002	1,31 ± 0,08
t ₃ -2333°	0,596 ± 0,001	23 ± 2	3,95 ± 0,01	0,0053 ± 0,0002	1,15 ± 0,07
t ₃ -3431**	0,597 ± 0,001	32 ± 2	4,4 ± 0,1	0,0058 ± 0,0002	1,42 ± 0,08
t ₄ -7828°	0,596 ± 0,001	31 ± 2	4,06 ± 0,01	0,0054 ± 0,0002	1,29 ± 0,08
t ₄ -3229°	0,597 ± 0,001	42 ± 2	3,72 ± 0,01	0,0049 ± 0,0002	1,4 ± 0,1
t ₄ -2702°	0,599 ± 0,001	38 ± 2	3,78 ± 0,01	0,0050 ± 0,0002	1,35 ± 0,09
t ₅ -1344°	0,598 ± 0,001	46 ± 2	3,84 ± 0,02	0,0051 ± 0,0002	1,6 ± 0,1
t ₅ -1642°	0,605 ± 0,001	56 ± 2	3,24 ± 0,01	0,0042 ± 0,0002	1,6 ± 0,1
t ₅ -1945°	0,599 ± 0,001	42 ± 2	3,73 ± 0,01	0,0050 ± 0,0002	1,4 ± 0,1
t ₆ -3638°	0,599 ± 0,001	54 ± 2	3,23 ± 0,01	0,0042 ± 0,0002	1,5 ± 0,1
t ₆ -7662°	0,610 ± 0,001	50 ± 2	3,91 ± 0,01	0,0052 ± 0,0002	1,7 ± 0,1
t ₆ -0879°	0,601 ± 0,001	49 ± 2	3,73 ± 0,01	0,0050 ± 0,0002	1,6 ± 0,1

* Descontada a contribuição de nitrogênio do solvente, papel e reagentes usados.

** Teor de nitrogênio percentual, com relação ao peso seco sem cinzas.

° Usada a solução-padrão-2 de ácido clorídrico, de concentração: (0,1024 ± 0,0009) mol L⁻¹.

** Usada a solução-padrão-1 de ácido clorídrico, de concentração: (0,1010 ± 0,0009) mol L⁻¹.

Lipídios

Soluções-padrão

A solução-padrão de 5 α -colestano foi preparada segundo os dados apresentados na tabela abaixo. As soluções-padrão de 5 α -androstan-3 β -ol e de hexadecano deuterado utilizadas, por sua vez, já estavam prontas.

Tabela 17. Preparação da solução-padrão de 5 α -colestano.

Padrão	Massa de Padrão / mg	Massa de Solvente / g	Densidade do Tolueno* / g cm ⁻³	Concentração da Solução-Padrão / g L ⁻¹
5 α -colestano	1,01 \pm 0,01	0,9746 \pm 0,0003	0,865	0,896 \pm 0,009

* A 20°C (Lide, 1995).

Concentração da solução-padrão de 5 α -androstan-3 β -ol em tolueno: 704,92 μ g g⁻¹. Admitiu-se que as balanças usadas tenham sido as mesmas e chegou-se, portanto, na concentração de (0,605 \pm 0,009) g L⁻¹, para esta solução. A solução de hexadecano deuterado apresentava concentração de aproximadamente 500 mg L⁻¹. A incerteza da balança analítica Metler-Toledo, modelo AT21, foi considerada como sendo 10 vezes a menor leitura, 0,01 mg.

Picos devidos à contaminações

Tabela 18. Áreas e tempos de retenção dos picos referentes à contaminações e padrões.

Pico	Tempo de Retenção – Branco 1 / min.	Área – Branco 1	Tempo de Retenção – Branco 2 / min	Área – Branco 2
1	13,262	11.630	13,249	4.813
2	16,565	5.135	16,540	1.845
3	17,833	4.280	17,811	1.248
4	21,286	3.640	21,256	1.153
5	-	-	23,593 – 24,713	29.720
Androstanol	25,422	134.919	25,391	122.045
Colestano	34,543	115.412	34,537	140.096

Para cada amostra, a média das duas áreas do pico 3 (2.764) foi descontada da área do pico do ácido 16:0. O mesmo foi feito com a média das áreas do pico 4 (2.397), com relação ao pico referente ao ácido 18:0. Neste caso, contudo, nem sempre o desconto se fazia necessário, em função da variação do tempo de retenção do pico do ácido 18:0 de amostra para amostra.

Determinação da incerteza associada às áreas obtidas por cromatografia a gás

Na tabela abaixo, são apresentadas as áreas, de cinco lipídios selecionados, obtidas pela análise da amostra do t_0 em triplicata. As médias destas áreas e seus desvios-padrão foram calculados. A incerteza percentual mostrada na tabela diz respeito ao percentual das áreas representado pelos desvios-padrão.

Tabela 19. Determinação da incerteza associada às áreas obtidas por cromatografia a gás.

Lipídio	Área – Análise 1	Área – Análise 2	Área – Análise 3	Média das Áreas	Incerteza / %
Ác. 14:0	77.120	123.736	406.054	202.303 ± 145.325	72
Ác. MeO Cinâmico	230.375	344.791	678.040	417.735 ± 189.898	45
Androstanol	92.058	95.284	260.754	149.365 ± 78.775	53
Colestano	52.576	81.592	151.788	95.319 ± 41.650	44
Álcool-C32	126.018	210.392	633.192	323.201 ± 221.887	69

Mediana das incertezas percentuais: 53%. De maneira a tornar o valor consistente, foi feito seu arredondamento para 50%.

Escolha do padrão

Tabela 20. Escolha do padrão para a determinação quantitativa dos teores de lipídio.

Amostra	Tempo / dias	Área do Pico do Androstanol	Área do Pico do Colestano
t ₀	0	92.058	52.576
t ₁ -0730	7	59.457	48.673
t ₂ -2164	14	151.503	171.560
t ₃ -2333	27	69.512	63.508
t ₄ -2702	60	192.825	218.512
t ₅ -1344	144	83.091	73.287
t ₆ -3638	207	157.042	148.739

Utilizou-se a incerteza calculada, de 50%, como sendo a incerteza associada às áreas dos picos.

Incerteza da determinação quantitativa dos lipídios

Tabela 21. Determinação da incerteza da razão A_i/A_p .

Lipídio	Área – Análise 1*	Área – Análise 2**	Área – Análise 3***	Incerteza / %
Ác. 14:0	77.120	123.736	406.054	24
Ác. 15:0	47.050	77.834	149.260	21
Ác. 16:0	969.962	1.527.781	3.546.070	17*
Ác. MeO Cinâmico	230.375	344.791	678.040	17
Ác. 17:0	43.857	68.045	164.469	16
Ác. 18:0	103.365	167.434	368.683	18
Ác. 20:0	65.523	96.776	270.669	16
Álcool-C32	126.018	210.392	633.192	23

* Área do pico do androstanol (A_p) 92.058.

** Área do pico do androstanol (A_p) 95.284.

*** Área do pico do androstanol (A_p) 260.754.

* O valor 2.764, referente às contaminações, foi descontado de cada uma das áreas.

As razões A_i/A_p foram calculadas. Posteriormente, suas médias e desvios-padrão também foram calculados. Os percentuais das médias, representados pelos desvios-padrão, foram tomados como sendo as incertezas percentuais. A mediana destas oito incertezas, arredondada de forma a torná-la consistente, apresentou valor de 20%.

Determinação da incerteza da balança analítica

Tabela 22. Determinação da incerteza da balança analítica.

Tubo de Ensaio	Pesagem 1 / g	Pesagem 2 / g
1	17,8168	17,8169
2	18,2480	18,2483
3	19,3123	19,3127

A mediana das diferenças entre as massas obtidas nas pesagens 1 e 2 apresentou valor de 0,3 mg. Considera-se este valor como sendo a incerteza da balança analítica da marca Bel Engineering usada.

Massas das amostras

Tabela 23. Massas das amostras usadas nas análises de lipídios.

Amostra	Massa Pesada / g	Teor de Cinzas / % p/p	Massa de Amostra sem Cinzas / g
t ₀	0,5067 ± 0,0003	16 ± 2	0,43 ± 0,01
t ₁ -0730	0,4914 ± 0,0003	27 ± 2	0,36 ± 0,01
t ₂ -2164	0,4904 ± 0,0003	31 ± 2	0,34 ± 0,01
t ₃ -2333	0,4908 ± 0,0003	23 ± 2	0,38 ± 0,01
t ₄ -2702	0,4917 ± 0,0003	38 ± 2	0,30 ± 0,01
t ₅ -1344	0,5074 ± 0,0003	46 ± 2	0,28 ± 0,01
t ₆ -3638	0,4990 ± 0,0003	54 ± 2	0,23 ± 0,01

À todas as amostras foram adicionados (40 ± 2) µL de solução-padrão de androstanol.

Quantificação dos lipídios

Tabela 24. Dados obtidos para a amostra do t_0 .

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / μg	Concentração* / $\mu\text{g g}^{-1}$
Ác. 14:0	77.120	14,926	19 ± 6	40 ± 10
Ác. 15:0	47.050	16,304	12 ± 3	28 ± 8
Ác. 16:0**	969.962	18,110	260 ± 70	600 ± 200
Ác. MeO				
Cinâmico	230.375	18,300	60 ± 20	140 ± 50
Ác. 17:0	43.857	19,537	12 ± 3	28 ± 8
Ác. 18:0	103.365	21,432	26 ± 7	60 ± 20
Ác. 20:0	65.523	25,124	17 ± 4	40 ± 10
Álcool-C32	126.018	45,942	34 ± 10	80 ± 30

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 92.058.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

Tabela 25. Dados obtidos para a amostra do t_1 .

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / μg	Concentração* / $\mu\text{g g}^{-1}$
Ác. 14:0	96.910	14,933	40 ± 10	110 ± 30
Ác. 15:0	46.301	16,307	19 ± 6	50 ± 20
Ác. 16:0**	716.690	18,069	290 ± 70	800 ± 200
Ác. MeO				
Cinâmico	81.423	18,193	30 ± 10	80 ± 30
Ác. 17:0	41.653	19,530	17 ± 4	50 ± 10
Ác. 18:0***	105.400	21,401	40 ± 10	110 ± 30
Ác. 20:0	81.072	25,122	30 ± 10	80 ± 30
Álcool-C32	170.085	45,961	70 ± 20	190 ± 60

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 59.457.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

*** Deve ser descontado o valor de 2.397 referente aos contaminantes.

Tabela 26. Dados obtidos para a amostra do t₂.

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / µg	Concentração* / µg g ⁻¹
Ác. 14:0	99.829	14,961	17 ± 4	50 ± 10
Ác. 15:0	69.167	16,353	12 ± 3	40 ± 10
Ác. 16:0**	967.135	18,151	140 ± 40	400 ± 100
Ác. MeO				
Cinâmico	162.194	18,297	26 ± 7	80 ± 20
Ác. 17:0	70.590	19,596	11 ± 3	30 ± 10
Ác. 18:0	186.114	21,503	29 ± 7	90 ± 20
Ác. 20:0	206.265	25,260	30 ± 10	90 ± 30
Álcool-C32	601.006	46,301	100 ± 30	300 ± 100

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 151.503.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

Tabela 27. Dados obtidos para a amostra do t₃.

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / µg	Concentração* / µg g ⁻¹
Ác. 14:0	81.374	14,931	29 ± 7	80 ± 20
Ác. 15:0	57.149	16,323	19 ± 6	50 ± 20
Ác. 16:0**	606.320	18,057	220 ± 70	600 ± 200
Ác. MeO				
Cinâmico	89.505	18,194	30 ± 10	80 ± 30
Ác. 17:0	38.245	19,535	14 ± 4	40 ± 10
Ác. 18:0***	102.239	21,396	34 ± 10	90 ± 30
Ác. 20:0	91.812	25,139	30 ± 10	80 ± 30
Álcool-C32	149.224	45,966	50 ± 10	130 ± 30

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 69.512.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

*** Deve ser descontado o valor de 2.397 referente aos contaminantes.

Tabela 28. Dados obtidos para a amostra do t₄.

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / µg	Concentração* / µg g ⁻¹
Ác. 14:0	139.445	14,967	17 ± 4	60 ± 20
Ác. 15:0	84.549	16,368	11 ± 3	40 ± 10
Ác. 16:0**	676.271	18,123	80 ± 20	270 ± 80
Ác. MeO				
Cinâmico	148.930	18,287	19 ± 6	60 ± 20
Ác. 17:0	77.376	19,607	10 ± 3	30 ± 10
Ác. 18:0***	192.641	21,492	24 ± 7	80 ± 30
Ác. 20:0	190.500	25,262	24 ± 7	80 ± 30
Álcool-C32	683.209	46,079 - 46,298	80 ± 20	270 ± 80

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 192.825.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

*** Deve ser descontado o valor de 2.397 referente aos contaminantes

Tabela 29. Dados obtidos para a amostra do t₅.

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / µg	Concentração* / µg g ⁻¹
Ác. 14:0	58.309	14,912	17 ± 4	60 ± 20
Ác. 15:0	28.378	16,290	8 ± 2	29 ± 8
Ác. 16:0**	270.530	17,954	80 ± 20	290 ± 80
Ác. MeO				
Cinâmico	84.297	18,127	24 ± 7	90 ± 30
Ác. 17:0	23.251	19,501	7 ± 2	25 ± 8
Ác. 18:0***	57.498	21,333	17 ± 4	60 ± 20
Ác. 20:0	62.187	25,106	17 ± 4	60 ± 20
Álcool-C32	207.653	45,999	60 ± 20	210 ± 80

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 83.091.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

*** Deve ser descontado o valor de 2.397 referente aos contaminantes.

Tabela 30. Dados obtidos para a amostra do t₆.

Lipídio	Área do Pico	Tempo de Retenção / min.	Massa* / µg	Concentração* / µg g ⁻¹
Ác. 14:0	63.234	14,923	10 ± 3	40 ± 10
Ác. 15:0	40.625	16,311	6 ± 2	30 ± 10
Ác. 16:0**	396.711	17,999	60 ± 20	300 ± 100
Ác. MeO				
Cinâmico	96.005	18,165	14 ± 4	60 ± 20
Ác. 17:0	30.171	19,527	5 ± 1	22 ± 5
Ác. 18:0***	90.003	21,378	14 ± 4	60 ± 20
Ác. 20:0	77.921	25,155	12 ± 3	50 ± 20
Álcool-C32	181.548	46,011	29 ± 7	130 ± 40

* Relativa à massa de amostra sem cinzas.

• Obtida a partir da área do androstanol: 157.042.

** Deve ser descontado o valor de 2.764 referente aos contaminantes.

*** Deve ser descontado o valor de 2.397 referente aos contaminantes.

Anexo 3

Os fatores climatológicos, como: umidade relativa e temperatura do ar, ventos, precipitação pluviométrica, insolação e evaporação, são apresentados sob a forma gráfica para o período em que o experimento foi realizado. Os dados foram fornecidos pelo CLIMERH / Empresa Agropecuária de Difusão da Tecnologia de Santa Catarina - EPAGRI. As médias das amplitudes de marés também são apresentadas para o referido período. Os dados foram disponibilizados pelo Departamento Nacional de Hidrologia para o porto de Florianópolis.

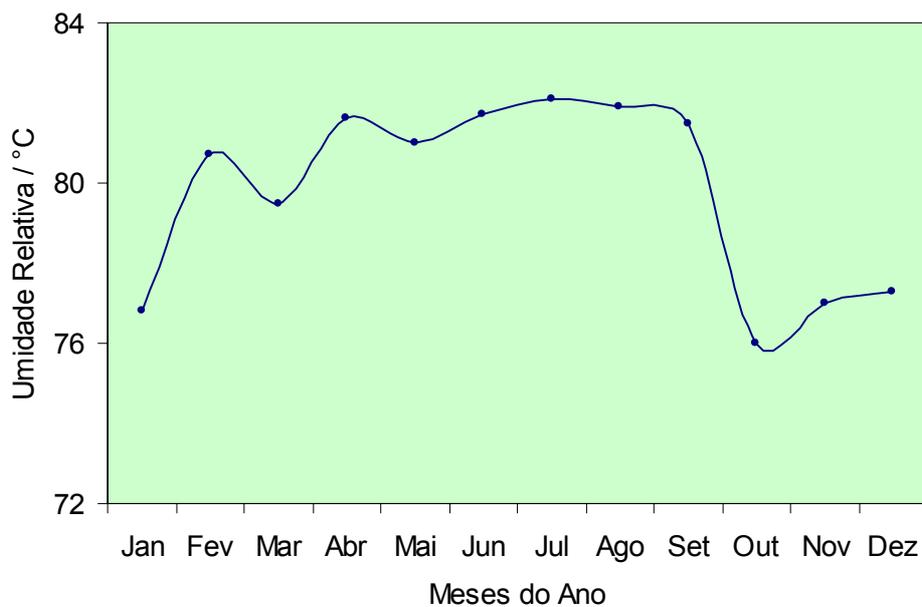


Figura 20. Variação mensal da umidade relativa do ar em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

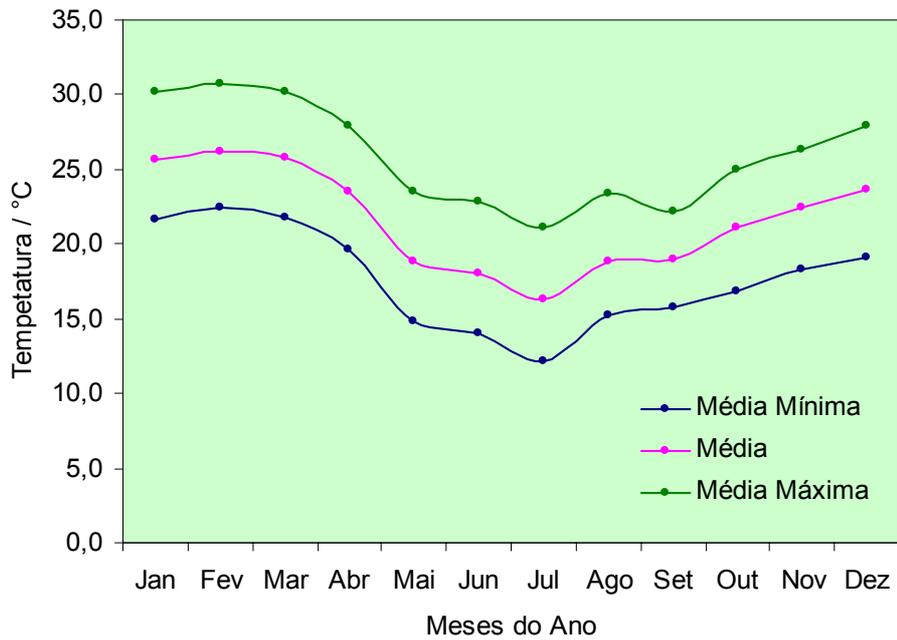


Figura 21. Variação mensal das temperaturas do ar média, mínima e máxima em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

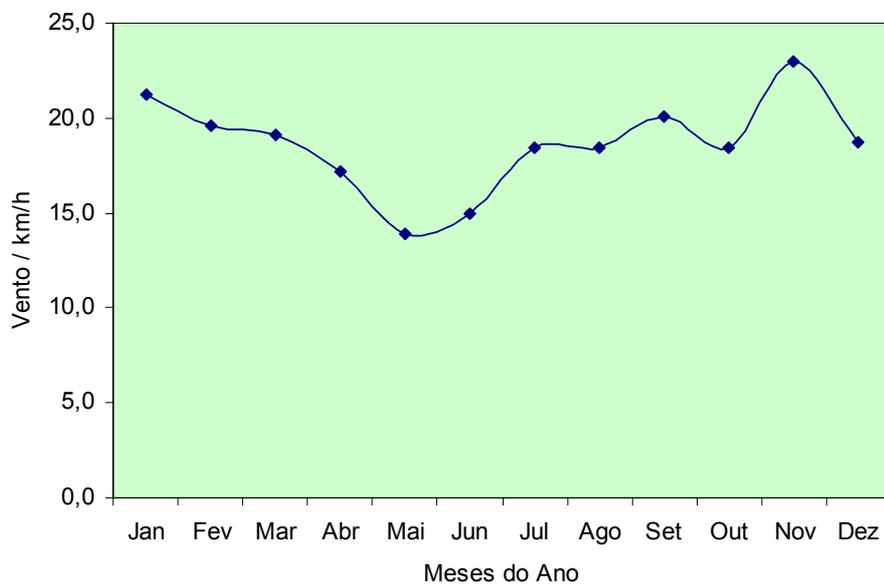


Figura 22. Variação mensal da velocidade média do vento máxima em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

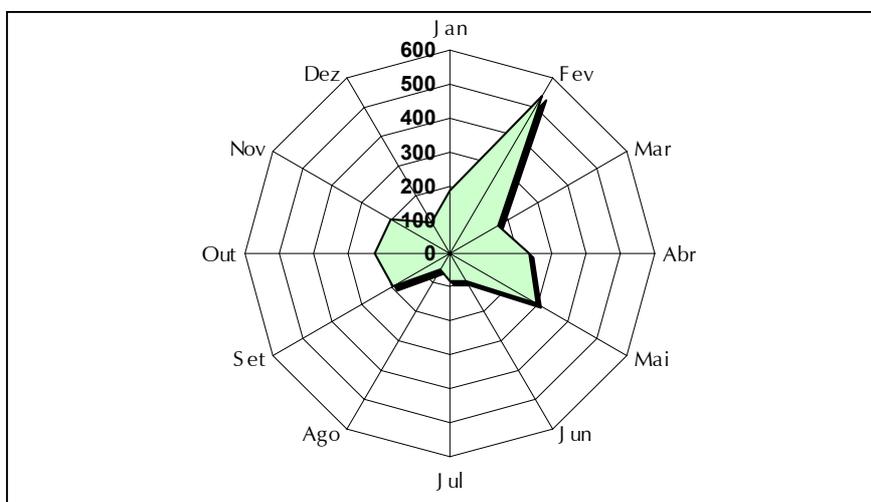


Figura 23. Variação mensal da altura pluviométrica (mm) em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

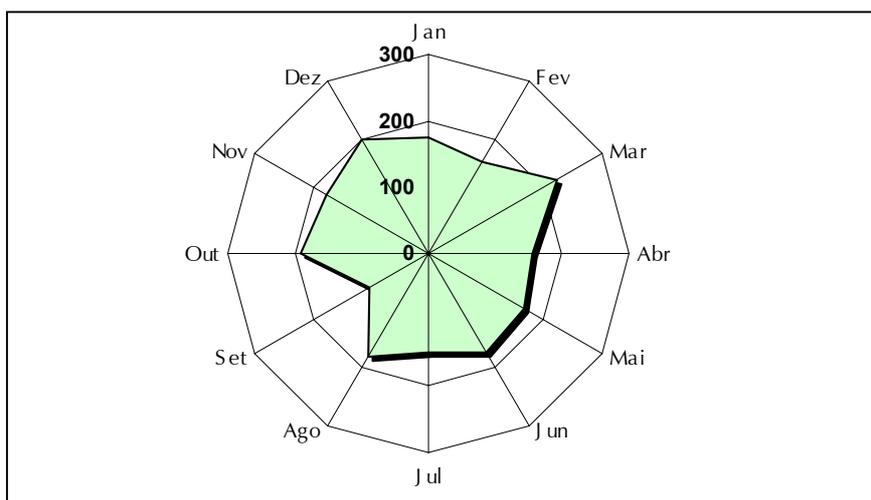


Figura 24. Variação mensal na distribuição das horas de insolação em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

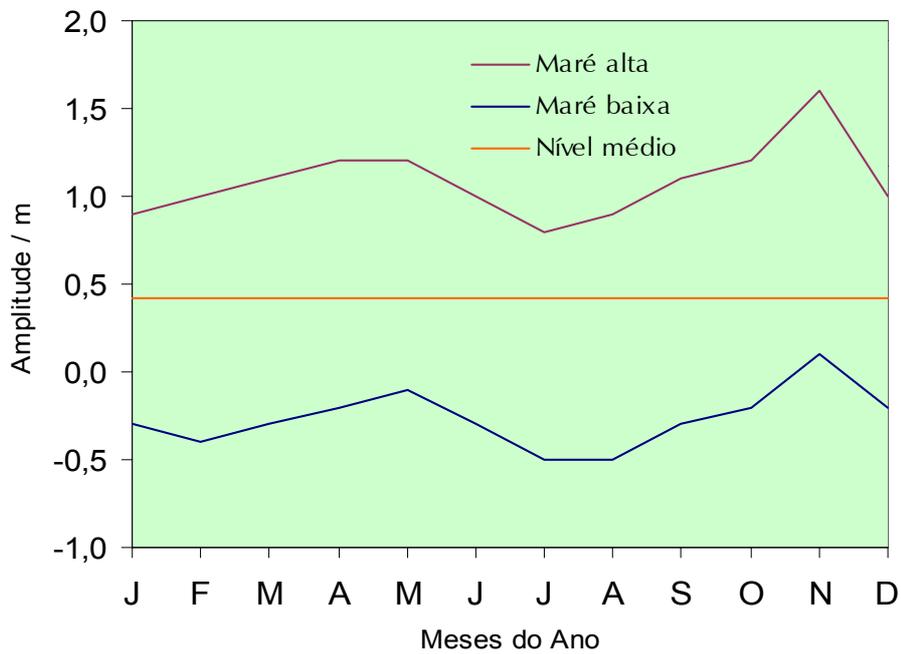


Figura 25. Variação mensal dos valores médios da amplitude de marés em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

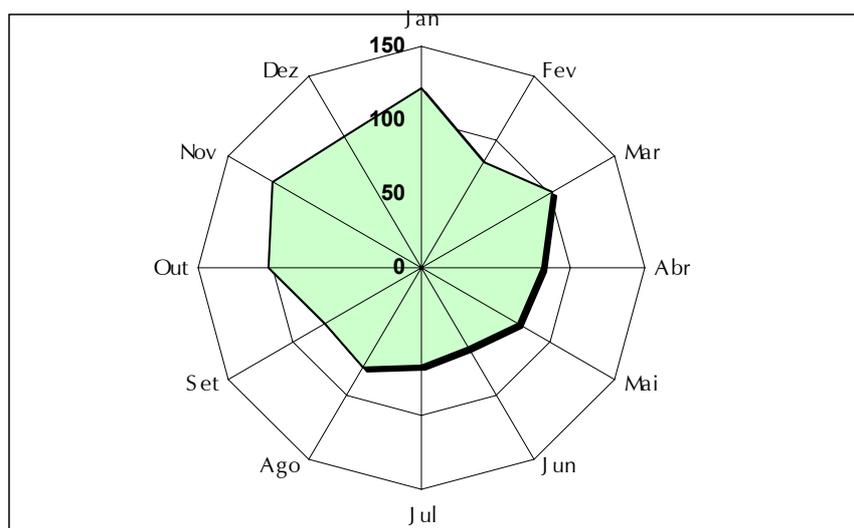


Figura 26. Variação mensal da evaporação (mm) em 2001, para a Ilha de Santa Catarina/SC, Brasil.

Fim