



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**USO DE BIOMARCADORES GEOQUÍMICOS NA AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO ANTROPOGÊNICA NA ENSEADA DE
PORTO BELO, SC.**

ISADORA DALLA VECCHIA

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

ISADORA DALLA VECCHIA

**USO DE BIOMARCADORES GEOQUÍMICOS NA AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO ANTROPOGÊNICA NA ENSEADA DE PORTO BELO, SC.**

Relatório apresentado ao Departamento
de Química da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial da
disciplina de Estágio Supervisionado II
(QMC 5512)

Orientador: Professor Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Co-Orientador: MSc. Cesar Alexandro da Silva

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

ISADORA DALLA VECCHIA

**USO DE BIOMARCADORES GEOQUÍMICOS NA AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO ANTROPOGÊNICA NA ENSEADA DE PORTO BELO, SC.**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira - UFSC

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke - UFSC

Dra. Hadla Souza Ferreira – UFSC

Florianópolis – SC
Novembro/2009

“O aprendizado nunca termina.

Não existe parte da vida que não contenha lições.

Se você está vivo, há lições para aprender”.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família (Pai, Mãe, Rodrigo, Samara, Francine, João e as pequenas Betina e Luana) por todo amor e apoio durante toda minha vida ou parte dela. Vocês são meus exemplos, cada um a sua maneira. Amo vocês!

Ao meu orientador professor Dr. Luiz A.S. Madureira, agradeço pelas horas de ensinamentos passados, pela paciência e pela confiança depositada em mim desde o princípio.

Ao meu co-orientador e querido amigo, Cesar, muito obrigada por sua amizade, confiança, dedicação e, principalmente, por tudo que pude aprender contigo nesses últimos anos.

Gostaria de agradecer também aos colegas e ex-colegas dos laboratórios 216 e vizinhos do 214: Evandro, Morgana, Martinho, Rafael, Renato, Vanessa, Luis, Eduardo e em especial a Cristiane que me ensinou os primeiros passos dentro do laboratório e a Silvane, pelo alto astral diário. Obrigada!

Aos amigos que fiz durante esses últimos 5 anos, muito obrigada por todo apoio, amizade, pelas horas de risadas e, claro, de estudos durante esse tempo. Em especial, gostaria de agradecer às pessoas que convivem ou conviveram comigo por mais tempo: Alessandra, Fabiane, Renata, Caroline, Helena, Misael, Rodrigo, Andressa, Silmara (...) e a todos que eu não pude mencionar, mas que de alguma forma fizeram parte desses 5 anos e que, com certeza, merecem meu agradecimento. Obrigada!

Ao meu melhor amigo e nas horas vagas namorado, Lucas. Meu companheiro das horas boas e ruins, meu assessor para assuntos geográficos e computacionais, motivo de orgulho e admiração diária. Obrigada por tudo, Luquinhas! E não posso deixar de fazer um agradecimento especial aos pais do Lucas e também do Bruno, Nice e ao Paulo. Obrigada por todo carinho!

Agradeço também ao pessoal da Central de Análises do Departamento de Química, tanto pelas análises feitas, como pela paciência que tiveram comigo nas inúmeras vezes que eu bati àquela porta. Obrigada!

Obrigada a todos os professores que passaram por minha graduação e que contribuíram para minha formação acadêmica e também ao CNPq e à UFSC.

OBRIGADA!

RESUMO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar possíveis contaminações na Enseada de Porto Belo - SC em virtude do grande afluxo de turistas na região e conseqüente aumento da carga de esgoto doméstico. Foram analisadas amostras de sedimento e água, coletadas em março/2008. Em alguns pontos de amostragem os valores da distribuição dos hidrocarbonetos alifáticos, conciliados com índices como o índice preferencial de carbono (IPC) e a razão entre a mistura complexa não resolvida e o somatório de hidrocarbonetos ($MCNR/\Sigma HC$), apresentaram perfis característicos de aportes por derivados de petróleo. Este fato foi confirmado nas amostras de água, onde foram detectadas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) relativas a ambientes efetivamente afetados, sendo estes dados associados às atividades náuticas. A razão entre os esteróis (coprostanol/colestanol) sugeriu uma possível contaminação do sedimento por efluente doméstico, possivelmente causada pelo aumento da atividade turística nesta época.

PALAVRAS-CHAVE: biomarcadores, hidrocarbonetos, HPA, esteróis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma parcial de uma amostra típica de sedimentos não contaminados por derivados de petróleo.²

Figura 2: Elevação na linha base do cromatograma característica de ambientes contaminados por derivados de petróleo.

Figura 3: Conversão de fitol a pristano e fitano.

Figura 4: Principais estruturas dos hopanos e suas clivagens.

Figura 5: Estrutura química geral dos esteróis.

Figura 6: Esteróis característicos da presença de aporte de matéria orgânica proveniente de esgoto doméstico.

Figura 7: Lista dos 16 HPAs prioritários listados pela USEPA (*Environmental Protection Agency of United States*).

Figura 8: Localização dos cinco pontos de amostragem.

Figura 9: Reação de derivatização via silanização utilizando BSTFA.

Figura 10: Curva analítica para o hidrocarboneto $n\text{-C}_{28}$.

Figura 11: Distribuição dos hidrocarbonetos alifáticos acima de $n\text{-C}_{22}$ da amostra PB1a.

Figura 12: Quantidades relativas de alguns esteróis encontrados nas amostras.

Figura 13: Comparativo entre as razões coprostanol/colestanol(epicoprostanol) nas amostras.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas dos locais coletados.

Tabela 2: Reagentes e solventes usados juntamente com sua origem e pureza.

Tabela 3: Condições de análise para os hidrocarbonetos alifáticos por CG-DIC.

Tabela 4: Condições de análise para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hopanos e esteróis por CG-EM.

Tabela 5: Teores de carbono orgânico total (COT), nitrogênio (N) e razão entre eles (COT/N).

Tabela 6: Concentrações ($\mu\text{g.g}^{-1}$ e $\mu\text{g.L}^{-1}$) dos hidrocarbonetos alifáticos e índices das amostras de sedimento (PBs) e água (PBa).

Tabela 7: Principais hopanos encontrados e suas concentrações relativas.

Tabela 8: Somatório dos HPA detectados nas amostras de sedimento (ng.g^{-1}) e água (ng.L^{-1}) e algumas razões entre eles.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANT – Antraceno

CG-DIC – Cromatografia a gás com detector por ionização em chama

CG-EM – Cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas.

CHN - Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio

COT – Carbono orgânico total

DCM – diclorometano

F1 - Fração 1

F2 - Fração 2

F3 - Fração 3

FEN - Fenantreno

FIT- Fitano

FLUO – Fluoranteno

HA - Hidrocarbonetos Alifáticos

ΣHC - Hidrocarbonetos totais

HCl - Ácido clorídrico

HPA - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IPC - Índice Preferencial de Carbono

LQAG - Laboratório de Química Ambiental e Geoquímica Orgânica

MCNR - Mistura Complexa Não Resolvida

MeOH - metanol

m/m - massa/massa

m/z - massa/carga

N - nitrogênio

PA - Pureza Analítica

PIR - pireno

PRI - pristano

UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí

US-EPA - do inglês *Environmental Protection Agency of United States*

v/v - volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Geoquímica Orgânica	12
2.2. Biomarcadores Geoquímicos	12
2.3. Hidrocarbonetos Alifáticos	13
2.3.1. <i>n</i> -Alcanos	13
2.3.2. Alcanos isoprenóides	15
2.3.3. Hopanos	16
2.3.4. Esteróis.....	17
2.4. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA	18
2.5. Cromatografia a gás	20
2.5.1. Detector por ionização em chama (DIC)	20
2.5.2. Espectrometria de massas (EM)	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivo específico	22
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
4.1. Amostragem	23
4.2. Equipamentos e reagentes	24
4.3. Limpeza da vidraria	25
4.4. Extração.....	25
4.4.1. Amostras de água.....	26
4.4.2. Tratamento do cobre	26
4.4.3. Amostras de sedimento	27
4.5. Análise elementar - CHN	27
4.6. Fracionamento	27
4.7. Silanização	28
4.8. Análise, identificação e quantificação	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Análise elementar - CHN	31
5.2. Hidrocarbonetos alifáticos.....	32
5.2.1. Alcanos	32
5.2.2. Hopanos	34
5.2.3. Esteróis.....	35
5.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA	37
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO A - Curvas analíticas para a quantificação dos HA.....	43
ANEXO B - Cromatogramas.....	44

1. INTRODUÇÃO

Localizada no litoral norte do estado de Santa Catarina, Porto Belo encontra-se na área de entorno a Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, e suas águas são influenciadas por duas correntes marítimas que implicam numa mudança de temperatura do mar passando de 27 °C durante o verão para 15 °C no inverno. Essas correntes marítimas aumentam a biodiversidade da região. Em função desta biodiversidade e de suas belezas locais a região recebe a cada ano um número maior de turistas.¹

Segundo dados da prefeitura municipal, a população de 11.141 habitantes tem seu número elevado para 60.000 até 100.000 pessoas na alta estação. Dentre as formas de turismo observadas em Porto Belo, uma em especial chama a atenção tanto pela beleza e imponência, quanto pelos danos que estes podem trazer: são os navios de cruzeiros, que encontraram na enseada o local ideal para ancoradouros.¹

Pensando nesse acréscimo de turistas que a cidade recebe a cada ano, assim como nos navios que agora circulam na enseada, a prefeitura municipal de Porto Belo, juntamente com o Ministério Público Estadual, a Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), propuseram um estudo ambiental para avaliar a situação atual da região.

Este estudo foi subdividido em várias áreas de interesse, ficando o grupo coordenado pelo professor Dr. Luiz Madureira, encarregado de avaliar o impacto ambiental por intermédio de compostos orgânicos usados como marcadores geoquímicos presentes em amostras de água e sedimentos da região.

Com os dados que foram obtidos neste trabalho, foi possível determinar a situação atual da enseada, estabelecendo assim condições de avaliar possíveis impactos futuros causados pelo movimento do transporte marítimo e aumento populacional intensificados na alta temporada.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Geoquímica Orgânica

A geoquímica orgânica é a ciência que visa elucidar o complexo estudo dos compostos orgânicos na geosfera. Estes compostos podem se incorporar em rochas sedimentares e permanecerem preservados durante eras geológicas, retornando ao ambiente naturalmente (pela extrusão natural de poços de petróleo) ou pela ação do homem.²

2.2. Biomarcadores Geoquímicos

Biomarcadores são moléculas orgânicas que possuem especificidade química e mesmo após sofrerem uma série de reações durante os processos diagenéticos, podem ser usadas para indicar seu precursor biológico.^{2,3}

Estas moléculas têm papel fundamental dentro da geoquímica orgânica, pois auxiliam de forma bastante eficaz, a elucidar as informações sobre eventos que ocorreram no passado nos locais onde estas foram coletadas e até mesmo sobre os eventos que possam ocorrer no futuro. Muitas indústrias petrolíferas fazem uso desses compostos para tentar prever hoje, quais locais serão propícios a formação de reservas de petróleo no futuro.⁴

Dentre os indicadores moleculares mais preservados estão os biomarcadores lipídicos, em sua maior parte na forma de hidrocarbonetos. Nos sedimentos aquáticos, os hidrocarbonetos são freqüentemente encontrados na forma de misturas complexas originárias de múltiplas fontes, cuja distinção é possível através do estudo combinado de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.²

2.3. Hidrocarbonetos Alifáticos

Por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos e por serem os compostos mais preservados, os hidrocarbonetos são de grande valia como indicadores dos níveis e origens (natural e antrópica) do material no ambiente, sendo divididos em: alcanos lineares, alcanos ramificados, como os alcanos

isoprenóides e compostos cíclicos, como os esteranos e hopanos. As principais fontes biológicas de hidrocarbonetos são: plantas terrestres, fitoplâncton, animais, bactérias, macroalgas e microalgas.⁵

2.3.1. *n*-Alcanos

Os alcanos lineares (*n*-parafinas), em amostras provenientes de ambientes aquáticos, possuem uma característica importante como biomarcadores que é a formação de dois grupos de cadeias ímpares: a primeira, com maior abundância de cadeias com 17 átomos de carbono (C_{17}) em relação aos alcanos $n-C_{15}$, $n-C_{19}$ e $n-C_{21}$, correspondente à contribuição autóctone de macro e microalgas; a segunda, com $n-C_{27}$, $n-C_{29}$ e $n-C_{31}$ predominando em relação às demais cadeias ímpares do $n-C_{23}$ ao $n-C_{33}$, correspondente ao aporte alotóctone de plantas vasculares terrestres (figura 1). Esta predominância desaparece para ambientes contaminados por petróleo e seus derivados.^{5,6}

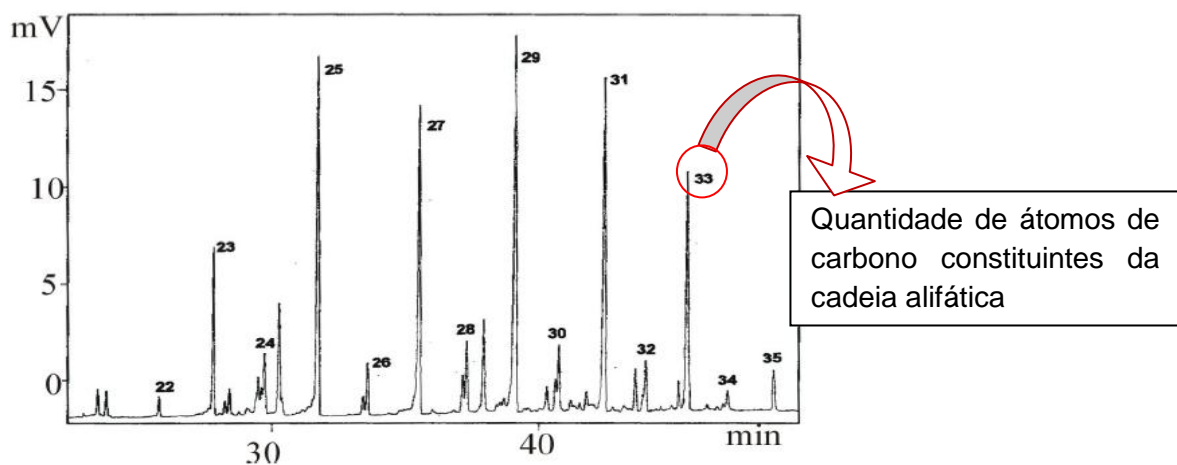


Figura 1: Cromatograma parcial de uma amostra típica de sedimentos não contaminados por derivados de petróleo.²

Para esta classe de compostos alguns índices podem ser usados para determinar sua origem como, por exemplo, o IPC– Índice Preferencial de Carbono (equação 1) – que se baseia justamente na diferença de concentração entre alcanos de cadeias ímpares e pares em ambientes que sofrem influência de diferentes aportes.

$$IPC = \frac{2(\sum \text{ímpares } C_{23} - C_{33})}{[\sum (\text{pares } C_{22} - C_{30}) + \sum (\text{pares } C_{24} - C_{34})]} \quad (\text{Equação 1})$$

Ambientes contaminados por derivados de petróleo frequentemente apresentam valores para este índice muito próximo a 1. Valores distantes da unidade caracterizam locais com aporte de hidrocarbonetos de origem biogênica.⁷

Com relação às análises ambientais, é de fundamental importância basear-se não apenas em uma razão ou índice, muitos outros devem ser usados antes de se supor um local como sendo contaminado. Sendo assim, um ótimo parâmetro usado nesse tipo de determinação, tanto em amostras de água quanto de sedimentos, pode ser obtido através de análises cromatográficas observando-se o surgimento de uma elevação característica na linha base do cromatograma (figura 2).

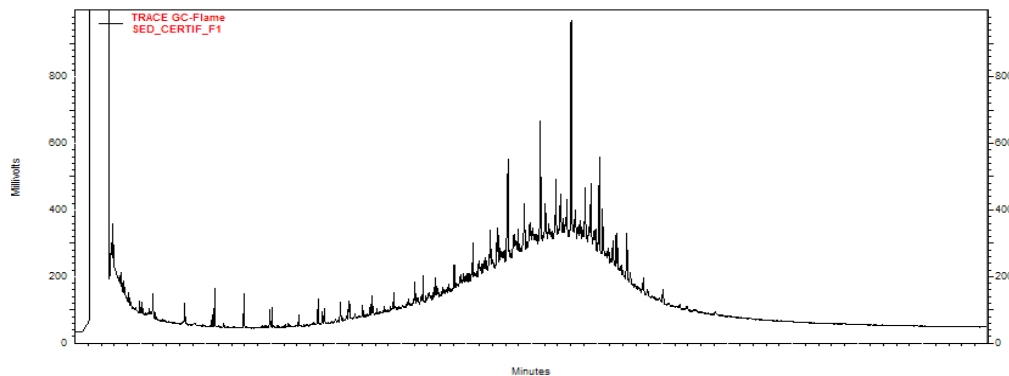


Figura 2: Elevação na linha base do cromatograma característica de ambientes contaminados por derivados de petróleo.

Esta elevação corresponde a uma mistura complexa de isômeros e homólogos de hidrocarbonetos ramificados e cíclicos (MCNR) provenientes de processos de biodegradação e que não pode ser resolvida por cromatografia unidimensional com coluna capilar. Baixos valores de MCNR (Mistura Complexa Não Resolvida) (<math><10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>) são atribuídos a locais considerados não contaminados por petróleo, onde essa MCNR é originária da degradação de hidrocarbonetos de algas.^{5,8}

2.3.2. Alcanos isoprenóides

Outra classe de compostos utilizados em avaliações ambientais são os alcanos isoprenóides, como o pristano (C_{19}) e fitano (C_{20}). Estes compostos são hidrocarbonetos ramificados, porém, possuem a peculiaridade de apresentar unidades isoprênicas sequenciais, onde, dependendo das condições do meio, o fitol (álcool constituente da clorofila) dará origem a um destes compostos. Meios mais oxidativos terão maior quantidade de pristano (PRIS) e ambientes mais redutores terão maior presença de fitano (FIT) (figura 3).^{5,9}

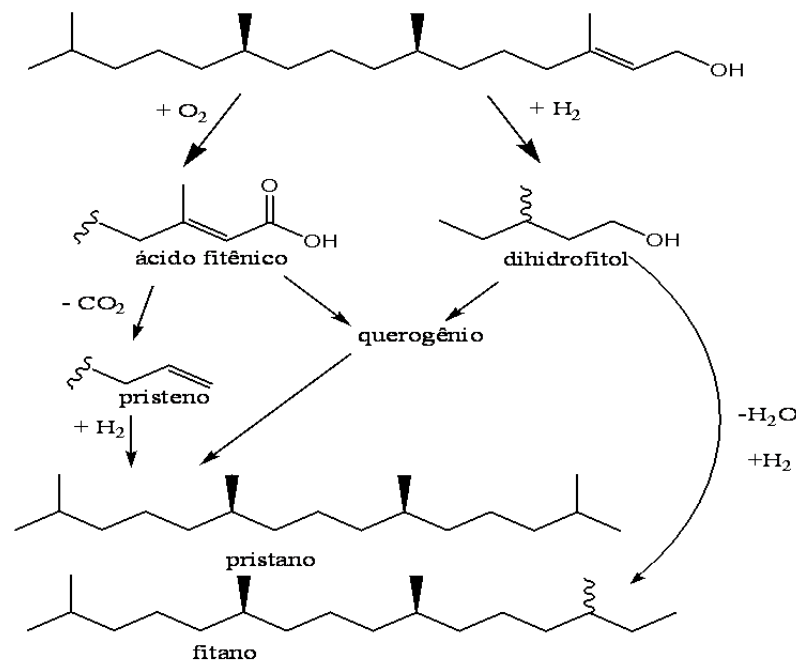


Figura 3: Conversão de fitol a pristano e fitano.¹⁰

A razão PRIS/FIT pode contribuir para a determinação de aportes petrogênicos no ambiente. Em ambientes considerados livres da influência deste óleo, o valor desta razão é maior do que 1 (entre 3 e 8). Deve-se, no entanto, prestar atenção especial às amostras que apresentarem valores menores ou iguais a 1, pois estes valores não são confiáveis, sendo necessária a utilização de outros parâmetros para atestar a contaminação.^{5,9}

2.3.3. Hopanos

A classe dos hopanos (figura 4) é também muito utilizada como ferramenta na avaliação ambiental motivada pela sua diversidade estereoquímica, podendo ocorrer em sedimentos e óleos com configurações $17\alpha(H)$ e $21\beta(H)$ – $\alpha\beta$ hopanos, $17\beta(H)$ e $21\alpha(H)$ – $\beta\alpha$ hopanos ou moretanos, $\beta\beta$ -hopanos e ainda com estereoquímica do carbono 22, S ou R, para os homólogos com mais de 31 átomos de carbono.¹¹

Apesar de sua distribuição em sedimentos e óleos ser muito semelhante, eles se tornam importantes, pois estão presentes em todas as eras geológicas que possuem relação com a formação do petróleo.¹¹

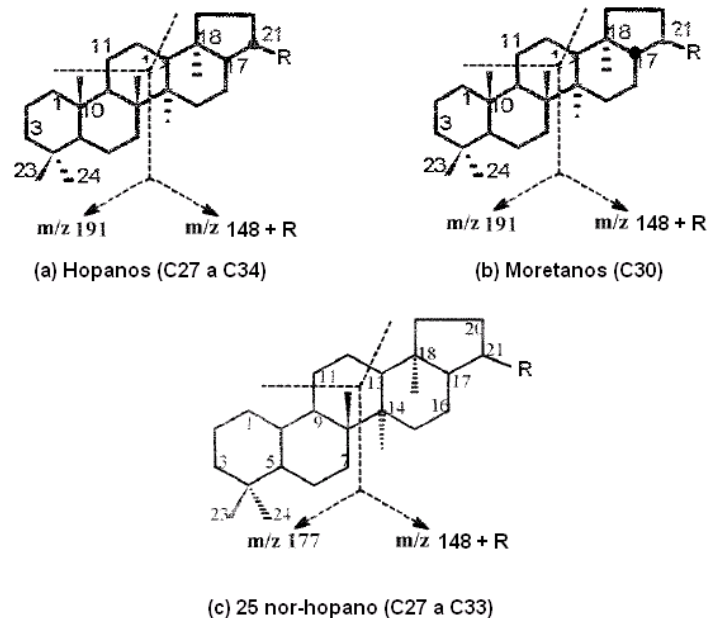


Figura 4: Principais estruturas dos hopanos e suas clivagens.

Segundo a literatura, o precursor dessa série é o bacteriohopanotetrol, principal constituinte da membrana celular das bactérias. Originalmente esse composto tem configuração $17\beta(H)$ e $21\beta(H)$, porém por ser termodinamicamente instável, este dá origem às configurações $17\alpha(H)$ e $21\beta(H)$ e $17\beta(H)$ e $21\alpha(H)$. Esta característica nos dá informações sobre a maturidade do óleo ou sedimento. Quanto mais maturado, maior será a concentração de hopanos com estereoquímica $17\alpha(H)$ e $21\beta(H)$. Com a maturação também aumenta a concentração dos hopanos com configuração 22S para homólogos com mais de 31 átomos de carbono, já que com a

maturação perde-se a preferência pelo isômero biológico 22R, que é a configuração termodinamicamente menos estável.^{11,12}

Outra razão aplicada, com grande frequência entre os hopanos, é a razão entre os isômeros Tm (17 α (H) - trisnor-hopano) e Ts (18 α (H) – trisnor-neo-hopano). A razão entre eles é extremamente dependente da temperatura a que são submetidos durante os processos catagênicos. Assim, é conveniente esperar que a concentração do isômero Ts seja muito maior em relação ao Tm quanto mais antigo for o sedimento formador do óleo encontrado.¹⁴

2.3.4. Esteróis

Compostos cíclicos alifáticos podendo ou não ter substituintes metílicos preferencialmente nas posições 10 e 13, contendo entre 27 e 29 átomos de carbono são chamados esteróis (figura 5). Estas substâncias são bastante estáveis, sendo facilmente acumuladas pelo sedimento.¹⁵

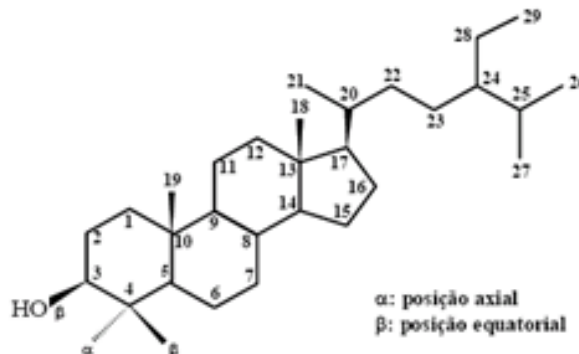


Figura 5: Estrutura química geral dos esteróis.¹⁶

Os esteróis têm origem tanto biológica quanto antrópica. Biologicamente, os principais responsáveis pela contribuição desses compostos são: plantas terrestres, que apresentam cadeias entre C₂₈ e C₂₉, tais como o campesterol (24 α -metilcolest-5-en-3 β -ol), β -sitosterol (24 α -etilcolest-5-en-3 β -ol) e o estigmasterol (24 α -etilcolest-5,22E-dien-3 β -ol); fitoplâncton, que normalmente apresentam cadeias com 28 carbonos; e o zooplâncton, (geralmente a classe dominante) que contém esteróis C₂₇, principalmente o colesterol (5-colesten-3 β -ol), entre outros.²

Com relação à contribuição antrópica, alguns esteróis são inseridos no ambiente devido principalmente ao lançamento de esgoto doméstico não tratado. Os mais usados na avaliação deste tipo de aporte são o coprostanol (5β (H) - colestano- 3β -ol) e o epicoprostanol ou colestanol (5β -colestano- 3α -ol), pois estes são compostos estranhos a ambientes marinhos.^{17,18}

O coprostanol é um esteroide de origem fecal, formado pela hidrogenação (redução) bacteriana do colesterol no intestino de animais superiores. Porém, alguns autores acreditam que o uso deste esteroide por si só não confirma a presença de contaminação por esgoto doméstico, pois este pode também ser produzido *in situ*, devido à degradação diagenética em ambientes anóxicos. Por este motivo tem-se proposto a razão entre o coprostanol e o epicoprostanol (figura 6) para avaliar a contaminação por efluentes domésticos.^{17,18}

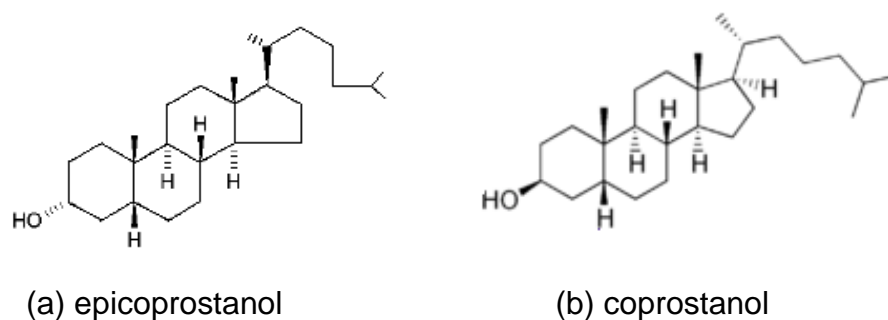


Figura 6: Esteróis característicos da presença de aporte de matéria orgânica proveniente de esgoto doméstico.

A razão coprostanol / epicoprostanol apresentando valores acima de 0,7 são considerados indicativos de contaminação por esgoto doméstico, enquanto que valores abaixo de 0,3 o ambiente pode ser considerado livre deste tipo de contaminação.^{2,19,20}

2.4. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA

Apresentando no mínimo dois anéis aromáticos condensados podendo ou não ter substituições por cadeias alifáticas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são inseridos no ambiente principalmente pela ação humana (Figura 7). O aporte natural destes compostos é relativamente baixo quando

comparado ao aporte antrópico. Entre as fontes biológicas, é possível citar a presença em alguns minerais e a sintetização por organismos, como algas e bactérias.^{9,21}

Uma das mais importantes causas de contaminação por HPA se dá via atmosfera devido à queima incompleta de combustíveis fósseis (origem pirogênica), o que é muito observado principalmente próximo a grandes centros urbanos. Outras possíveis fontes são: derrame acidental de petróleo e derivados (origem petrogênica) e o descarte de efluentes domésticos e industriais.^{22,23}

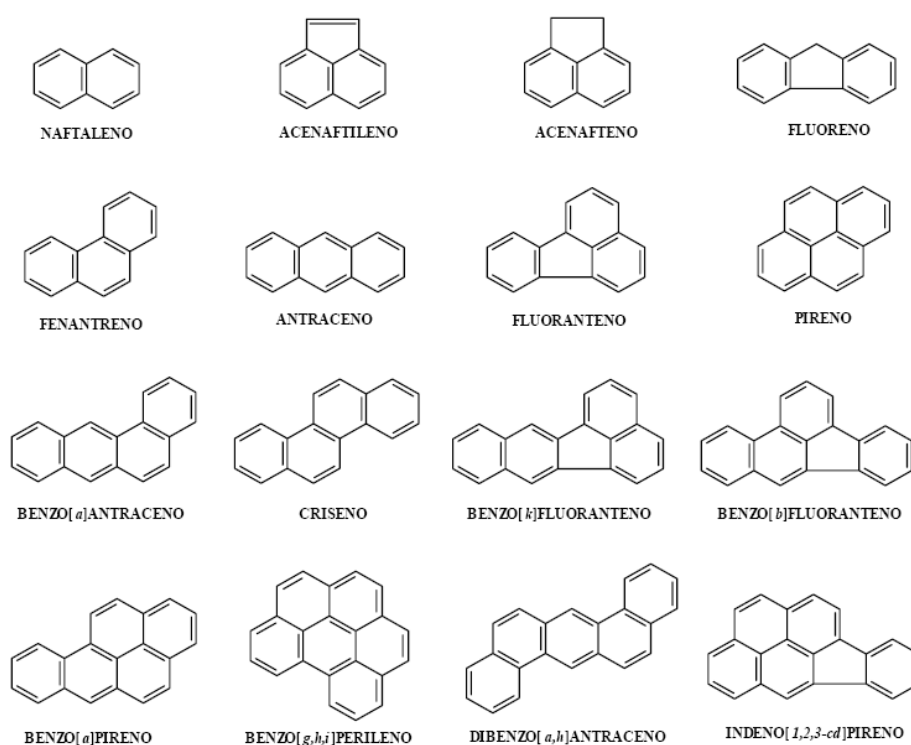


Figura 7: Lista dos 16 HPA prioritários listados pela USEPA (*Environmental Protection Agency of the United States*).

Algumas razões entre HPA são utilizadas para se determinar se a origem da contaminação é petrogênica ou pirogênica. Uma delas é a razão fenantreno (termodinamicamente mais estável) e seu isômero antraceno onde a relação entre eles é dependente da temperatura. Valores altos dessa razão (>15) indicam origem petrogênica e valores baixos (<10) indicam origem pirogênica.^{24,25}

Os HPA possuem uma toxicidade bastante elevada e algumas moléculas com massas molares mais altas (4 a 6 anéis) possuem caráter carcinogênico. Devido a

isto, os estudos sobre esses compostos vêm sendo cada vez mais ampliados e de grande importância.²⁶

2.5. Cromatografia a gás (CG)

A cromatografia a gás é uma técnica de separação e análise de misturas, por interação dos seus componentes entre uma fase estacionária (filme líquido suportado ou um sólido adsorvente) e uma fase móvel, no caso um gás. Este gás é também chamado de gás de arraste, e seu principal requisito é ser inerte, ou seja, ele apenas servirá como um meio transportador para as substâncias a serem separadas.²⁰

A qualidade da separação dependerá de uma série de parâmetros a serem otimizados. Entre os principais estão: a escolha da fase estacionária, o fluxo do gás de arraste e o conhecimento do tipo de matriz que se quer separar.²⁷

2.5.1. Detector por ionização em chama (DIC)

O detector por ionização em chama responde aos compostos com ligações C-H e por isso é considerado por muitos autores como um detector virtualmente universal, já que todos os compostos orgânicos são constituídos deste tipo de ligação.²⁷

O princípio de funcionamento do mesmo é a queima de uma mistura de gases (H_2 e ar sintético) e a aplicação de uma diferença de potencial entre os eletrodos. Quando um composto orgânico chega até a chama, carregado pelo gás de arraste, este é queimado gerando íons que então conduzirão corrente elétrica, na ordem de pA. A corrente resultante é então amplificada gerando o sinal cromatográfico.²⁷

2.5.2. Espectrometria de massas (EM)

Na cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, após serem separados, os compostos são bombardeados por elétrons gerados por um filamento. Os fragmentos gerados são encaminhados a um analisador de massas onde os íons serão separados e coletados individualmente de acordo com a razão massa/carga (m/z).²⁸

Chegando ao detector, uma fotomultiplicadora gera uma corrente elétrica proporcional ao número de íons que incide sobre ele, sendo este sinal amplificado e registrado na forma de sinal cromatográfico.²⁸

A grande vantagem desta técnica é, além da maior sensibilidade, a possibilidade de gerar dois tipos de cromatogramas: um a partir de uma faixa de m/z selecionados (cromatograma de íons totais “TIC”) e outro gerado a partir da escolha de m/z específicos (monitoramento seletivo de íons “SIM”). Com isto, é possível monitorar uma série de compostos por seu fragmento principal como, por exemplo, nas séries homólogas dos hopanos, em que o fragmento m/z pesquisado é 191.²⁸

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi extrair biomarcadores geoquímicos presentes nas águas do mar e sedimentos da enseada de Porto Belo, utilizando métodos estabelecidos pela US-EPA (Environmental Protection Agency of United States) e, posteriormente, analisá-los (quali e quantitativamente) por cromatografia a gás com detector por ionização em chama (CG-DIC) e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3.2. Objetivo específico

O objetivo específico é avaliar uma possível contaminação existente no local em estudo, a enseada de Porto Belo, usando como base os dados obtidos na análise e interpretando-os usando como referência os índices e valores disponíveis na literatura.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Amostragem

A avaliação ambiental do local em estudo iniciou-se pela definição de cinco pontos de amostragem (figura 8) com base nas informações fornecidas pelo oceanógrafo Sr. Luis Marton, bem como pela avaliação do sedimento no momento da coleta (sedimentos muito arenosos eram descartados). Os pontos de coleta foram denominados como PB1, PB2, PB3, PB4 e PB5 (tabela 1).

Tabela 1: Coordenadas dos locais coletados.

	Proximidade	LON	LAT
PB1	Praia	45° 55' 22.267"W	27°16' 43.332"S
PB2	Ancoradouro dos navios	48° 32' 20.453"W	27° 8' 22.230"S
PB3	Bares e casas	48° 31' 45.214"W	27° 8' 17.879"S
PB4	Fazenda de mariscos	48° 32' 7.192"W	27° 9' 45.365"S
PB5	Marina	48° 32' 11.835"W	27° 9' 17.055"S

* Em todos os locais foram coletadas amostras de água (PBa) e sedimento (PBs)



Figura 8: Localização dos cinco pontos de amostragem.

Para a coleta e armazenamento das amostras de água foram utilizados frascos de cor âmbar com capacidade de 1 L que eram lançados ao mar em um suporte de metal apropriado. Com o auxílio de um amostrador do tipo van Veen, o sedimento foi coletado e logo depois de retirado do mar transferido para frascos de vidro com capacidade de 500 g.

As amostras foram armazenadas primeiramente em caixa de isopor com gelo e após serem transportadas até o laboratório, as amostras de água foram acondicionadas em geladeira até que o procedimento de extração iniciasse. Já as amostras de sedimento foram armazenadas em balões de 250 mL devidamente etiquetados e então levadas ao congelador até o início dos procedimentos.

4.2. Equipamentos e reagentes

Todos os equipamentos utilizados neste estudo estão listados abaixo com suas respectivas *marcas* e modelo:

- Agitador de tubos vortex - *PHOENIX* – AP 56
- Agitador magnético - *Microquímica* - MQAMA 301
- Analisador Elementar CHNS - *Carlo Erba* - EA 1110
- Balança Analítica - *Bel Mark* - 210 A
- Centrífuga Excelsa Baby II - *Fanen* - 206R
- Cromatógrafo a gás - *ThermoFinnigan* - Trace GC Ultra
- Espectrômetro de massas - *Finnigan* - Polaris-Q
- Estufa - *Quimis* - Q317B242
- Liofilizador - *Heto* - CT 60 E
- Mufla - *Quimis* - Q317B242
- Rota vaporizador - *Fisaton* - 802
- Ultra-som - *Unique* - USC 1450 (25 kHz)

Os solventes utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 2. Todos os resíduos foram descartados em local apropriado.

Tabela 2: Reagentes e solventes usados juntamente com sua origem e pureza.

Reagentes e solventes	Origem	Pureza
Acetato de etila	MERCK	HPLC
Ácido clorídrico	Synth	P.A. 37%
Lã de vidro	Synth	P.A.
Alumina	Fluka Chemika	
BSTFA	ALDRICH	P.A. ≥ 99%
Cobre metálico em pó	VE TEC	P.A.
Diclorometano	Mallinckrodt Chemicals	HPLC
Extran MA 02 neutro	MERCK	
Hexano	J. T. Baker	Pesticida
Metanol	NUCLEAR	HPLC
Nitrogênio	WHITE MARTINS	Grau (ECD)
Sílica gel 60 (70-230 mesh)	MERCK	P.A.
Sulfato de sódio	NUCLEAR	P.A.

4.3. Limpeza da vidraria

Com o intuito de retirar qualquer matéria orgânica presente no material utilizado, o mesmo foi previamente lavado com detergente neutro e enxaguado com água comum e água desionizada em abundância. Em seguida toda a vidraria foi deixada em uma solução de detergente comercial EXTRAN (5% v/v) por algumas horas, enxaguada com água comum e logo após com água desionizada.

Após este procedimento de lavagem os materiais que possuem algum tipo de calibração foram apenas enxaguados com acetona e hexano (PA). As vidrarias que permitem altas temperaturas foram levadas a mufla a 450 °C por 4 h e as demais vidrarias foram enxaguadas com acetona e hexano (PA) e levadas para estufa a 150 °C por algumas horas até que todo solvente fosse eliminado. Após estes procedimentos, as vidrarias foram armazenadas em local apropriado e só manuseadas com o uso de luvas.

4.4. Extração

As extrações foram realizadas seguindo os métodos da EPA (Environmental Protection Agency) com algumas modificações.

4.4.1. Amostras de água

Para as amostras de água, foram feitas extrações líquido-líquido onde a amostra era colocada num funil de separação previamente limpo e então adicionada a ela 20 μL do padrão p-terfenil d_{14} (HPA) e 25 μL de padrão C_{20d} (HA). Estes padrões são adicionados para que seja possível avaliar a eficiência da extração.

Como solvente extrator utilizou-se 90 mL de hexano (grau HPLC), volume este que foi dividido em três partes iguais de 30 mL. Após esta etapa, os extratos totais foram transferidos para balões de 250 mL e então concentrados inicialmente em rota-evaporador até um volume mínimo. Em seguida, este volume era transferido para um frasco menor (2 mL) com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo que o balão contendo o extrato total era enxaguado por três vezes com o mesmo solvente da extração. Finalmente, o extrato era novamente concentrado desta vez utilizando um fluxo constante de nitrogênio (5.0) até que ficasse com um volume aproximado de 1mL.

Em seguida, estes extratos foram levados a análise em cromatógrafo a gás com detector DIC para que fossem avaliadas quais amostras deveriam partir para a etapa de fracionamento, evitando-se assim, o gasto desnecessário de padrões e solventes com amostras que não apresentassem um perfil de contaminação. Desta forma, pela análise dos cromatogramas dessas amostras, optou-se pelos fracionamentos apenas das amostras PB1a e PB4a.

4.4.2. Tratamento do cobre

A um frasco contendo 2 g de cobre (em pó) adicionou-se 5 mL de HCl concentrado. A mistura foi agitada em um vortex, centrifugada e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido com a adição de 5 mL de metanol, logo em seguida com 5 mL de diclorometano/metanol (1:1) e por último 5 mL com diclorometano até que o sobrenadante ficasse totalmente incolor.

Utiliza-se este cobre tratado nas amostras de sedimento a fim de se retirar o enxofre molecular, normalmente presente nessas amostras e que é um interferente em análises cromatográficas. O cobre ativado pelo tratamento formará um complexo com o enxofre molecular, impedindo-o de ser extraído juntamente com os compostos de interesse.

4.4.3. Amostras de sedimento

As amostras de sedimento, depois de congeladas, foram liofilizadas e uma vez secas, maceradas em almofariz de porcelana e pistilo com o objetivo de retirar partículas maiores. O sedimento macerado foi peneirado (malha 250 mesh; 25 μm) retirando todo material indesejável remanescente da maceração.

Deste sedimento macerado, pesou-se 10 g para o procedimento de extração. Junto a ele adicionou-se 2 g de cobre tratado, 20 μL de p-terfenil d_{14} e 25 μL do padrão C_{20d} . Foi utilizado como solvente extrator uma mistura de DCM/MeOH (2:1) utilizando-se no total 60 mL (dividido em 3 volumes de 20 mL cada extração). A cada extração, a mistura foi agitada em vortex e em seguida levada a ultra-som por 30 minutos. Decorrido este período, a amostra era centrifugada e o sobrenadante era retirado e transferido com a ajuda de uma pipeta Pasteur para um balão de 250 mL.

Da mesma forma que os extratos das amostras de água, os extratos de sedimento foram concentrados em rota-evaporador até um volume mínimo, transferidos para frascos menores (2 mL) com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo o balão enxaguado três vezes com o mesmo solvente da extração. Finalmente, o extrato foi concentrado, desta vez utilizando um fluxo constante de nitrogênio (5.0) até que ficasse com um volume aproximado de 1 mL.

4.5. Análise elementar - CHN

Pequenas quantidades do sedimento peneirado (~20 mg) foram colocadas em frascos de vidro. A estas, adicionaram-se solução de HCl a 0,1 mol L^{-1} sob aquecimento constante (~60 $^{\circ}\text{C}$) para promover a descarbonatação. Após secas, as amostras foram enviadas para a Central de Análises no Departamento de Química da UFSC para que fossem feitas as análises de carbono, hidrogênio, nitrogênio.

4.6. Fracionamento

O fracionamento das amostras é feito para que se possam analisar cada grupo de biomarcador separadamente e esta separação foi feita seguindo as normas da EPA (Environmental Protection Agency) com algumas modificações.

Desta forma, após recolhidos os extratos totais, as amostras foram fracionadas em coluna de vidro (30 cm x 1,3 cm) empacotada com lã de vidro calcinada, 10 g de sílica 2% desativada e 1 g de alumina. Para o empacotamento da coluna usou-se hexano para evitar a formação de bolhas e conseqüentemente rachaduras nas paredes da mesma. Quando o solvente utilizado para o empacotamento estava a aproximadamente 1 mm da alumina iniciava-se a eluição do extrato total.

A fração F1, contendo os hidrocarbonetos alifáticos (HA) e os hopanos, foi eluída com 55 mL de hexano. A fração F2, contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), foi eluída com 70 mL de DCM:hexano (2:1). A fração F3, contendo os esteróis, foi eluída com 50 mL de Acetato de etila:MeOH (3:1). Em cada troca de solvente, o frasco contendo o extrato total era lavado com aproximadamente 5 mL do solvente da eluição. Todas as frações foram coletadas em balões de 250 mL, concentradas, transferidas para frascos de aproximadamente 2 mL, avolumadas com 1 mL hexano e acondicionadas em geladeira até o momento da análise por cromatografia a gás.

4.7. Silanização

O processo de silanização é utilizado para diminuir a polaridade dos esteróis, obtendo-se assim um melhor sinal cromatográfico. Deste modo, utiliza-se o agente silanizante (BSTFA) para converter as hidroxilas dos esteróis, em seus correspondentes trimetilsilil ésteres (figura 9).

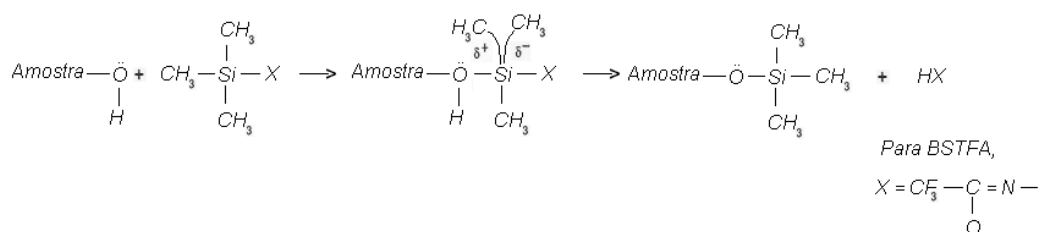


Figura 9: Reação de derivatização via silanização utilizando BSTFA.

Para este procedimento, utilizou-se nitrogênio (5.0) para que os solventes das F3 das amostras fossem secos. Adicionou-se, então, 100 µL de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) aos frascos contendo as amostras e estes foram

deixados em estufa por 1 h a 60 °C. Decorrido este período, o agente silanizante foi seco com fluxo de nitrogênio e as amostras avolumadas para 1 mL com hexano. Este processo foi realizado pouco tempo antes da análise por CG-EM.

4.8. Análise, identificação e quantificação

A quantificação dos alcanos foi feita através de uma curva de calibração externa, onde foram preparadas soluções contendo os n-alcanos ($n\text{-C}_9$ até $n\text{-C}_{40}$) e os alcanos isoprenóides (pristano e fitano) nas concentrações de 1,0-5,0-10,0-25,0-50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Antes das análises, em todas as frações, foram adicionados os respectivos padrões, sendo estes: C16- d_{14} 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F1), PI-HPA 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (F2) e androstanol 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F3).

As análises dos extratos contendo os hidrocarbonetos alifáticos foram realizadas conforme especificado na tabela 3. Para as determinações dos HPA e seus homólogos alquilados, assim como os hopanos e os esteróis nos extratos de água e sedimento foram usadas as condições apresentadas na tabela 4. A identificação destes compostos foi realizada por intermédio de padrões e pelo uso da biblioteca de espectros NIST. As condições cromatográficas foram otimizadas anteriormente com o uso de padrões das amostras a serem analisadas.

Tabela 3 - Condições de análise para os hidrocarbonetos alifáticos por CG-DIC.

Coluna (J & W, DB-5) (5% de fenila)	30 m x 0,32 mm di x 0,25 μm de fase estacionária
Temperatura da coluna	60°C (1,5 min) 6 °C min^{-1} até 310 °C (30 min)
Gás de arraste	He fluxo constante de 3 mLmin^{-1}
Modo de injeção	splitless (1 min), split 1:50
Volume de amostra	1 μL
Temperaturas (Injetor e Detector)	280 e 300 °C

Tabela 4 - Condições de análise para os HPA, hopanos e esteróis por CG-EM.

Coluna (DB-5MS)	30 m x 0,25 mm di x 0,25 μ m de fase estacionária
Temperatura da coluna	50°C (5 min) 5 °C min ⁻¹ até 300 °C (5 min)
Gás de arraste	He fluxo constante de 1,0 mL min ⁻¹
Modo de injeção	<i>splitless</i> (1min), <i>split</i> 1:20
Modo de ionização	70eV; <i>ion trap</i>
Volume de amostra	1 μ L
Temperaturas (injetor, fonte e interface)	280, 250 e 275 °C

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise elementar - CHN

Os valores determinados para o carbono orgânico total (COT) nas amostras de sedimentos foram compatíveis com valores encontrados em ambientes estuarinos. O ponto PB3 apresentou o teor mais elevado (88,7 mg/g) o que pode ser atribuído a maiores quantidade de partículas finas de sedimento. Este tipo de partícula tende a adsorver maior quantidade de matéria orgânica e, por isso, locais com esta característica apresentam um teor de COT maior.

A razão entre o COT e o teor de nitrogênio (N) é comumente usada para a determinação da contribuição relativa de carbono orgânico vindo de origem terrestre ou aquática. Solos e vegetação terrestre apresentam valores de COT/N relativamente altos (> 50). Valores acima de 20 normalmente são encontrados em plantas terrestres vasculares e em folhas de plantas superiores de manguezais. Já valores entre 6 e 8 são característicos de sedimentos marinhos enriquecidos com material preferencialmente planctônico. Como consequência ao alto valor do COT, o ponto PB3s também apresentou o maior valor de COT/N, podendo este fato ser explicado devido à proximidade de uma região rica em vegetação terrestre, o que ocasionaria o grande aporte de matéria orgânica (tabela 5). Os demais locais tiveram uma variação da razão de COT/N entre 4,9 e 37,8 o que caracterizaria um ambiente com aporte misto entre plantas terrestres vasculares e material planctônico.²⁰

Tabela 5: Teores (COT), nitrogênio (N) e razão entre eles (COT/N).

Local	COT (mg g ⁻¹)	N (mg g ⁻¹)	COT/N
PB1	1,4	0,12	11,7
PB2	3,1	0,19	16,3
PB3	88,7	0,12	682,3
PB4	5,3	0,14	37,8
PB5	11,9	2,4	4,9

5.2. Hidrocarbonetos alifáticos

5.2.1. Alcanos

Para a quantificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada uma curva de calibração em triplicata na faixa de concentração entre 1 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada um dos hidrocarbonetos (figura 10). O padrão interno adicionado à amostra, previamente à injeção no cromatógrafo, foi o $n\text{-C}_{16}$ deuterado na concentração de $2\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os dados referentes às curvas realizadas encontram-se no Anexo A.

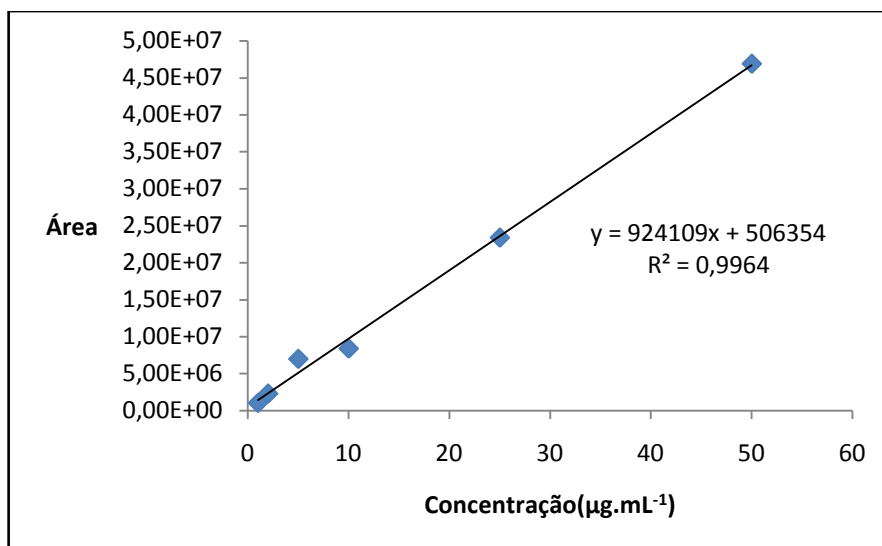


Figura 10: Curva analítica para o hidrocarboneto $n\text{-C}_{28}$.

Com relação aos n -alcanos, nota-se que a distribuição de hidrocarbonetos acima de $n\text{-C}_{22}$ nas amostras de água (figura 11), bem como o IPC (índice que se baseia na diferença de concentração entre as cadeias ímpares e pares em ambientes não contaminados por derivados de petróleo), caracterizam um ambiente contaminado por derivados de petróleo. O IPC apresentou valores próximos de 1 para todas as amostras, ou seja, não há predominância de cadeias ímpares sob as pares, o que é típico de ambientes com aporte de derivados de petróleo.⁷

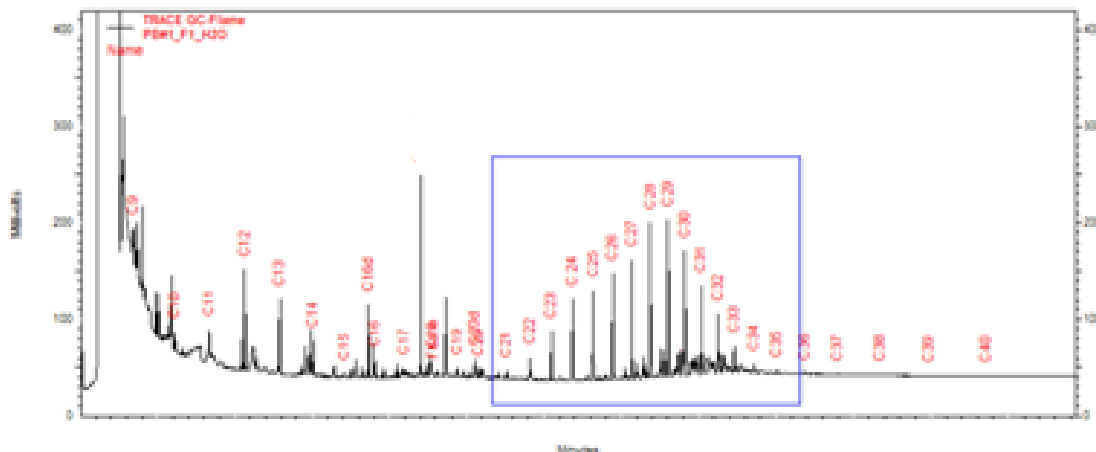


Figura 11: Distribuição dos hidrocarbonetos alifáticos acima de $n\text{-C}_{22}$ da amostra PB1a.

Os valores para os somatórios de hidrocarbonetos encontrados nas amostras de sedimento foram relativamente baixos (média de $1,14 \mu\text{g.g}^{-1}$), enquanto que nas amostras de água o maior valor obtido foi observado no ponto PB1a ($29,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), valores semelhantes a outras regiões sem contaminação por aporte petrogênico (tabela 6).

A razão entre os alcanos isoprenóides, pristano e fitano, obtida nas amostras (entre 0,2 e 2,1) não forneceu um dado confiável com relação ao aporte petrogênico, pois são valores próximos ou superiores a 1. Por ser 1 o valor limite entre a origem biogênica e petrogênica desses alcanos, foi necessário o uso de outras razões para a confirmação do aporte de derivados de petróleo.

As razões entre $n\text{-C}_{17}$ /pristano e $n\text{-C}_{18}$ /fitano são muito utilizadas para a determinação da biodegradação relativa dos n -alcanos, onde valores baixos indicariam a presença de óleo degradado. Os valores obtidos para as amostras (>1) indicariam a inserção recente de derivados de petróleo, sendo esta suposição confirmada para as amostras PB2s, PB3s e PB5s pela aplicação da razão $\text{MCNR}/\Sigma\text{HC}$, onde nestes pontos os valores para esta razão foram superiores a 10, característico de ambientes contaminados por derivados de petróleo.

Tabela 6: Concentrações ($\mu\text{g.g}^{-1}$ e $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos hidrocarbonetos alifáticos e índices das amostras de sedimento (PBs) e água (PBa).

Local	IPC	<i>n</i> -C ₁₇ /PRIS	<i>n</i> -C ₁₈ /FIT	PRIS/FIT	MCNR	MCNR/ Σ HC	Σ HC
PB1a	1,0	9,7	4,8	0,2	125,9	4,2	29,8
PB1s	1,9	3,3	2,5	0,9	8,4	9,8	0,9
PB2s	1,5	3,9	4,0	0,6	6,0	14,1	0,4
PB3s	1,1	1,7	4,4	0,8	9,6	12,0	0,8
PB4a	1,2	0,7	1,2	2,0	85,7	6,9	12,3
PB4s	1,1	4,1	9,3	0,3	11,7	6,8	1,7
PB5s	2,9	0,1	1,2	0,2	27,8	15,3	1,8

IPC: Índice de preferencial de carbono; ***n*-C₁₇/PRIS:** concentração de *n*-C₁₇ / concentração de pristano; ***n*-C₁₈/PRIS:** concentração de *n*-C₁₈ / concentração de fitano; **PRIS/FIT:** concentração de pristano/ concentração de fitano; **MCNR:** Mistura complexa não resolvida; **MCNR/ Σ HC:** mistura complexa não resolvida/ soma das concentrações dos hidrocarbonetos (*n*-C₉ até *n*-C₄₀ + pristano e fitano); **Σ HC:** soma das concentrações dos hidrocarbonetos (*n*-C₉ até *n*-C₄₀ + pristano e fitano);

5.2.2. Hopanos

O monitoramento do grupo dos hopanos foi feito através do fragmento característico *m/z* 191 originado pra quebra do anel C (figura 4).

Os hopanos inseridos no ambiente de forma natural e recente têm preferência pela configuração $\beta\beta$ e, para hopanos com mais de 31 carbonos, estereoquímica R no carbono 22, porém este é termodinamicamente instável, sendo logo convertido às configurações $\beta\alpha$ e $\alpha\beta$, com estereoquímica 22S, em amostras de sedimento antigo e óleos crus. Nas amostras estudadas é possível observar hopanos entre C₂₇ e C₃₃ com estereoquímica predominante $\alpha\beta$ sugerindo um aporte significativo de derivados de petróleo no ambiente, onde as maiores concentrações foram encontradas na amostra PB5s, local próximo a marina, com circulação constante de embarcações (tabela 7).^{11,12,14}

Tabela 7: Principais hopanos encontrados e suas concentrações relativas (%).

Composto	PB1s	PB2s	PB3s	PB4s	PB5s
18 α (H)-22,29,30-trisneonorhopano (TS)	4,8	5,0	9,4	5,3	5,5
17 α (H)-22,29,30-trisnorhopano (TM)	5,2	6,8	5,6	4,9	5,8
17 α (H),21 β (H)-30-norhopano	25,0	24,7	30,3	27,5	25,6
17 β (H),21 α (H)-30-normoretano	nd	1,3	3,8	3,7	2,1
17 α (H),21 β (H)-hopano	24,8	26,5	30,2	18,4	22,8
22S-17 α (H),21 β (H)-31-homohopano	6,9	10,7	11,1	9,5	7,7
22R-17 α (H),21 β (H)-31-homohopano	6,8	7,5	6,5	7,5	7,6
22S-17 α (H),21 β (H)-32- bishomohopano	6,8	nd	nd	6,5	5,2
22R-17 α (H),21 β (H)-32- bishomohopano	2,9	nd	nd	4,3	3,9
22S-17 α (H),21 β (H)-33-trishomohopano	3,0	nd	nd	4,5	3,3
22R-17 α (H),21 β (H)-33-trishomohopano	2,0	nd	nd	1,5	2,0
[Ts/(Ts +Tm)]*	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5

***[Ts/(Ts +Tm)]** : [concentração de Ts/ (concentração de Ts + concentração de Tm)]

A razão entre os isômeros Ts e Tm [Ts/ (Ts +Tm)] fornece informações sobre a maturidade do sedimento formador do óleo analisado. Por ser termodinamicamente mais estável é conveniente esperar que a concentração do isômero Ts seja muito maior em relação ao Tm quanto mais antigo for o sedimento. Assim, razões com valores próximos a 1 indicam um óleo proveniente de um sedimento maturado, enquanto que valores próximos a zero indicam um óleo gerado a partir de um sedimento mais recente.¹⁴ Os valores obtidos para as amostras estudadas variaram entre 0,4 e 0,6 o que sugerem o aporte de um óleo obtido a partir de um sedimento de maturidade intermediária.

Não foram encontrados hopanos nas amostras de água, o que pode ser explicado devido a intensa movimentação da água, bem como a maior incidência de luz solar o que acarretaria na degradação mais rápida desses compostos.

5.2.3. Esteróis

Os principais esteróis identificados foram: dinosterol, β -sitosterol, colesterol e coprostanol. Em todas as amostras de sedimentos analisadas houve predomínio do colesterol (em média 0,3) (esterol encontrados em ambientes aquáticos) sob os

demais esteróis estudados, exceto no ponto PB4s, onde houve o predomínio do β -sitosterol, cujas origens estão principalmente relacionadas a organismos terrestres (figura 12).

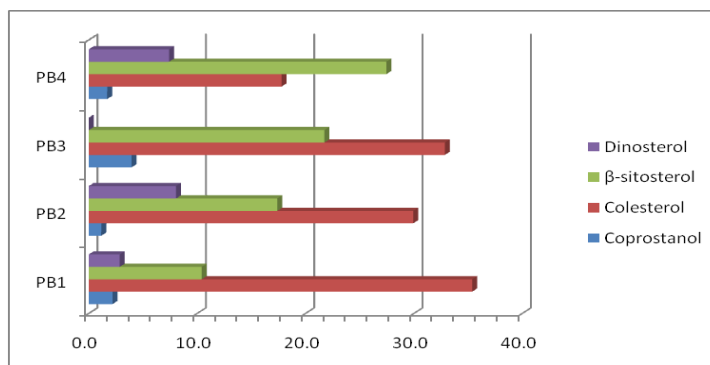


Figura 12: Abundâncias relativas de alguns esteróis encontrados nas amostras.

Entre os esteróis mais estudados na avaliação de aporte por esgoto doméstico, coprostanol e epicoprostanol são os mais utilizados por não serem naturais de sedimentos aquáticos. Estes esteróis são produzidos a partir da redução do colesterol no intestino de animais superiores, por esse motivo são denominados esteróis fecais.^{17,18}

O uso de razões como coprostanol/colesterol pode contribuir qualitativamente na análise deste tipo de contaminação. Valores acima de 0,7 (PB3s) são considerados indicativos de aporte fecal, enquanto que valores inferiores a 0,3 são atribuídos a locais sem contaminação (PB4 e PB2). Valores intermediários (PB1) podem ser relativos à ambientes em processo de contaminação (figura 13).²⁰

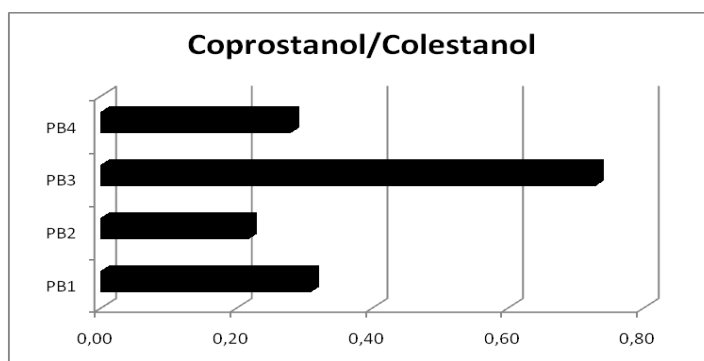


Figura 13: Comparativo entre as razões coprostanol/colestanol(epicoprostanol) nas amostras.

5.3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA

Em todas as amostras analisadas foi possível notar a presença de HPA. Dentre elas, destaca-se o ponto PB1s, ponto coletado na região próximo a marina, onde aparecem as maiores concentrações dos HPA mais voláteis (tabela 8), o que sugere uma contaminação recente por derivados de petróleo, proveniente de embarcações. Entretanto esse valor para HPA totais pode ser comparado a valores encontrados em regiões do Mar Negro que são considerados não poluídos por derivados de petróleo.²³

A razão entre fenantreno (termodinamicamente mais estável) e seu isômero antraceno fornece indicativos de contaminação por petróleo quando atinge valores superiores a 15 e valores abaixo de 10 indicam origem pela queima de combustíveis fósseis (pirogênica). As razões FLUO/PIR e FLUO/ (FLUO+PIR), também fornecem informações sobre a origem pirolítica ou petrogênica dos HPA encontrados.^{23,30}

Valores inferiores a 1 para a razão FLUO/PIR e inferiores a 0,4 para a razão FLUO/(FLUO+PIR) caracterizam ambientes com aporte petrogênico. Valores superiores a 1 e 0,5 para as razões FLUO/PIR e FLUO/(FLUO+PIR), respectivamente, indicam ambientes com aporte pirogênico de HPA. Desta forma, para os pontos onde foram possíveis os cálculos das razões entre os HPA, pode-se sugerir o provável aporte misto (petrogênico e pirogênico) dos HPA (tabela 8).^{23,30}

Tabela 8: Somatório dos HPA detectados nas amostras de sedimento (ng.g^{-1}) e água (ng.mL^{-1}) e algumas razões entre eles.

	Σ HPA	FLUO/PIR	FLUO/ (FLUO+PIR)	FEN/ANT
PB1a	54,5	nd	nd	1,3
PB1s	85,7	nd	nd	0,7
PB2s	6,1	nd	nd	2,2
PB3s	6,5	0,4	0,3	1,3
PB4a	36,1	nd	nd	1,7
PB4s	21,9	1,7	0,6	nd
PB5s	19,8	nd	nd	nd

nd – abaixo do limite de detecção de 2 ng.mL^{-1} para água e 2 ng.g^{-1} para sedimento.

FLUO/PIR: concentração de fluoranteno/ concentração de pireno; FLUO/ (FLUO+PIR): concentração de fluoranteno/ concentração de fluoranteno + concentração de pireno; FEN/ANT: concentração de fenantreno/ concentração de antraceno.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Pela análise do COT e COT/N observou-se que o ponto PB3 obteve os maiores valores, sendo este fato atribuído à proximidade de um local rico em vegetação terrestre. As demais amostras obtiveram valores característicos de locais com aporte misto entre plantas terrestres vasculares e material planctônico
- ✓ A distribuição de hidrocarbonetos acima de $n\text{-C}_{22}$ para as amostras de água é típico de locais afetados por derivados de petróleo e os valores das razões entre $n\text{-C}_{17}$ /pristano e $n\text{-C}_{18}$ /fitano (>1) são indícios de que essa inserção é recente.
- ✓ Para as amostras PB2s, PB3s e PB5s, a contaminação por derivados de petróleo foi mais uma vez sugerida pela aplicação da razão $\text{MCNR}/\Sigma\text{HC}$, onde, nestes pontos, os valores para esta razão foram superiores a 10.
- ✓ A análise dos hopanos também confirmou a hipótese de contaminação por petróleo devido a predominância de compostos entre C_{27} e C_{33} com estereoquímica $\alpha\beta$ e 22S. Os valores obtidos para a razão $[\text{Ts}/(\text{Ts} + \text{Tm})]$ para as amostras estudadas variaram entre 0,4 e 0,6, o que sugeriria um óleo formado a partir de um sedimento de maturidade intermediária.
- ✓ A análise dos HPA encontrados nas amostras através do cálculo de algumas razões indicou que estes têm origem em um aporte misto (pirolítico e petrogênico) de contaminantes.
- ✓ Pode-se observar em quase todas as amostras a presença predominante de colesterol (origem aquática), com exceção do ponto PB4 onde houve o predomínio do β -sitosterol (esterol originário de plantas superiores). Feita a razão coprostanol/epicoprostanol, apenas o ponto PB3s apresentou um aporte significativo de origem fecal (0,7).
- ✓ Desta forma, com base nos dados obtidos e na análise das razões aplicadas para cada biomarcador, é possível verificar um aporte significativo de derivados de petróleo, bem como o princípio de contaminação por esgoto doméstico no local em estudo.

7. REFERÊNCIAS

1. Prefeitura Municipal de Porto Belo, http://www.portobelo.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=46&Itemid=100, acessado em 29 de abril de 2009.
2. Killips, S.D.; Killips, V.J. An Introduction to Organic Geochemistry; John Wiley New York, (1993).
3. Englinton, G.; Calvin, M. Chemical fossils. *Scientific American*. (1967). 261, 32-43
4. Parrish, C.C.; Abrajano, T.A.; Budge, S.M.; Helleur, R.T.; Hudson, E.D.; Pulchan, K.; Ramos, C.; Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: Analysis and applications – The handbook of environmental chemistry; Springer – Verlag, (2000). Vol. 5; part. D.
5. Philp, R.P. Oil-oil and oil-source rock correlations: techniques. In: M.H. Engel and S.A. Macko (eds.), *Organic Geochemistry: Principles and Applications*. Plenum Press, New York. N.Y. (1993). pp. 445-460.
6. Commendatore, M.G. & Esteves, J.L. Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*. (2004). 48, 910-918.
7. Killips, S. D., Killips, V. J. An introduction to Organic Geochemistry, 2.ed. Malasia : Blackwell Publishing, (2005). 393p.
8. Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P., Bavor Jr & H.J.. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of The Total Environment*. (1992). 112, 203-219.
9. Philp, R.P. Fossil fuel biomarkers. *Methods in Geochemistry and Geophysics*. New York. (1985). 292 p.

10. Steinhauer, M. S., Boehm, P. D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of Alaska Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbons input. *Marine Environmental Research*, v. 33, p. 223-253, (1992)
11. Soclo, H.H.; Garrigues, P.; Ewald, M.. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin*. (2000). 40, 387-396.
12. Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T. & Bellocq, J.. Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. (1998c). 47, 77-90
13. Peters, K. E., Moldowan, J. M. The biomarker guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. *Englewood Cliffs* (NJ): Prentice Hall, (1993). 363p.
14. Seifert, W. K.; Moldowan, J.M.. The effect of thermal stress on source rock quality as measured by hopane stereochemistry. In: *Advances in Organic Geochemistry 1979*. (Edited by Douglas, A.G.; Maxwell, J.R). Perfacom, Oxford. (1980). 229-237.
15. Dallarosa, J.B.; Mõnego, J.G.; Teixeira, E.C.; Stefens, J.L.; Wiegand, F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil. *Atmospheric Environment*. (2005). 39, 1609-1625.
16. Budzinski, H.; Jones, I.; Bellocq, J.; Piérard, C.; Garrigues, P.. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry*. (1997). 58, 85-97.

17. Gui-Peng, Y.. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environmental Pollution*. (2000). 108, 163-171.
18. Witt, G.; Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. (1995). 31, 237-248.
19. Noblet, J. A.; Young, D. L.; Zeng, E. Y. & Ensari, S. Use of fecal steroids to infer the sources of fecal indicator bacteria in the lower Santa Ana river watershed, California: sewage is unlikely a significant source. *Environ. Sci. Technol.*. (2004). 38:6002-6008.
20. Alexandre, M.R.; Huang, Y; Madureira, L. A. S.. Avaliação de compostos orgânicos em sedimentos superficiais da Baía da Babitonga, Santa Catarina - Brasil. *Geochimica Brasiliensis*, v. 26, p. 1-5, (2006).
21. Eglinton, G.; Hamilton, R.J.. Leaf epicuticular waxes. *Science*. (1967). 156, 1322-1335.
22. Gogou, A., Bouloubassi, I. & Stephanou, E.G.. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry*. (2000). 68, 265-282.
23. Readman, J.W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.-P., Catinni, C. & Mee, L.D. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*. (2002). 44, 48-62.
24. Stefens, J.L. Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro (RJ). Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, (2006).

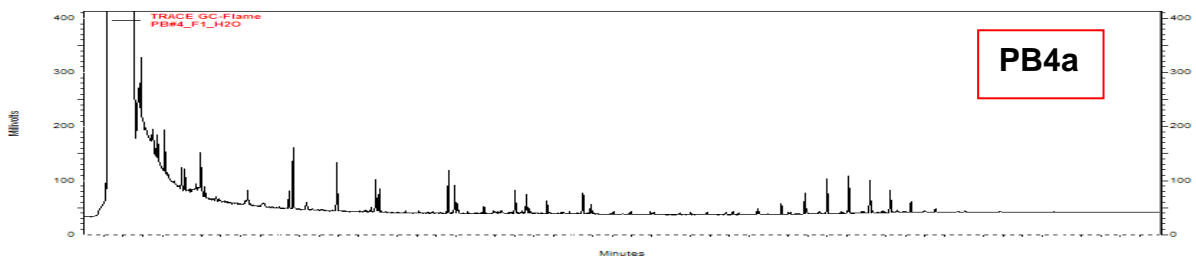
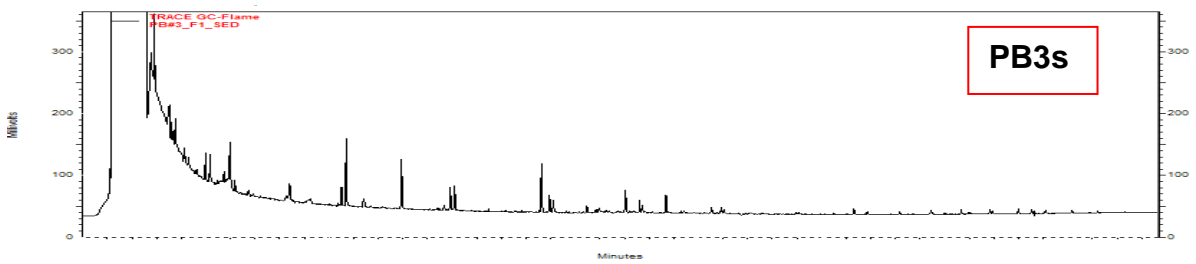
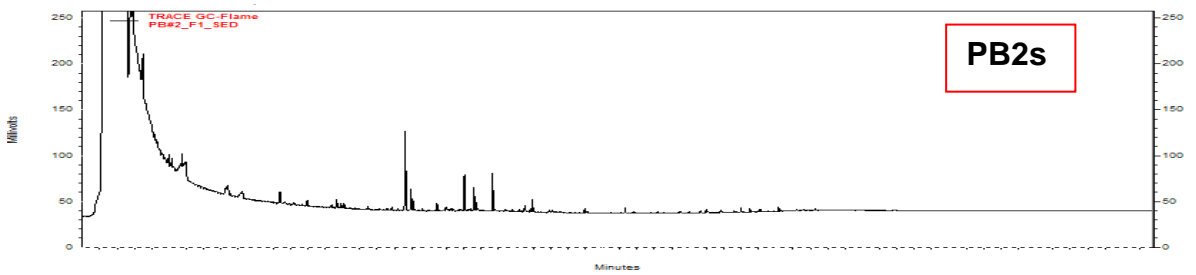
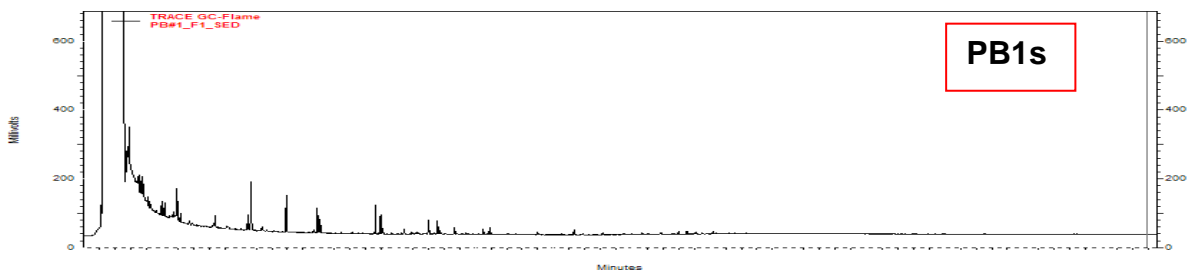
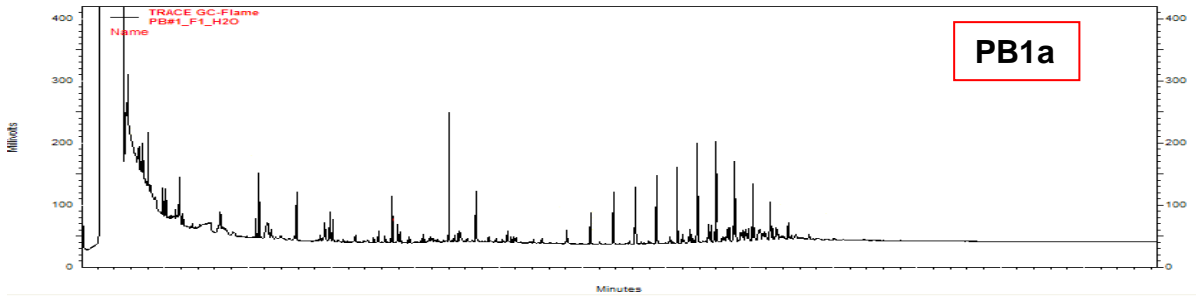
25. Cripps, G.C.; Problems in the identification of anthropogenic hydrocarbons against natural background levels in the Antarctic. *Antarctic. Sci.* (1989). 1, 307-312.
26. Mello, M.R.. Geochemical and molecular studies of depositional environments of source rocks and their derived oils from Brazilian Marginal Basins; P H D Thesis, University of Bristol, England. (1988)
27. Ensminger, A.; Van Dorsselaer, A.; Spyckerelle, C.; Albrecht, P.; Ourisson, G.. Pentacyclic triterpenes of the hopane type as ubiquitous geochemical markers: Origin and significance. In: *Advances In Organic Geochemistry 1973*. (Edited By Tissot, B.; Beininger, F.), Editions Technip, Paris, (1974). 245-260.
28. Ourisson, G.; Albrecht, P.; Rohmer, M.. Predictive microbial biogeochemistry from molecular fossils to procaryotic membranes. *Trends in Biochemistry Sciences*. (1982). 7, 236-239.
29. Jeng, W.-L.; C.-A. Huh. Lipids in suspended matter and sediments from the East China Sea Shelf. *Organic Geochemistry* 35(5), 647-660 (2004).
30. Mille ,G; Asia ,L.; Guiliano, M.; Malleret, L.; Doumenq, P. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 566-575, (2007).

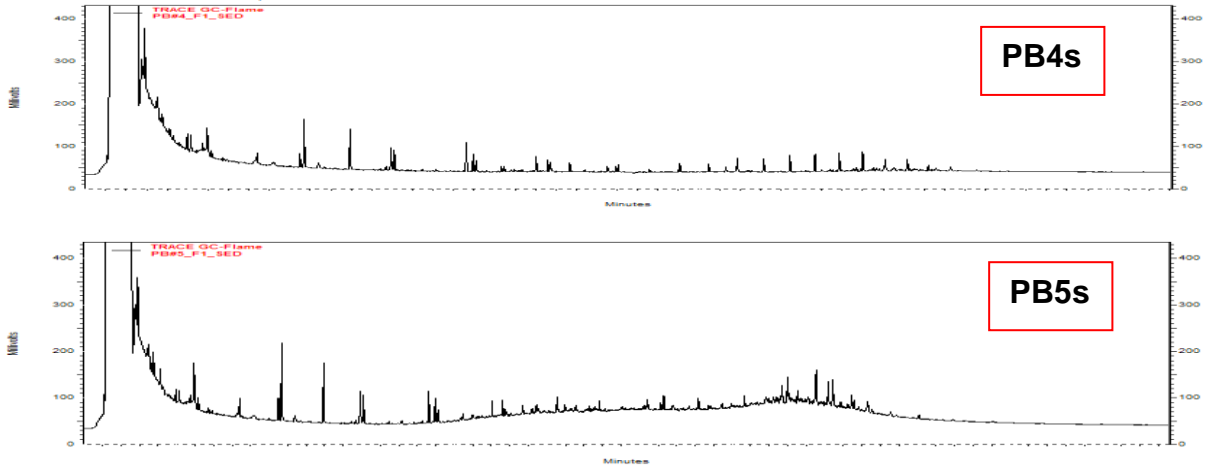
ANEXO A - Curvas analíticas para a quantificação dos HA

	R²	Parâmetro linear A	Parâmetro linear B
C9	0,9829	1,00E+06	-1,00E+06
C10	0,9862	1,00E+06	-1,00E+06
C11	0,9965	1,00E+06	-155384
C12	0,9962	1,00E+06	575,06
C13	0,9961	1,00E+06	82097
C14	0,9959	1,00E+06	176957
C15	0,9957	1,00E+06	346442
C16	0,995	1,00E+06	1,00E+06
C17	0,9952	1,00E+06	815483
PRIS	0,9952	1,00E+06	536985
C18	0,9952	1,00E+06	436660
FIT	0,9955	1,00E+06	224674
C19	0,9951	1,00E+06	75786
C20	0,9952	1,00E+06	115565
C21	0,9952	1,00E+06	95362
C22	0,9954	1,00E+06	137873
C23	0,9955	1,00E+06	148832
C24	0,9956	1,00E+06	155929
C25	0,9958	1,00E+06	320717
C26	0,9961	9,87E+05	301327
C27	0,9963	941394	385158
C28	0,9964	9,24E+05	506354
C29	0,9963	9,17E+05	643801
C30	0,9959	8,66E+05	758350
C31	0,995	8,29E+05	936554
C32	0,994	7,91E+05	992850
C33	0,9925	7,74E+05	1,00E+06
C34	0,9913	7,62E+05	1,00E+06
C35	0,9902	7,13E+05	1,00E+06
C36	0,9893	7,17E+05	1,00E+06
C37	0,9883	7,29E+05	1,00E+06
C38	0,9861	7,06E+05	1,00E+06
C39	0,995	6,40E+05	-2,56E+05
C40	0,9958	6,79E+05	5,85E+05

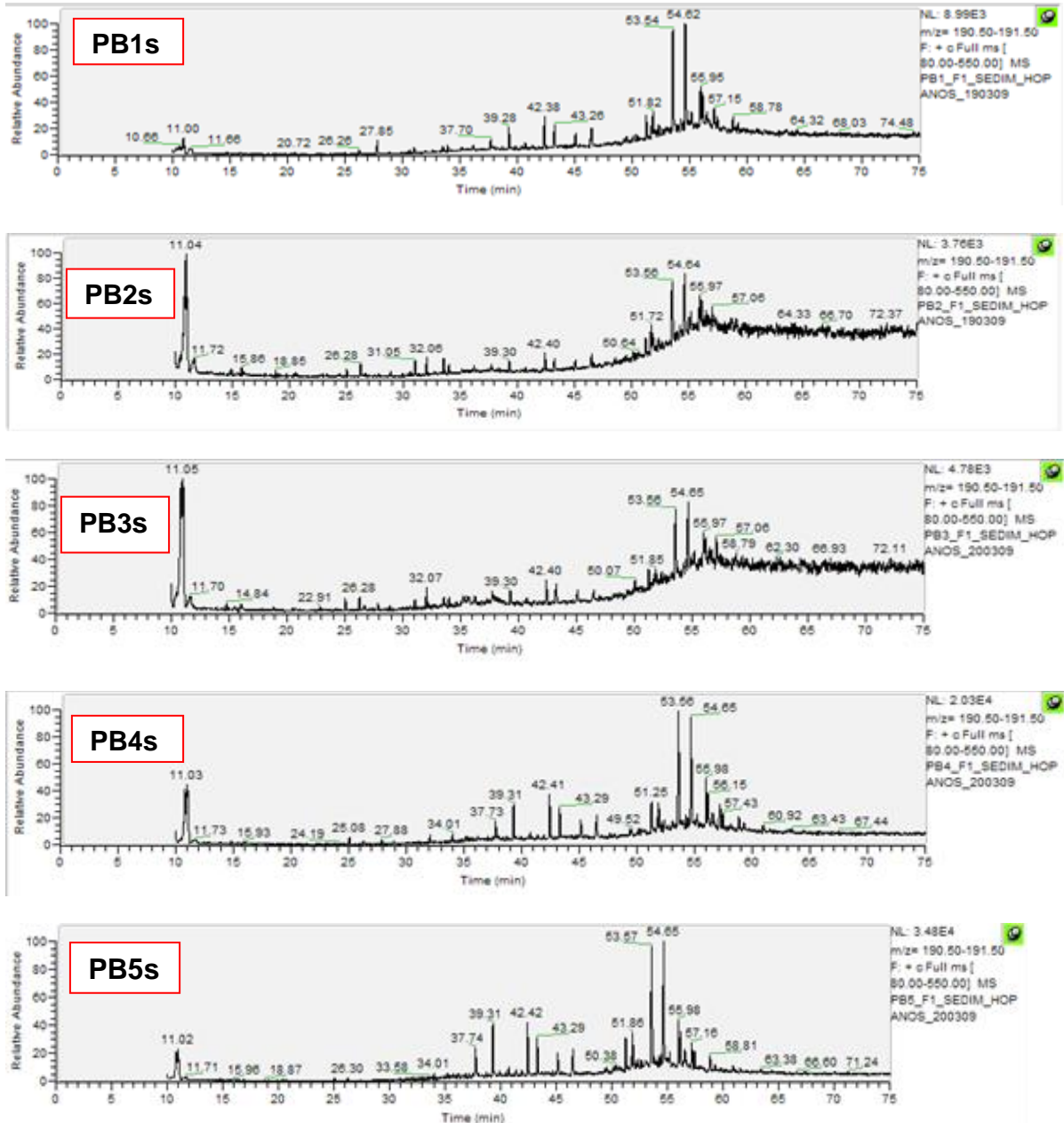
ANEXO B- Cromatogramas

A.1. n-Alcanos

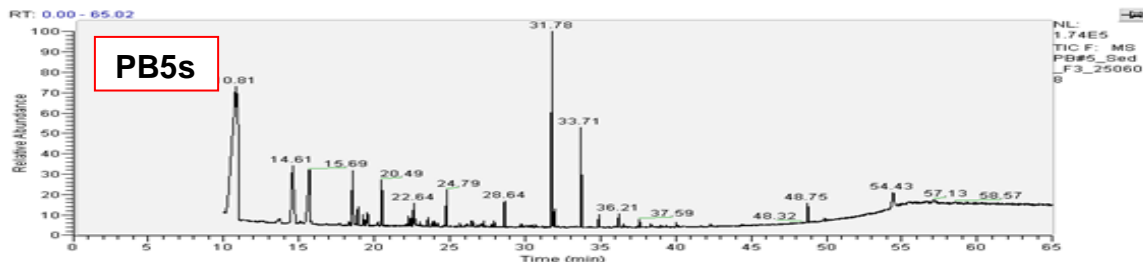
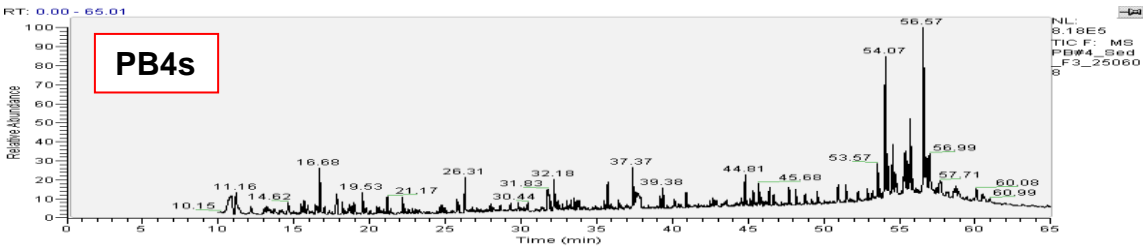
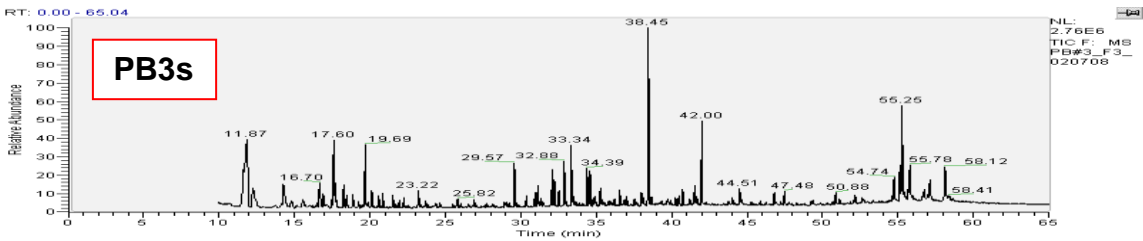
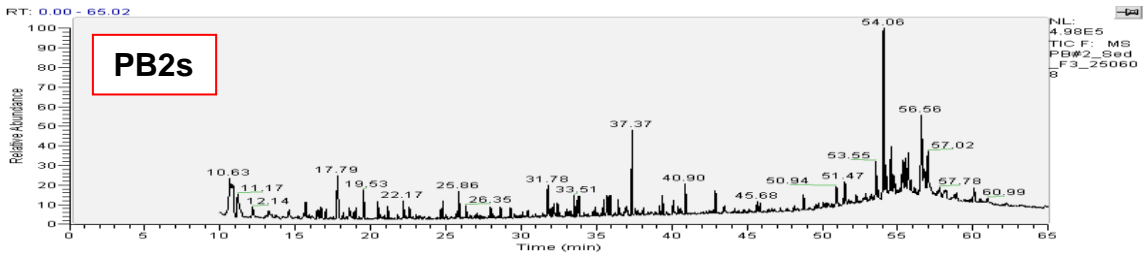
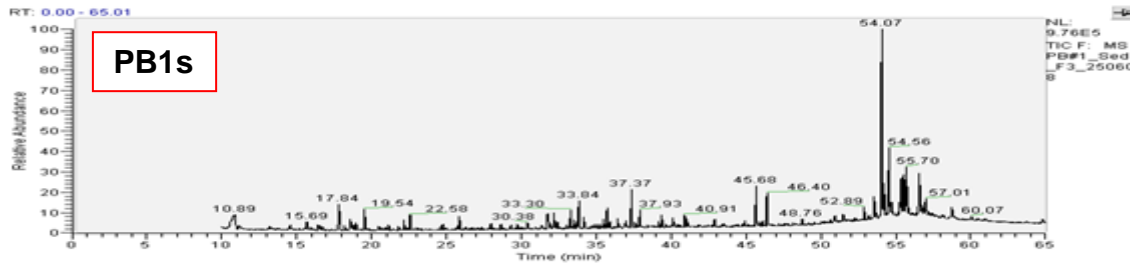




A.2. Hopanos



A.3. Esteróis



A.3. HPA

