

Avaliação da biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi, Florianópolis, SC

por

Cristiane Rossi de Oliveira

Universidade Federal de Santa Catarina
Pós-Graduação em Química
Departamento de Química
Grupo de Geoquímica Orgânica

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre
em Química na Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador: Dr. Luiz Augustos dos Santos Madureira

Florianópolis
2006

**“AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE PIRENO PELA MICROBIOTA NATIVA EM
SEDIMENTO DO MANGUEZAL DO ITACORUBI, FLORIANÓPOLIS, SC”**

Cristiane Rossi de Oliveira

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós – Graduação em Química da Universidade federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

na área de geoquímica orgânica.

Aprovado por:

Prof. Dr. Luiz Augusto dos S. Madureira
orientador

Prof. Dr. Faruk J. N. Aguilera
coordenador

Banca examinadora:

Prof^ª. Dra. Maria M. de Souza Sierra

Prof. Dr. Marcos Rivail

Dra. Marilda Fernandes

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
FEVEREIRO/2006

“A consciência ecológica levanta-nos um problema de uma profundidade e de uma vastidão extraordinárias. Temos de defrontar ao mesmo tempo o problema da Vida no planeta Terra, o problema da sociedade moderna e o problema do destino do homem. Isto obriga-nos a repor em questão a própria orientação da civilização ocidental. Na aurora do terceiro milênio, é preciso compreender que revolucionar, desenvolver, inventar, sobreviver, viver, morrer, anda tudo inseparavelmente ligado.”

Edgar morin

*Dedico este a DEUS
e a meus pais.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sempre iluminar o meu caminho, pela infinita proteção nos momentos mais difíceis.

A meus pais e irmãos, por estar sempre a meu lado, dando apoio e incentivo.

A meu orientador Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira, pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Faruk Nome e Jacks Priebe pela utilização do cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Rosendo pela utilização do autoclave e capela de fluxo laminar.

À central de Análises e Capes, pelo apoio técnico e financeiro.

A todos os colegas do LQAG e Central de análises, pela colaboração na parte laboratorial, pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIações E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I.....	01
1. INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO II.....	04
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Manguezais – ocorrência, origem e definição.....	04
2.2. Região de estudo.....	06
2.3. Contaminação por vazamentos ou derramamentos de derivados de petróleo.....	09
2.4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	10
2.5. Processos de biodegradação.....	15
CAPÍTULO III.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Localização da área de estudo.....	21
3.2. Coleta das amostras.....	23
3.3. Limpeza da vidraria.....	24
3.4. Solventes, padrões, adsorventes e reagentes.....	24
3.5. Instrumentação.....	26
3.6. Parâmetros experimentais.....	27
3.7. Análise do sedimento.....	28
3.7.1. Extração da amostra.....	28
3.7.2. Fracionamento da amostra.....	29
3.8. Preparação do sedimento contaminado com pireno.....	31
3.9. Ensaio de biodegradação.....	32
3.10. Ensaio de recuperação.....	33
3.11. Avaliação do efeito da temperatura, pH e tempo na biodegradação de pireno.....	34
CAPÍTULO IV.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Análise qualitativa do sedimento.....	35
4.1.1. Carbono orgânico total, nitrogênio total e enxofre total.....	35
4.1.2. Extrato Orgânico Total.....	38
4.1.3. Perfil dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) e aromáticos (F2).....	40

4.2. Curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).	42
4.3. Ensaio de recuperação.....	43
4.4. Efeito da temperatura, pH e salinidade.....	44
4.5. Biodegradação de	47
CAPÍTULO V.....	50
5.	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores característicos dos índices para caracterização da origem dos HPA.....	12
Tabela 2.2. Fórmula estrutural e algumas propriedades dos 16 HPA prioritários.....	13
Tabela 3.1. Relação dos solventes, padrões, adsorventes e reagentes utilizados.....	25
Tabela 3.2. Parâmetros utilizados nas análises fluorimétricas.....	27
Tabela 3.3. Parâmetros cromatográficos utilizados nas análises.....	28
Tabela 3.4. Dados experimentais referentes a micro coluna cromatográfica.....	30
Tabela 3.5. Teste da concentração de pireno em amostras aleatórias do sedimento padrão.....	32
Tabela 4.1. Média das frações de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e razões molares entre nitrogênio total e carbono orgânico total (C/N), para as superficiais de sedimento.....	35
Tabela 4.2. Resultados dos testes de recuperação do p-terfenil d-14 após a etapa de liofilização com extração seguida de fracionamento (LEF)	44
Tabela 4.3. Razão entre as concentrações de pireno remanescentes no sedimento.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Localização do Manguezal do Itacorubi.....	7
Figura 2.2. Vista aérea Manguezal do Itacorubi.....	8
Figura 2.3. Exemplo de um processo de aromatização dos diterpenóides em ambiente redutor.....	11
Figura 2.4. Esquema sugerido para dois subprodutos de degradação do anel aromático.....	19
Figura 2.5. Propostas de rotas para biodegradação do pireno.....	20
Figura 3.1. Localização do ponto de coleta no Manguezal do Itacorubi.....	22
Figura 3.2. Passarela das Graças, Manguezal do Itacorubi.....	22
Figura 3.3. Sedimento superficial do manguezal do Itacorubi.....	23
Figura 3.4. Ensaio de Biodegradação de pireno em sedimentos superficiais do manguezal do Itacorubi.....	33
Figura 4.1. Espectro de IV de uma amostra do sedimento seco e peneirado do manguezal do Itacorubi.....	37
Figura 4.2. Cromatograma do extrato orgânico total esterificado do sedimento.	39
Figura 4.3. Fragmentograma (m/z = 85) da fração dos hidrocarbonetos alifáticos.....	41
Figura 4.4. Curva analítica para pireno obtida em triplicata para o GC-MS utilizando criseno- <i>d</i> ₁₂ como padrão interno ($\sigma = 0,00526$).....	43
Figura 4.5. Efeito da temperatura na biodegradação do pireno a pH 7 durante 72 horas.....	45
Figura 4.6. Efeito do pH na biodegradação do pireno a 40 °C.....	46
Figura 4.7. Porcentagem de pireno biodegradada.....	48

ABREVIações E Símbolos

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APP	Área de Preservação Permanente
ASTM	American Society For Testing And Materials
BTEX	Benzeno, toluene, etilbenzeno e xilenos
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COT	Carbono Orgânico Total
DCM	Diclorometano
DNOS	Departamento Nacional de Obras e Saneamento
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
GPS	Global Positioning System
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
http	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
HTPV	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo Voláteis
HX	Hexano
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IV	Infravermelho
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MO	Matéria Orgânica
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
r	Coefficiente de correlação
UCM	Mistura complexa não resolvida
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a
USEPA	United States Environmental Protection Agency

RESUMO

A localização dos manguezais é estrategicamente propícia à contaminação podendo, portanto, receber poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), organoclorados e lixo doméstico. Os HPA compreendem uma classe de compostos orgânicos provenientes da pirólise ou combustão incompleta da matéria orgânica podendo apresentar características carcinogênicas. Existem várias formas para remover os HPA do meio ambiente, porém o principal processo para a sua bem-sucedida remoção e eliminação é a transformação microbiológica e degradação. Neste trabalho foi investigado o processo de biodegradação do pireno por microorganismos presentes em amostras superficiais de sedimentos do manguezal do Itacorubi. O processo de biodegradação do pireno foi analisada com o objetivo de verificar a eficiência do meio em remover contaminantes orgânicos via microorganismos. A temperatura e o pH ótimos para a biodegradação de pireno foram de 40 °C e pH 8. Em apenas 12 dias 90 % do pireno adicionado foi biodegradado sem necessidade de nutrientes adicionais sendo a bactéria *Mycobacterium sp.* apontada pela literatura como o principal microorganismo responsável pela degradação do pireno.

ABSTRACT

Mangroves are located in regions vulnerable to contamination. Hence, they can receive organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), organochlorinated compounds and domestic sewage. PAHs include substances derived from pyrolysis or incomplete combustion of organic substances which may have carcinogenic characteristics. There are some ways to remove PAH from the environment. However, the main process for its well-succeeded removal and elimination is microbiological transformation and degradation. In this work, the biodegradation process of pyrene using a bacteria consortium in superficial sediments samples of the Itacorubi mangrove was investigated. The biorremediation process was monitored with the purpose of verifying the efficiency of the environment in removing organic pollutants by microorganisms. The optima temperature and pH for the biodegradation of pyrene were 40 °C and pH 8. In 12 days, 90% of the added pyrene had been biodegraded without addition of nutrients. *Mycobacterium sp.* has been reported by the literature as the main microorganism responsible for pyrene degradation.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Diante da revolução tecnológica e da globalização o interesse na preservação do ambiente vem aumentando constantemente e atualmente o tema vem sendo muito discutido por órgãos governamentais e pela população.

A situação do meio ambiente no globo nos desafia a preservar os recursos naturais e, ao mesmo tempo, possibilitar um desenvolvimento social justo, permitindo que as sociedades humanas atinjam uma melhor qualidade de vida em todos os aspectos. A necessidade de consolidar novos modelos de desenvolvimento sustentável exige a construção de alternativas de utilização dos recursos naturais, orientada por uma racionalidade ambiental e uma ética da solidariedade.

Muitas empresas hoje entendem que em um cenário cada vez mais competitivo, sua imagem está relacionada à conscientização de seus empregados de que o aprimoramento da qualidade, a minimização de impactos ambientais e a segurança do homem e do patrimônio são fatores decisivos para o aumento da produtividade. Apesar disso o nível de contaminação em efluentes industriais e em ambientes próximos a esses sítios é preocupante e uma das principais fontes de contaminação de ambientes marinhos está diretamente relacionada às indústrias petrolíferas.

As atividades de mineração no mar podem causar diversos tipos de impactos ambientais aos ecossistemas marinhos, principalmente devido à destruição de habitats, que é um dos principais fatores que causam o declínio do número de

espécies em todo o globo. Além de interferir diretamente no fundo submarino, as atividades de mineração podem causar um aumento da turbidez da água, com conseqüências para a produtividade primária local, introduzir e promover a liberação de nutrientes, causando a eutrofização e, também, a introdução de substâncias tóxicas, que quando incorporadas à biota, alteram o crescimento, a taxa de reprodução e a sobrevivência das espécies.

Os métodos para identificação dos impactos ambientais das atividades de mineração no mar visam estabelecer se estas introduzem poluentes, determinar a biodisponibilidade desses poluentes, verificar a existência de respostas mensuráveis do ambiente e estabelecer a relação causal entre resposta e poluentes.

A utilização do petróleo traz grandes riscos para o meio ambiente desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases que poluem a atmosfera. Os piores danos acontecem durante o transporte de combustível, com vazamentos em grande escala de oleodutos e navios petroleiros.

No Brasil, os dois piores acidentes aconteceram em oleodutos da Petrobras. Em março de 1997 o rompimento de um duto que liga a Refinaria de Duque de Caxias (RJ) ao terminal DSTE-Ilha D'Água provocou o vazamento de 2,8 milhões de óleo combustível em manguezais na Baía de Guanabara e em agosto de 1999 na refinaria de Repar na grande Curitiba (PR) houve um vazamento de 3 metros cúbicos de nafta de xisto, produto que possui benzeno.

Para enfrentar os riscos ambientais a Petrobras criou o Programa Pégaso onde várias universidades brasileiras desenvolvem pesquisas para criar formas eficientes para a limpeza de áreas degradadas (PETROBRAS).

A remediação natural é a forma mais barata de atenuação e vem sendo monitorada e desenvolvida como tecnologia de recuperação de áreas impactadas.

Esta técnica baseia-se em mecanismos naturais de atenuação, envolvendo processos físicos, químicos e biológicos sem a intervenção humana, reduzindo a concentração de contaminantes (USEPA, 1997).

De todas as técnicas de remediação natural, a biorremediação vem sendo bastante documentada na recuperação de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo por utilizar o potencial metabólico de certos microorganismos e diminuir o caráter tóxico de determinados compostos.

Devido ao aumento do número de áreas impactadas com hidrocarbonetos de petróleo surge a necessidade de desenvolver novas técnicas de atenuação. Com este intuito o objetivo geral do trabalho é avaliar a biodegradação do pireno adicionado em sedimentos superficiais provenientes do Manguezal do Itacorubi, Florianópolis, SC. O pireno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) considerado como um dos prioritários no monitoramento de impacto ambiental causado por derrame de petróleo.

Como objetivos específicos desta dissertação podemos citar:

- a. Identificar os compostos presentes no extrato orgânico de amostras de sedimento do manguezal;
- b. Avaliar a presença de possíveis HPA;
- c. Identificar prováveis produtos da biodegradação do pireno;
- d. Otimizar a técnica de biodegradação de HPA para o sedimento do Manguezal.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Manguezais – ocorrência, origem e definição.

O manguezal é considerado um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho. Característico de regiões tropicais e subtropicais está sujeito ao regime das marés, dominado por espécies vegetais típicas, às quais se associam com outros componentes vegetais e animais.

O ecossistema de manguezal está associado às margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras, onde haja encontro de águas de rios com a do mar, ou diretamente expostos à linha da costa. A cobertura vegetal, ao contrário do que acontece nas praias arenosas e nas dunas, instala-se em substratos de vasa de formação recente, de pequena declividade, sob a ação diária das marés de água salgada ou, pelo menos, salobra.

A riqueza biológica dos ecossistemas costeiros faz com que essas áreas sejam os grandes "berçários" naturais, tanto para as espécies características desses ambientes, como para peixes e outros animais que migram para as áreas costeiras durante, pelo menos, uma fase do ciclo de sua vida (Olinto, 2003).

No mundo existem cerca de 162.000 km² de manguezais sendo que o Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo: desde o Cabo Orange no Amapá até o município de Laguna em Santa Catarina.

Os manguezais são de grande importância ecológica devido as suas produtividades animal e vegetal. Esses ecossistemas desempenham importante papel como exportadores de matéria orgânica para o estuário, contribuindo para produtividade primária na zona costeira e fazendo com que estas áreas atuem como um importante produtor de peixes. As raízes do mangue funcionam como filtros na retenção dos sedimentos, impedindo assim, a erosão e ao mesmo tempo estabilizando a costa fornecendo habitat para as mais variadas formas de vida.

De todos os ecossistemas, o manguezal é um dos mais produtivos e também o mais vulnerável aos efeitos do desenvolvimento econômico e do crescimento desordenado das populações humanas. Por localizarem-se em regiões costeiras e estuarinas estão em uma localização propícia à contaminação tanto terrestre como marítima. Os manguezais recebem grande quantidade de água por diversas vias podendo receber poluentes orgânicos, como HPA e organoclorados, metálicos, provindo do continente através de rios e lagos, e marinhos, através das correntes marítimas e das variações das marés (Hansel, 2000).

Os principais fatores que causam alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do manguezal são: aterro e desmatamento, queimadas, deposição de lixo, lançamento de esgoto, lançamentos de efluentes industriais, dragagens, construções de marinas e pesca predatória (Flores - Verdugo *et al*, 1997 e suas ref.; Olinto, 2003).

Áreas costeiras são classificadas como um dos ambientes mais críticos para acidentes envolvendo derramamento de óleo, isto devido ao longo tempo de residência do material fóssil nestes ambientes, que pode exceder a 10 anos, com um tempo estimado de recuperação de 20 anos (Gundlach & Hayes, 1978).

Os sedimentos são particularmente susceptíveis à poluição por óleo desde que estes estejam em regiões produtoras ou de transporte de óleo, ou outras atividades antrópicas (Burns *et al.*, 1993). O vazamento e permanência de óleos contendo grandes quantidades de HPA podem penetrar e acumular em sedimentos de manguezal (Ke *et al.*, 2002). O grau da contaminação por HPA nesses sedimentos varia conforme o ambiente, dependendo da sua proximidade com atividades humanas, formas e tipos de poluição e propriedades do sedimento, em particular, composição da matéria orgânica e tamanho das partículas (Tam *et al.*, 2001).

2.2. Região de estudo.

O manguezal do Itacorubi localiza-se na Ilha de Santa Catarina, banhada pelas águas da Baía Norte, entre as coordenadas 27°34'14"-27°35'31" LS e 48°30'07"-48°31'33" LO (Soriano - Sierra, 1998), possuindo uma área de 1,42 km² (Figura 2.1). O manguezal é cortado por dois cursos de água, o Rio Itacorubi e um afluente, o Rio Sertão, que deságua a 230 m da desembocadura do primeiro. O bosque do Manguê está circundado por bairros da Cidade de Florianópolis, atravessado por uma rodovia e cortado por vários canais do DNOS (Departamento Nacional de Obras e Saneamento) como mostrado na Figura 2.2.

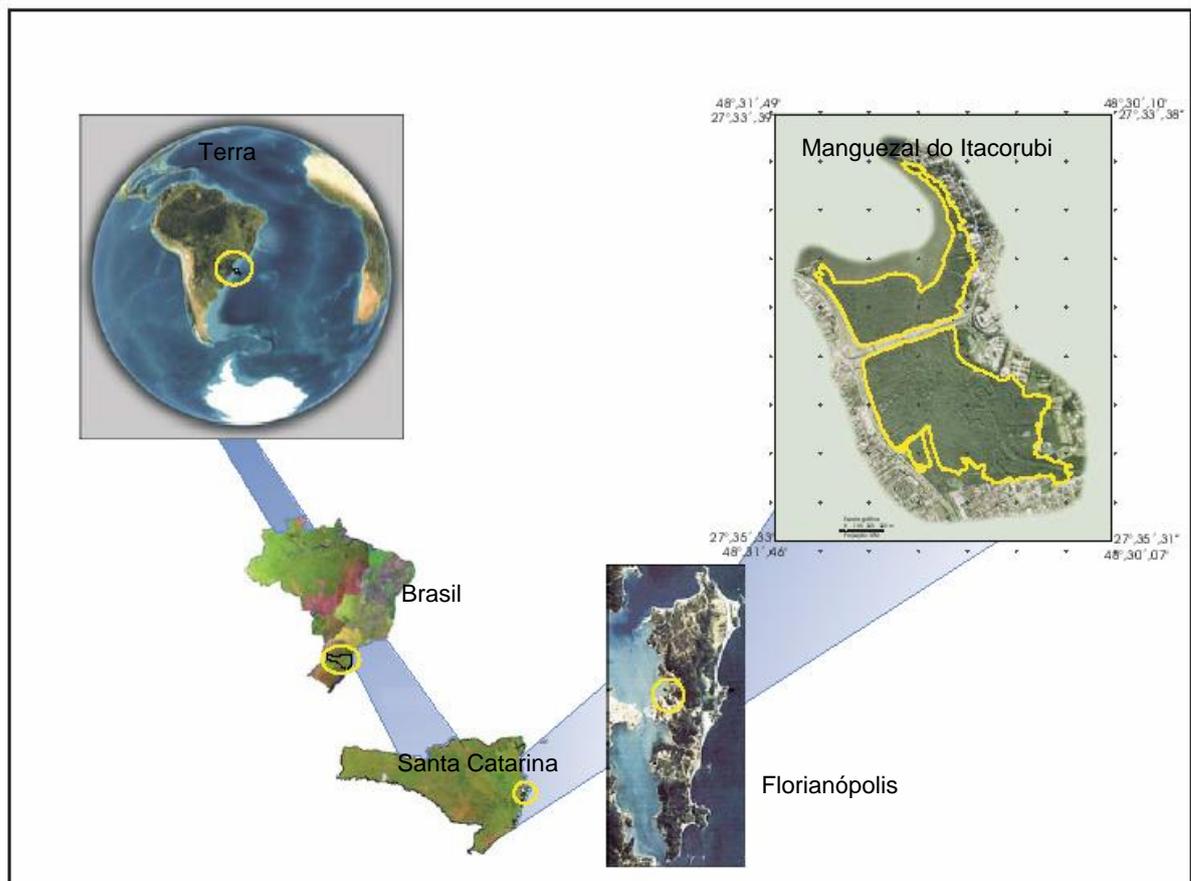


Figura 2.1. Localização do Manguezal do Itacorubi (Oliveira & Panitz, 2003).

Apesar de ser considerado Área de Preservação Permanente (APP) e Patrimônio da Humanidade pela UNESCO, o Manguezal tem sido objeto de manejo incorreto por parte, tanto da administração pública, quanto da população, o que vem resultando na eliminação de grande parte de sua área para obtenção de terra para a construção de casas e rodovias (Soriano – Sierra *et al.*, 1998).

O sedimento do Manguezal apresenta coloração pardo-cinza, característica de ambiente redutor, e uma fina camada superficial oxidada marrom-laranja. É constituído por silte-argila, sendo que nos locais mais elevados, a fração areias finas torna-se mais significativa. A concentração de matéria orgânica em amostras superficiais é muito variável, pois o solo apresenta grandes variações de

marés transportando a matéria orgânica e nutrientes concentrando-os dentro do próprio sistema, e não os exportando (Soriano-Sierra *et al.*, 1998).



Figura 2.2. Vista aérea do Manguezal do Itacorubi (Oliveira & Panitz, 2003).

2.3. Contaminação por vazamentos ou derramamentos de derivados de petróleo.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e, em menor escala de compostos oxigenados, nitrogenados, sulfurados e metais pesados (Scolfield *et al.*, 2002). A destilação e craqueamento do óleo cru produzem várias frações do petróleo com aplicações comerciais definidas. Essas frações são distinguidas pelo número de átomos de carbono e do ponto de ebulição, como gasolina, óleo diesel, nafta, solventes e querosenes, GLP (gás liquefeito de petróleo) e parafinas. Sua composição e aspecto variam segundo o histórico geológico e a natureza da matéria orgânica de cada depósito. Os hidrocarbonetos presentes compreendem classes de compostos orgânicos como alcanos, alcenos, alcinos, cicloalcanos (naftênicos) e aromáticos.

O óleo diesel é uma mistura complexa proveniente da primeira etapa do refino, a destilação primária, com hidrocarbonetos variando de C₈ a C₃₀, sendo composto de aproximadamente 40% de n-alcanos, 40% de iso e cicloalcanos e 20% de hidrocarbonetos aromáticos (Lee *et al.*, 1992).

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos totais de petróleo voláteis (HTPV) são utilizados para avaliação da extensão e pontos de maior concentração de compostos orgânicos hidrofóbicos em leitos de contaminação ambiental por petróleo. Os HTP compreendem os compostos alifáticos e poliaromáticos mais pesados do petróleo e os HTPV compreendem os compostos mais voláteis de baixa massa molar, como os compostos monoaromáticos (BTEX). Desta forma os HTP têm maior importância na investigação de contaminação de solo e tem sido aceita por agências reguladoras ambientais para avaliação e

monitoramento no processo de remediação de áreas contaminadas (ASTM, 1994; USEPA, 2000a).

2.4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) compreendem uma classe de compostos orgânicos que contêm carbono e hidrogênio combinados em dois ou mais anéis aromáticos condensados, podendo haver ou não substituição, e são provenientes da pirólise ou combustão incompleta da matéria orgânica (Wang *et al.*, 2004). No meio ambiente eles existem como compostos tendo de dois a sete anéis condensados (Chang *et al.*, 2002).

As propriedades químicas dos HPA são dependentes em parte do tamanho da molécula, isto é, do número de anéis aromáticos e da configuração da molécula. A configuração dos HPA pode ocorrer de tal forma que carbonos terciários aparecem no centro de dois ou três anéis condensados, como no antraceno e no pireno. Geralmente, o aumento no tamanho e na angulação na molécula resulta no aumento da hidrofobicidade e estabilidade eletroquímica. Sua atividade mutagênica está fortemente relacionada com a conformação da molécula. Os HPA são solúveis em solventes orgânicos, mas apresentam baixa solubilidade em água. De modo geral, quanto maior a massa molar, mais baixa a solubilidade em solventes aquosos.

Os HPA encontrados em amostras ambientais podem ser de origem biogênica (fontes naturais) ou antrópicas, introduzidas pelo homem. A quantidade de HPA proveniente de processos naturais é geralmente baixa quando comparada com os de origem petrogênica.

As fontes biogênicas incluem os processos de biossíntese em plantas e posterior aromatização a longo prazo, erupções vulcânicas, combustão natural de florestas e exsudação natural de petróleo (Baek *et al*, 1991). O processo de aromatização pode ser ilustrado, por exemplo, (Figura 2.3) pela transformação dos diterpenóides, constituintes predominantes das resinas de plantas terrestres após a deposição em um ambiente redutor (Johns, 1986).

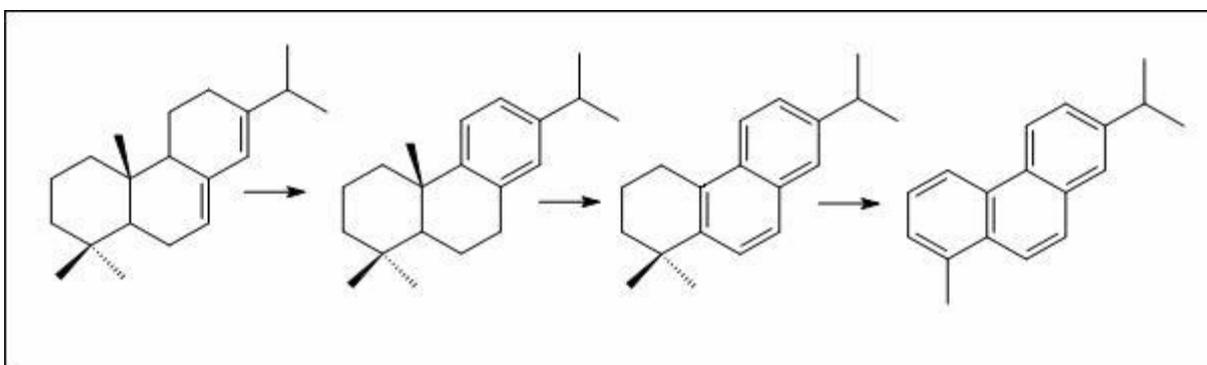


Figura 2.3. Exemplo de um processo de aromatização dos diterpenóides em ambiente redutor.

Hidrocarbonetos de origem pirogênica, provenientes da queima de florestas e de combustíveis fósseis, são caracterizados pela predominância de HPA com 4 e 5 anéis não alquilados. Os compostos de origem petrogênica são caracterizados por possuírem predominantemente hidrocarbonetos de baixa massa molar, três anéis aromáticos ou menos, com alta proporção de homólogos alquilados, sulfurados e heterocíclicos.

Alguns índices baseados na razão da concentração de alguns HPA podem ser usados para descrever a sua origem. Estes índices devem-se ao fato de que durante processos a baixa temperatura, como os que ocorrem durante a formação de petróleo, a distribuição de HPA é governada por propriedades termodinâmicas e para processos a alta temperatura, como na pirólise de matéria orgânica, a

distribuição de HPA é geralmente governada por características cinéticas. A distribuição de HPA e a concentração relativa de HPA simétricos ou alquilados são, portanto dependentes da temperatura e do processo que estes são gerados (Baumard *et al.*, 1998). Podemos citar dois índices bastante utilizados na Tabela 2.1 (Readman *et al.*, 2002; Scolfield *et al.*, 2002).

Tabela 2.1. Valores característicos dos índices para caracterização da origem dos HPA

	[fenantreno]/[antraceno]	[fluoranteno]/[pireno]
Origem pirolítica	<10	>1
Origem petrogênica	>15	<1

Ao longo dos últimos 20 anos houve aumento no interesse pela contaminação do meio ambiente por HPA devido às suas características de resistência à biodegradação microbiológica, persistência e porque vários desses compostos apresentam natureza tóxica, mutagênica e carcinogênica. Vários HPA são considerados poluentes para o meio ambiente por afetarem o habitat da flora e fauna, resultando na acumulação de elementos tóxicos nas cadeias alimentares e, em alguns casos, sérios problemas de saúde e defeitos genéticos em humanos (Edwards, 1983; Liu *et al.*, 2001).

Tumores em organismos marinhos estão geralmente associados à contaminação por aromáticos / poliaromáticos. Segundo USEPA, estudos com animais reportam alterações enzimáticas nas mucosas do trato gastrointestinal e aumento no peso do fígado, a partir da ingestão de HPA (efeito agudo). Distúrbios no fígado e no sistema imune, leucemia, câncer e tumores no pulmão e estômago são alguns dos efeitos reportados por estes compostos. Os compostos aromáticos

mais solúveis penetram na corrente sanguínea a partir da pele ou da ingestão, podendo ser filtrados pelo sistema excretor e eliminados na urina. Alguns HPA têm capacidade de causar danos nas células sanguíneas, nos tecidos ósseos (medula óssea) e no sistema nervoso. Causam irritações e dermatite na pele, mucosas e olhos (CETESB).

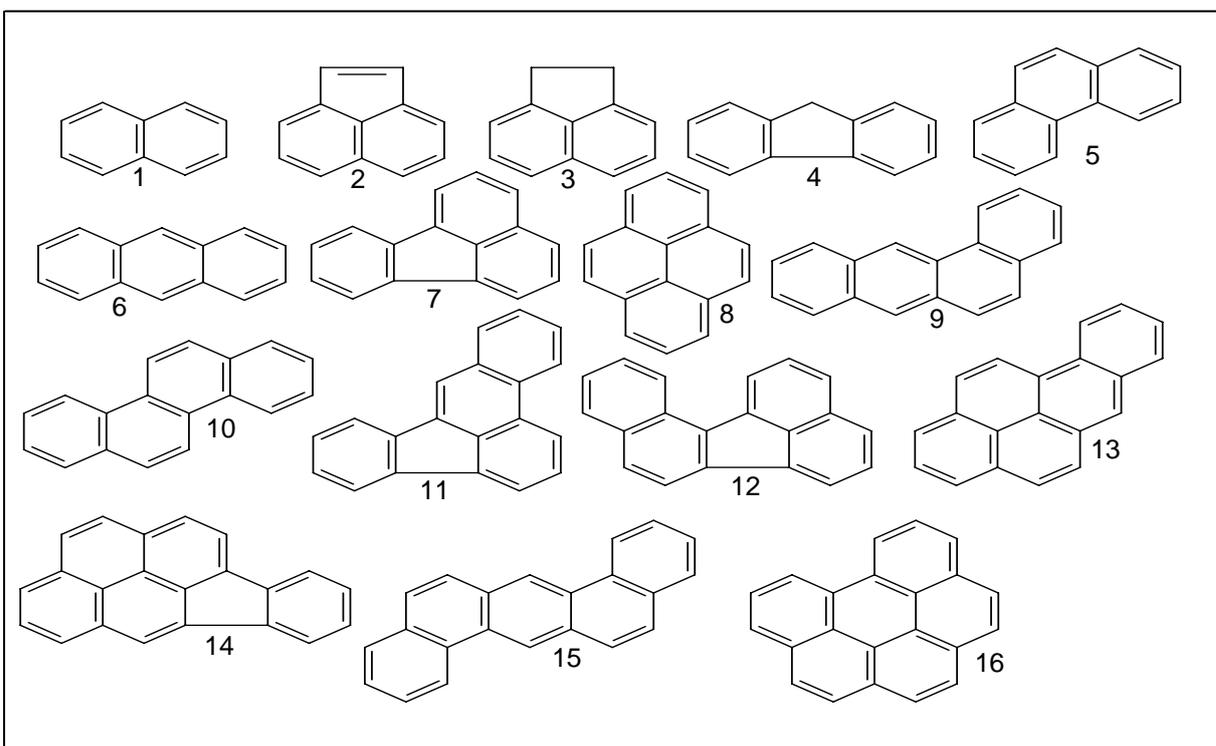
Esses compostos são fortemente adsorvidos no sedimento devido às suas características lipofílicas, persistindo por muitos anos no ambiente. Conseqüentemente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) tem listado 16 HPA como poluentes prioritários para remediação nos diferentes tipos de ambientes (sedimento, água, solo e biota). A Tabela 2.2 mostra algumas informações como estrutura, atividades carcinogênicas e propriedades físicas dos 16 HPA prioritários (Brown *et al.*, 1978; Kennish, 2002).

Os efeitos carcinogênicos mostrados são de estudos feitos em animais e a toxicidade dos compostos listados na Tabela 2.2 é indicada pelos símbolos:

Tabela 2.2. Fórmula estrutural e algumas propriedades dos 16 HPA prioritários

	HPA	Nº de anéis	PF (°C)	PE (°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (torr a 20°C)	Atividade Carcinogênica
1	Naftaleno	2	80	218	30	4,9x10 ⁻²	-
2	Acenaftileno	3	92	265	3,93	2,9x10 ⁻²	-
3	Acenafteno	3	96	279	3,47	2,0x10 ⁻²	-
4	Fluoreno	3	16	293	1,98	1,3x10 ⁻²	-
5	Fenantreno	3	101	340	1,29	6,8x10 ⁻⁴	-
6	Antraceno	3	216	340	7x10 ⁻²	1,9x10 ⁻⁴	-
7	Fluoranteno	4	11	375	2,6x10 ⁻¹	6,0x10 ⁻⁶	-

8	Pireno	4	149	360	$1,4 \times 10^{-1}$	$6,8 \times 10^{-7}$	-
9	Banzo(a)antraceno	4	158	400	$1,4 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-9}$	+
10	Criseno	4	255	448	2×10^{-3}	$6,3 \times 10^{-7}$	±
11	Benzo(b)fluoranteno	5	167	480	$1,2 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-7}$	++
12	Benzo(k)fluoranteno	5	217	480	$5,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-7}$	-
13	Benzo(a)pireno	5	179	496	$3,8 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-7}$	+++
14	Indeno(1,2,3,cd)pireno	6	163	536	$6,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-10}$	+
15	Dibenzo(a,h)antraceno	6	262	524	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-10}$	+++
16	Benzo(g,h,i)perileno	6	222	545	$2,6 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-10}$	-



- não carcinogênico;
- ± fracamente carcinogênico;
- + carcinogênico;
- ++ } muito carcinogênico.
- +++ }

Altas concentrações de HPA no meio ambiente são geralmente associadas a fontes antrópicas como combustão incompleta de combustíveis fósseis, derrame de óleo, tráfego de navios e efluentes industriais. Eles representam um grupo de contaminantes conhecidos por seu predomínio e persistência em ambientes impactados por petróleo (Chang et al., 2002).

No meio ambiente eles podem ser removidos por vários processos, incluindo volatilização, foto-oxidação, oxidação química, bioacumulação e adsorção em partículas de sedimento. Acredita-se, porém, que a degradação por microorganismos é um dos principais processos para remover HPA de sedimentos contaminados. Estudos anteriores têm reportado que comunidades de microorganismos, como certas bactérias e determinados fungos, têm considerável potencial de biorremediação de sedimentos contaminados com óleo (Yuan *et al.*, 2001; Samanta *et al.*, 2002; entre outros).

2.5. Processos de biodegradação.

A biodegradação é uma forma de biotransformação que ocorre pela simplificação na estrutura de compostos orgânicos através da quebra das ligações intramoleculares, alterando sua toxicidade e propriedade de degradação.

As bactérias marinhas e fungos desempenham um papel fundamental na degradação e remoção de hidrocarbonetos no ambiente aquático. Existem aproximadamente 200 espécies de microorganismos aquáticos capazes de degradar hidrocarbonetos. Dentre os gêneros de bactérias mais aptos à biodegradação, encontram-se o *Mycobacterium* e *Pseudomonas*, bem como os fungos do gênero *Cladosporium* e *Cunninghamella* (Cerneglia, 1992).

A biodegradação por bactérias possui algumas características específicas como o crescimento e metabolismo acelerados, a plasticidade genética e a habilidade de se ajustar rapidamente a uma variedade de ambientes. Essas características fazem das bactérias os agentes mais comumente envolvidos nos processos naturais de biodegradação dos componentes do petróleo, principalmente os saturados de baixa massa molar no ambiente marinho.

Poucos estudos têm relatado comunidades de fungos e de interação HPA-fungo em ambientes contaminados marinhos. Salvo *et al.* (2005) encontraram comunidades de fungos com alta capacidade para degradação *in situ* de compostos xenobióticos em ambientes impactados.

A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo pelos microorganismos ocorre através de reações de oxidação-redução, onde os contaminantes são oxidados na presença de certos receptores de elétrons. O solo, normalmente, apresenta altas concentrações de oxigênio dissolvido, nitrato, ferro (III), sulfato e dióxido de carbono, substâncias capazes de receber os elétrons liberados na oxidação dos hidrocarbonetos (Fernandes, 2000).

No caso de um derrame de petróleo ou derivados, todos os hidrocarbonetos são degradados simultaneamente, porém em diferentes velocidades. Os hidrocarbonetos n-alcenos, de baixa massa molar (C_{10} a C_{20}), são metabolizados mais rapidamente, seguidos pelos *iso*-alcenos e n-alcenos de alta massa molar, olefinas, monoaromáticos, HPA e, finalmente, por cicloalcenos, resinas e asfaltenos. Estudos realizados por Wang *et al.* (1998) revelaram diferenças entre os padrões de composição dos HPA em óleos, após processos de biodegradação em relação aos que sofreram intemperismo físico.

A biodegradação é um processo lento e sua cinética pode estar condicionada à concentração de oxigênio, temperatura, nutrientes (especialmente o nitrogênio e o fósforo), salinidade, receptores de elétrons, pH, composição estrutural dos hidrocarbonetos e biodegradabilidade dos compostos (Raymond *et al.*, 2001).

A biodegradação ocorre inicialmente por catabolismo aeróbico onde a microbiota nativa encontra-se em um ambiente com oxigênio e nutrientes necessários para poder utilizar os HPA como fonte de energia. Uma freqüente característica do mecanismo utilizado na degradação desses compostos é a adição do grupo hidroxila. Geralmente dois grupos hidroxilas são introduzidos e o dihidrodiol produzido é um subproduto adicional da degradação.

A redução na concentração do oxigênio dissolvido em amostras de sedimento é um forte indício de que o consórcio de bactérias já está degradando os hidrocarbonetos via reações aeróbicas. Normalmente, a concentração de oxigênio dissolvido é mais baixa em ambientes onde ocorreu contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

Poucos trabalhos vêm sendo desenvolvidos sobre a biodegradação de HPA em condições anaeróbicas. Algumas pesquisas sugerem que HPA com dois ou três anéis aromáticos podem ser degradados anaerobicamente sob condições de redução de sulfato e de redução de nitrato. Para degradação anaeróbica de compostos com mais de três anéis aromáticos, como o pireno, em sedimento foram encontradas bactérias redutoras de sulfato envolvidas no processo (Chang, *et al.*, 2002).

A taxa de biodegradação depende do tipo de HPA presente no meio. Os hidrocarbonetos aromáticos de baixa massa molar são relatados por serem afetados pela volatilização e por processos de degradação abióticos. Uma relação inversa

tem sido mostrada entre a velocidade de biodegradação e o número de anéis aromáticos, provavelmente, devido à mudança na solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade do HPA, que é dependente de sua estrutura molecular.

HPA com baixa massa molar como naftaleno, tem alta solubilidade em água e são menos lipofílicos que os compostos com alta massa molar podendo atuar sozinhos como fonte de carbono e energia para as bactérias presentes no solo. Espécies de alta massa molar não podem atuar sozinhas como fontes de carbono e energia sendo necessário à introdução de nutrientes para poder utilizá-las como fonte de energia.

No meio ambiente, HPA podem associar-se a partículas e matéria orgânica dissolvida e depositar-se sobre o sedimento. A sorção de contaminantes orgânicos pela matéria orgânica natural geralmente limita a biodisponibilidade dos substratos, e é um importante fator afetando na velocidade de degradação microbiológica em solos e sedimentos (Grosser *et al.*, 2000).

A biodegradação do pireno tem sido citada por alguns grupos e alguns têm identificado os metabólitos e proposto mecanismos (Cerneglia, 1992; Li *et al.*, 1996). Relata-se que quando introduzido em culturas de *Mycobacterium* cerca de 60% de pireno são degradados em apenas 96 h. Sete metabólitos de pireno foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e múltiplas análises. Três são produtos de oxidação do anel, *cis*-4,5-dihidrodiolpireno, *trans*-4,5-dihidrodiolpireno e pirenol, e quatro produtos de fusão do anel, 4-hidroxiperinaftenona, ácido 4-fenantróico, ácido ftálico e ácido cinâmico, sendo o ácido 4-fenantróico o metabólito majoritário.

A detecção do *cis* – e *trans*-4,5-dihidrodiolpireno sugere que o ataque ao pireno se inicia de diferentes formas. Estudos usando $^{18}\text{O}_2$ confirmam que esses

produtos foram inicialmente catalisados pelas enzimas dioxigenase e monooxigenase, respectivamente (Figura 2.4) e rotas de biodegradação foram propostas (Figura 2.5) (Cerniglia, 1992, Li *et al.*, 1996).

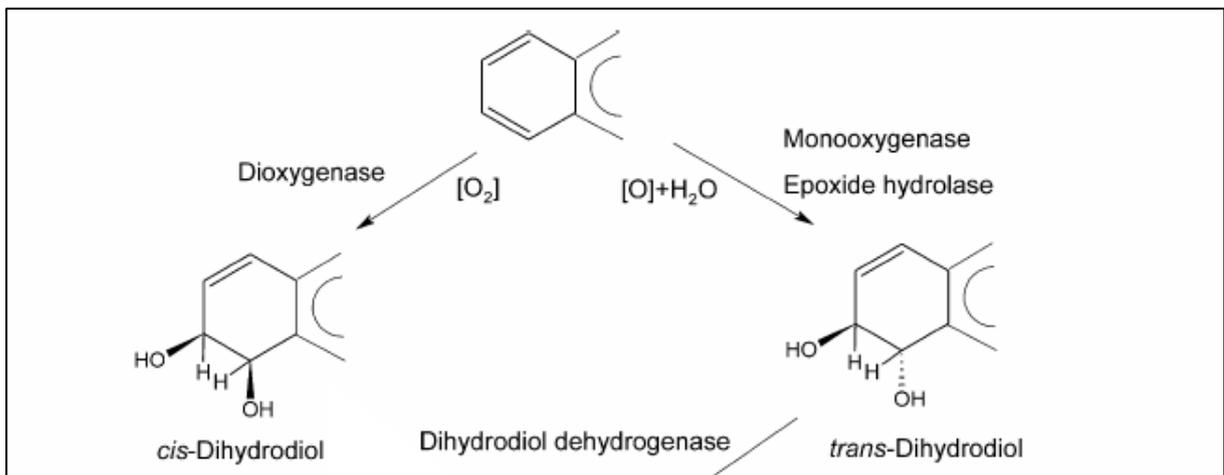


Figura 2.4. Esquema sugerido para dois subprodutos de degradação do anel aromático.

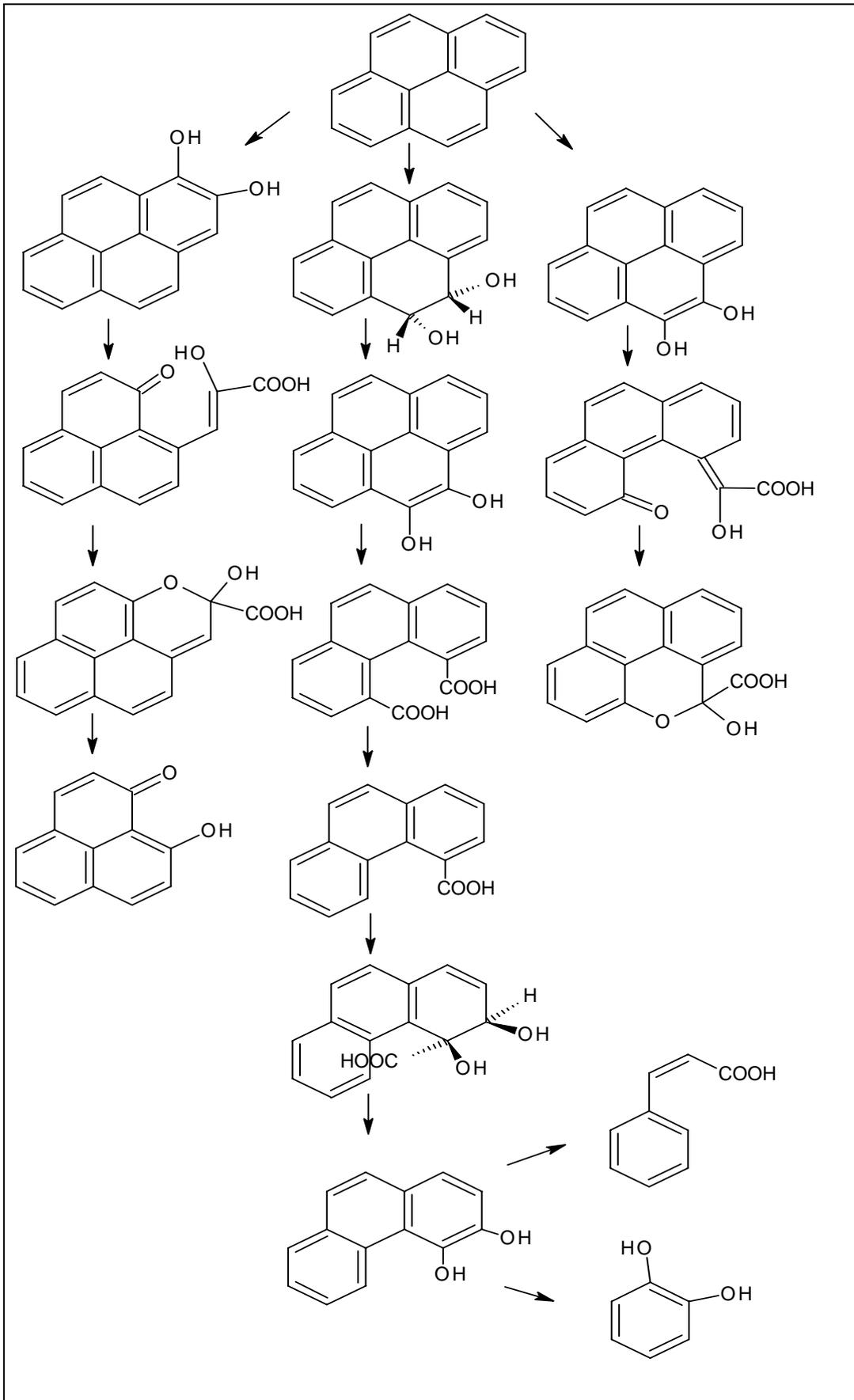


Figura 2.5. Propostas de rotas para biodegradação do pireno (Cerneglia, 1992).

CAPÍTULO III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Localização da área de estudo.

O ponto escolhido no Manguezal de Itacorubi ($27^{\circ}34'63''S$ e $48^{\circ}31'13''WO$) é apresentado na Figura 3.1, sendo este estratégico, pois o local é considerado impactado por localizar-se às margens da Avenida da Saudade, principal acesso para a rodovia SC-401 e rodovia Admar Gonzaga (SC 404). Rodovias que ligam o centro de Florianópolis ao Norte e ao Leste da ilha, respectivamente, sendo de elevado tráfego de automóveis.

O local é conhecido como Passarela das Garças (Figura 3.2) e situa-se na foz do rio Sertão e do rio Itacorubi e está sob a influência constante das marés.



Figura 3.1. Localização do ponto de coleta no Manguezal do Itacorubi (Google earth)



Figura 3.2. Passarela das Garças, Manguezal do Itacorubi (27°34'63''S e 48°31'13''WO).

3.2. Coleta das amostras.

Os sedimentos foram coletados até uma profundidade de 10 cm em uma superfície isenta de folhas com o auxílio de um amostrador do tipo Van-Veen (Figura 3.3) e transferidos para frascos de vidro previamente limpos com a precaução de envolver as mãos com luvas de polietileno.

A água utilizada foi coletada às margens da área de coleta do sedimento com o auxílio de uma garrafa de vidro limpa e um suporte metálico evitando-se assim, o contato com as mãos.

Após a coleta, sedimento e água foram levados ao laboratório e imediatamente utilizados para evitar que o meio de cultura presente fosse inutilizado. O sedimento foi ainda centrifugado e foi medida a salinidade da água intersticial.

O sedimento coletado é composto por cerca de 57,5% de silte, 32,6% de argila e 5,9% de areia, pH médio de 6,6 e concentração de matéria orgânica variando entre 18,7 e 1,2%, com média de 10,7% (Soriano-Sierra *et al.*, 1998). Os valores reportados são uma média entre 9 amostras.



Figura 3.3. Sedimento superficial do manguezal do Itacorubi.

3.3. Limpeza da vidraria.

A vidraria utilizada foi lavada com detergente, enxaguada com água corrente em abundância e imersa em uma solução hidroalcoólica preparada a partir de 100 g de hidróxido de potássio em 1 L de solução etanol-água destilada (9:1). Em seguida os recipientes foram enxaguados em água corrente e água deionizada, respectivamente, lacrados com papel alumínio e secos na mufla a uma temperatura de 450 °C durante quatro horas. Vidrarias sensíveis à temperatura foram secas em estufa (40°C) (Hansel, 2000).

3.4. Solventes, padrões, adsorventes e reagentes.

Os solventes utilizados foram previamente analisados, sendo a pureza constatada pela injeção de um volume de 1,0 µL do solvente no GC-MS e também, pela análise de sua fluorescência quando necessário.

Os padrões utilizados foram pireno, criseno d₋₁₂ e p-terfenil d₋₁₄ sendo todas as soluções padrões preparadas com hexano (tabela 3.1).

Tabela 3.1 Relação dos solventes, padrões, adsorventes e reagentes utilizados

Solventes, padrões e reagentes.	Fabricante	Pureza
Hexano	Mallinckrodt Chemicals	HPLC
Diclorometano	Tedia	HPLC
Metanol	Burdick & Jackson	HPLC
Ácido clorídrico	Quimex	Analítico
Hidróxido de sódio	Vetec	Analítico
Pireno	Sigma	Cromatográfico
Criseno-d ₋₁₂	Supelco	Padrão Interno
p-Terfenil d ₋₁₄	Dr. Ehrenstorfer	Surrogate
Hidróxido de potássio	Vetec	Analítico
Etanol	Candura	Comercial
Alumina neutra	Fluka	Cromatográfico
Sílica gel	Merck	Cromatográfico
Azida sódica	Baker Analysed	Analítico
Cobre metálico	Synth	Analítico
Algodão de vidro	Synth	Analítico
Nitrogênio	White Martins	4.6
Acetona	Nuclear	Analítico

3.5. Instrumentação.

A localização do ponto de amostragem foi feita utilizando um GPS da marca Etrex Legend-Garmin.

Os sedimentos foram liofilizados em um liofilizador HETO acoplado a bomba EDWARDS – E2M2.

A salinidade do meio foi medida em um refratômetro portátil.

As amostras de sedimento foram pesadas em uma balança analítica METLER – H80 (precisão $\pm 0,5\text{mg}$). As soluções padrões foram preparadas com auxílio de uma balança analítica METLER TOLEDO – AT21 (precisão $\pm 0,005\text{mg}$).

Para esterilização do sedimento foi utilizado autoclave vertical Phoenix e para o preparo das amostras capela de fluxo laminar com lâmpada de UV Quimis.

Para agitação e termostatização dos erlenmeyers foi utilizada uma incubadora shaker orbital NOVATECNICA – NT712.

Os tubos de ensaio contendo sedimento e solvente foram colocados em ultrassom UNIQUE – USC 1450 (25kHz), agitador de tubos tipo vortex PHOENIX – AP56, centrífuga FANEN – EXCELSA BABY II – 206R e rota vaporizador FISATON 802 com banho termostatizado 550D (1200W).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Finnigan Trace GC ultra, com uma coluna capilar Rtx[®]-5MS de 30 metros de comprimento, espessura do filme de fase estacionária de $0,25\mu\text{m}$ e diâmetro interno de $0,25\text{mm}$, acoplado a espectrômetro de massas Finnigan – Polaris Q, no qual o gás de arraste utilizado foi o Hélio. As análises foram feitas no modo varredura total (50 a 500u) e no modo SIM (m/z 220 para o pireno, m/z 236 e 240 para o criseno-d₁₂

e m/z 244 para terfenil-d₁₄) quando conveniente com ionização por impacto de elétrons (70eV).

As análises de fluorescência foram realizadas em um PERKIN ELMER – LS-5B.

A vidraria utilizada previamente calibrada foi seca em estufas FANEM-315SE e QUIMIS-Q-317B242 e as demais foram calcinadas em mufla QUIMIS-Q31824.

Para análise complementar do sedimento utilizou-se um IV PERKIN ELMER - FT16PC e analisador elementar CHNS CARLO ERBA – EA1100.

3.6. Parâmetros experimentais.

Os parâmetros utilizados para as análises fluorimétricas e cromatográficas estão descritos nas tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente.

Tabela 3.2. Parâmetros utilizados nas análises fluorimétricas

Split entrada	10 nm
Split saída	5 nm
Comprimento de onda inferior de varredura	360 nm
Comprimento de onda superior de varredura	440 nm
Comprimento de onde de excitação	334 nm

Tabela 3.3. Parâmetros cromatográficos utilizados nas análises

Razão do Split	1 : 40
Fluxo do gás carregador	1 mL min ⁻¹
Temperatura inicial do forno	40 °C
Tempo de isoterma a 40°C	4 min
Taxa de aquecimento entre 40 e 290°C	8 °C min ⁻¹
Tempo de isoterma a 290°C	10 min
Temperatura do injetor	280 °C
Temperatura do detector	300 °C
Quantidade de amostra injetada	1,0 µL

3.7. Análise do sedimento.

Previamente foi feita a análise da composição do sedimento para determinação qualitativa de possíveis HPA existentes no meio.

3.7.1. Extração da amostra.

Amostras liofilizadas pesando entre 3 e 4 g foram distribuídas em tubos de ensaio, nos quais adicionou-se 10 µL da solução padrão de p-terfenil d₋₁₄ (5 µg mL⁻¹) em cada tubo. Em seguida efetuou-se três extrações sucessivas com diclorometano (DCM), sempre em ultrassom por 30 min ($\nu = 25$ kHz) em cada etapa. As amostras foram agitadas antes das extrações com o auxílio de um agitador do tipo vortex. O volume total de solvente utilizado em cada etapa da extração foi proporcionalmente 1:1 em relação ao sedimento. Os extratos foram então centrifugados

($g = 167,7 \text{ cm s}^{-2}$ por 3 min.), combinados e concentrados a um volume conveniente (1 mL) no rota vaporizador (temperatura do banho 50 °C). Uma porção da amostra foi utilizada para análise do extrato total realizando-se sua esterificação com metanol: cloreto de acetila (10:1) por 12 horas em estufa a 60 °C.

3.7.2. Fracionamento da amostra.

Os adsorventes utilizados foram sílica gel e alumina neutra (Tabela 2.1). Inicialmente foram purificados com diclorometano (DCM - grau analítico) no extrator Soxhlet por 24 horas, e após secos foram ativados em uma mufla durante 4 horas a temperatura de 400 °C (Collins *et al*, 1993) e armazenados em estufa a 100 °C até o uso. Para a confecção da micro coluna cromatográfica foi utilizado como suporte uma pipeta de Pasteur sendo empacotada com sílica gel (2 cm, porção superior) e alumina neutra (1 cm, porção inferior) sobre lã de vidro (0,08 g). Os adsorventes foram introduzidos cuidadosamente no interior da coluna a seco. Após o empacotamento foi eluído um volume equivalente a uma altura da coluna de DCM e outra de hexano (HX), sempre mantendo um nível de 1 mm do solvente acima do adsorvente. Os dados referentes a micro coluna cromatográfica de vidro podem ser encontrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Dados experimentais referentes a micro coluna cromatográfica

Comprimento	12,0 cm
Diâmetro interno	0,5 cm
Altura da Fase Estacionária	3 cm
Massa de Silica Gel	~0,5 g
Massa de Alumina Neutra	~0,25 g
Massa da Lã de Vidro	0,08 g
Vazão	1 – 2 mL min ⁻¹

Após a extração do material (seção 3.6.1.), o solvente foi totalmente evaporado com o auxílio de um leve fluxo de nitrogênio, e a amostra rapidamente diluída em 1 mL de hexano. Esta solução foi cuidadosamente inserida no interior da micro coluna com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Um balão de 50 mL foi colocado embaixo da coluna e iniciou-se o recolhimento da fração um (F1). Adicionou-se na micro coluna 5 mL de hexano escoando solvente até a altura de 1 mm acima do adsorvente (final da primeira fração, F1). O frasco de 50 mL foi substituído por outro idêntico rapidamente para dar início a segunda eluição. Em seguida foi feita uma lavagem no frasco do extrato com 1 mL diclorometano (NOAA, 1993), inserindo-o seqüencialmente no interior da micro coluna, com posterior eluição do solvente até a altura 1mm acima do adsorvente. Após adicionou-se na coluna 5 mL de diclorometano permitindo-se a seguir a eluição do solvente obtendo-se a segunda fração (F2). Os solventes dos frascos F1 e F2 foram concentrados a um volume conveniente com a ajuda de um rota vaporizador seguido de um leve fluxo de nitrogênio e as amostras foram acondicionadas em congelador até as análises por GC-MS.

Observação: Detectou-se nas frações a presença de enxofre e, portanto, efetuou-se uma etapa extra. Essa etapa consistiu na retirada do enxofre molecular com o uso de cobre metálico, previamente ativado com HCl concentrado e limpo, através de sucessivas extrações com solventes, na seguinte ordem: MeOH (2x) e DCM (3x) (NOAA, 1993).

Para complementar a investigação foram feitas análises de IV e CHNS do sedimento seco e peneirado (250 μm).

3.8. Preparação do sedimento contaminado com pireno.

Não sendo encontrado pireno nas amostras de sedimento ele foi introduzido no meio para a avaliação do impacto.

Para o preparo da solução padrão de pireno pequena quantidade de sedimento foi liofilizado, macerado com auxílio de um grau, passado em uma peneira de 250 μm (# 60) e autoclavado a 110 °C.

2,06 mg de pireno foram dissolvidos em 50 mL de acetona e misturados em capela de fluxo laminar com 125 g do sedimento previamente preparado resultando em 16,5 μg de pireno por grama de sedimento. Após a acetona ter evaporado o sedimento foi homogeneizado e separado em pequenas porções de 0,5 g em envelopes individuais de alumínio resultando em 8,25 μg de pireno em cada envelope (Ke *et al.*, 2003).

Os envelopes foram novamente autoclavados para evitar a degradação do pireno e armazenados em freezer até o uso.

Primeiramente, iniciou-se um teste obtendo-se a curva analítica para o pireno em solução de hexano no fluorímetro nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 e

5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com excitação em 334 nm a temperatura ambiente e no GC-MS nas concentrações de 0,3; 0,6; 1,2; 5,0 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo cada curva feita em triplicata.

As soluções padrões foram preparadas em ultrassom (30 min.) e filtradas em funil de vidro.

Para confirmar a concentração de pireno em cada porção procedeu-se aleatoriamente a extração de três envelopes, utilizando o método descrito na seção 3.6. Filtrou-se e avolumou-se para 20 mL, para a medida de fluorescência e para 1 mL com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (criseno-*d*) para análise no GC-MS. As amostras foram armazenadas em freezer até leitura.

As concentrações medidas pela análise de GC-MS podem ser observadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Teste da concentração de pireno em amostras aleatórias do sedimento padrão

	Envelope 1	Envelope 2	Envelope 3	Média	Desvio
Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,01	2,78	2,47	2,75	0,27

3.9. Ensaio de biodegradação.

Alíquotas de 5-6 g do sedimento recém coletados e ainda úmidas foram transferidas para uma série de erlenmeyers de 250 mL com 10 mL de água do próprio meio e efetuou-se a adição de uma porção do padrão de pireno (seção 3.7) tomando o cuidado para que fique bem homogeneizado.

Os frascos foram lacrados com papel alumínio, colocados em uma incubadora shaker orbital termostatzada (Figura 3.4), longe da luminosidade e deixados sob agitação (50 rpm) por 72 horas. As análises foram realizadas em triplicata e para cada experimento foi feito um branco com sedimento autoclavado (120 °C) para poder avaliar perdas por outros tipos de processos.



Figura 3.4. Ensaio de Biodegradação de pireno em sedimentos superficiais do manguezal do Itacorubi.

3.10. Ensaio de Recuperação.

Com o objetivo de observar possíveis perdas dos compostos durante as etapas de liofilização, extração e fracionamento foram realizados testes utilizando como *surrogate* o padrão p-terfenil d-₁₄.

Logo após os ensaios de biodegradação foram adicionados 5 µg de p-terfenil d-₁₄ em três dos frascos e congelados para posterior liofilização. Em seguida efetuou-se a liofilização seguida de extração e fracionamento da amostra (seção 3.6.) e análise por GC-MS.

3.11. Avaliação do efeito da temperatura, pH e tempo na biodegradação de pireno.

Para otimização da temperatura de biodegradação as demais variáveis foram mantidas constantes e a faixa de temperatura estudada foi de 25 – 45 °C com intervalos de 5 °C. Para pH os valores utilizados foram 5, 6, 7, 8 e 9. O pH do meio foi ajustado utilizando papel indicador e solução de HCl (1,0 mol L⁻¹) e NaOH (1,0 mol L⁻¹). Para ensaio do tempo foram utilizados 72, 144, 216 e 294 horas. Cada experimento foi realizado em triplicata e para cada variável foi feito o mesmo procedimento com o meio autoclavado para análise de perdas por adsorção.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise qualitativa do sedimento

4.1.1. Carbono orgânico total, nitrogênio total e enxofre total.

As análises de CHNS foram realizadas em amostras superficiais de sedimento do Manguezal do Itacorubi. Os valores estão representados na tabela 4.1 e são uma média das análises realizadas em triplicata.

Tabela 4.1. Média das frações de carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (N), enxofre total (S) e razões molares entre nitrogênio total e carbono orgânico total (C/N), para as amostras superficiais de sedimento

	Nitrogênio %	Carbono %	Hidrogênio %	Enxofre %	Razão Molar C / N
Média (n = 3)	0,38	4,06	1,28	0,94	10,7

A razão molar C/N é amplamente utilizada para determinar a origem da matéria orgânica que pode ser aquática ou terrestre (Marchand *et al.*, 2003; Zwirter, 2003). A razão C/N é empregada para indicar a presença de celulose proveniente de plantas superiores em sedimentos. Plantas aquáticas não vascularizadas apresentam valores típicos da razão C/N entre 4 e 10. Entretanto, para plantas

terrestres vascularizadas que contém celulose, os valores da razão geralmente se apresentam superiores a 20 (Neto, 2000).

Os valores das razões C/N para as amostras de sedimentos superficiais estudadas foram próximos a 10 (tabela 4.1). Sendo, este sedimento consequentemente classificado como sedimento orgânico (Esteves, 1988), derivado de uma possível mistura de material húmico, fragmentos de plantas superiores e com maior quantidade de restos de microalgas, sendo a matéria orgânica deste predominantemente de origem autóctone.

Quando comparado a outros trabalhos realizados em sedimentos superficiais do manguezal do Itacorubi o valor da razão C/N fica muito próximo aos reportados por Souza-Sierra *et al.* (1998) para os ácidos húmicos e Mater *et al.* (2004) para sedimentos superficiais onde encontraram valores entre 6,0 e 12,1.

O enxofre total que apareceu nas amostras tem uma percentagem relativamente baixa, comparada aos outros elementos (0,94%) e geralmente não é correlacionado com outros parâmetros. No entanto, para estudos que envolvem a extração do material orgânico para posterior análise por cromatografia a gás com detectores do tipo por ionização em chama ou com o espectrômetro de massas, é importante verificar sua presença. O enxofre causa interferências na linha base de cromatogramas, dificultando assim a quantificação.

No caso das amostras de sedimento do manguezal do Itacorubi, pode-se observar no espectro de IV (Figura 4.1) uma banda em 1032 cm^{-1} que indica a presença de compostos sulfurados, sendo necessária à remoção do enxofre antes da análise cromatográfica. Em geral, o composto detectado em maior quantidade é o S_8 .

A Figura 4.1 apresenta banda em 3696 cm^{-1} característico de grupos ácidos. Esta verificação é importante em análises cromatográficas, pois normalmente os ácidos graxos são os que aparecem em maior quantidade no extrato orgânico total, interferindo na identificação de outras substâncias. Além disso, uma vez constatada a presença desses compostos, a separação cromatográfica pode ser otimizada através da esterificação da amostra, convertendo os ácidos nos seus respectivos ésteres (seção 3.6.1).

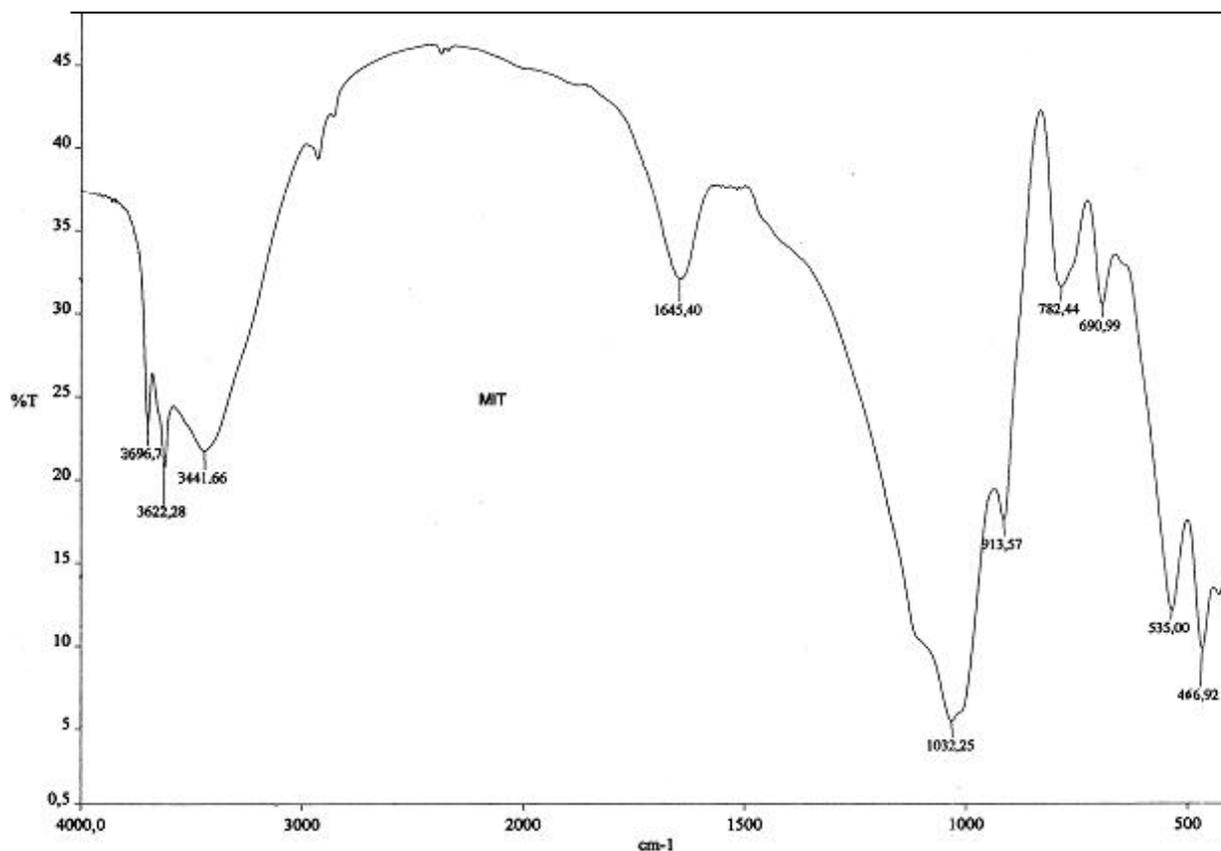


Figura 4.1. Espectro de IV de uma amostra do sedimento seco e peneirado do manguezal do Itacorubi.

4.1.2. Extrato Orgânico Total.

Na análise do extrato orgânico total esterificado, constatou-se o predomínio de uma série homóloga de ácidos graxos (A_{14} - A_{32}) seguida dos hidrocarbonetos lineares (C_{17} - C_{33}), conforme mostrado na Figura 4.2.

Os ácidos graxos, na forma de ésteres, foram identificados através do fragmentograma de massas característico m/z 74 ($C_3H_6O^{2+}$). Em termos de distribuição há uma predominância de compostos com um número par de átomos de carbono e uma distribuição bimodal com dois máximos nas faixas de A_{14} a A_{20} e A_{22} a A_{32} . Em geral, a presença de ácidos graxos com cadeias superiores a 24 átomos de carbono indica contribuição de plantas terrestres. Para os ácidos de cadeias menores do que 20 átomos de carbono a origem é atribuída a microorganismos aquáticos, como microalgas e bactérias (Neto, 2000). No entanto, é possível encontrar ácidos graxos saturados até A_{28} em alguns tipos de algas.

Como mostrado na Figura 4.2 a amostra de sedimento superficial do manguezal do Itacorubi apresenta uma faixa dos ácidos de A_{14} a A_{20} , de origem predominantemente aquática e outra de A_{24} a A_{32} , considerados de origem terrestre, apresentando características de origem mista. Quando comparados a outros ambientes, a distribuição dos ácidos graxos na superfície foi similar às encontradas nos manguezais de Ratoles, localizado no norte da Ilha de Santa Catarina, e Itacorubi (Hansel, 2000). Dados referentes aos hidrocarbonetos lineares serão mais detalhadamente discutidos na próxima seção.

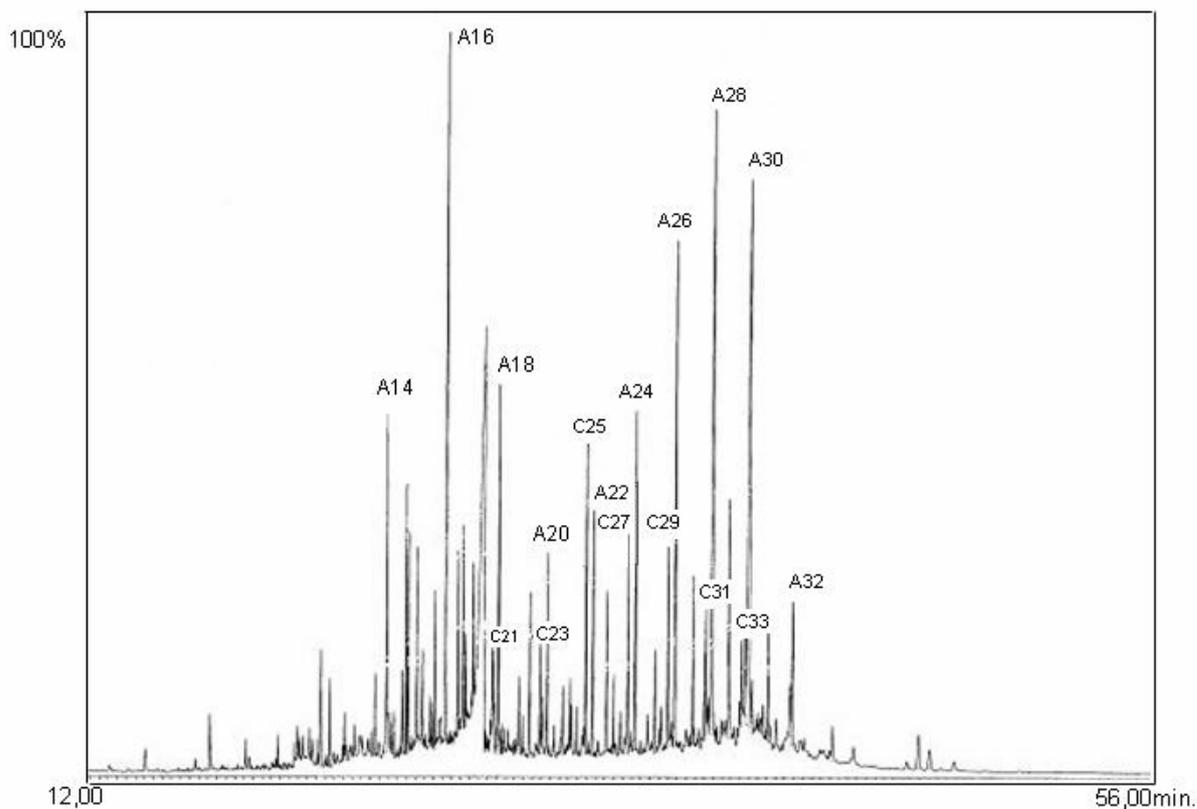


Figura 4.2. Cromatograma do extrato orgânico total esterificado do sedimento.

No cromatograma pode-se observar também um aumento da linha base na região entre A₁₄ e C₂₁. Este perfil é característico da interferência do enxofre molecular, o que indica à necessidade de se melhorar a homogeneização da mistura sedimento-cobre no procedimento de extração (seção 3.6.2) para minimizar este efeito.

4.1.3. Perfil dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) e aromáticos (F2).

Os hidrocarbonetos alifáticos (F1) são importantes constituintes de sedimentos aquáticos. Derivam de uma variedade de fontes alóctones, como plantas superiores e fontes autóctones, incluindo fitoplâncton e bactérias.

Analisando o fragmentograma $m/z = 85$ ($C_6H_{13}^+$) da primeira fração observa-se a presença de hidrocarbonetos alifáticos com predominância de compostos com números ímpares de carbono na cadeia principalmente os hidrocarbonetos C_{23} , C_{25} , C_{27} e C_{29} (Figura 4.3). Este perfil é frequentemente usado para indicar aporte de plantas superiores no sedimento, sendo provenientes de ceras epicuticulares de plantas superiores. O aporte fitoplantônico é mais difícil de reconhecer devido à baixa quantidade de hidrocarbonetos em muitas algas. No entanto, quantidades significativas de $n-C_{15}$, $n-C_{19}$ e particularmente $n-C_{17}$ são usualmente interpretados como indicadores de aporte de algas (Neto, 2000).

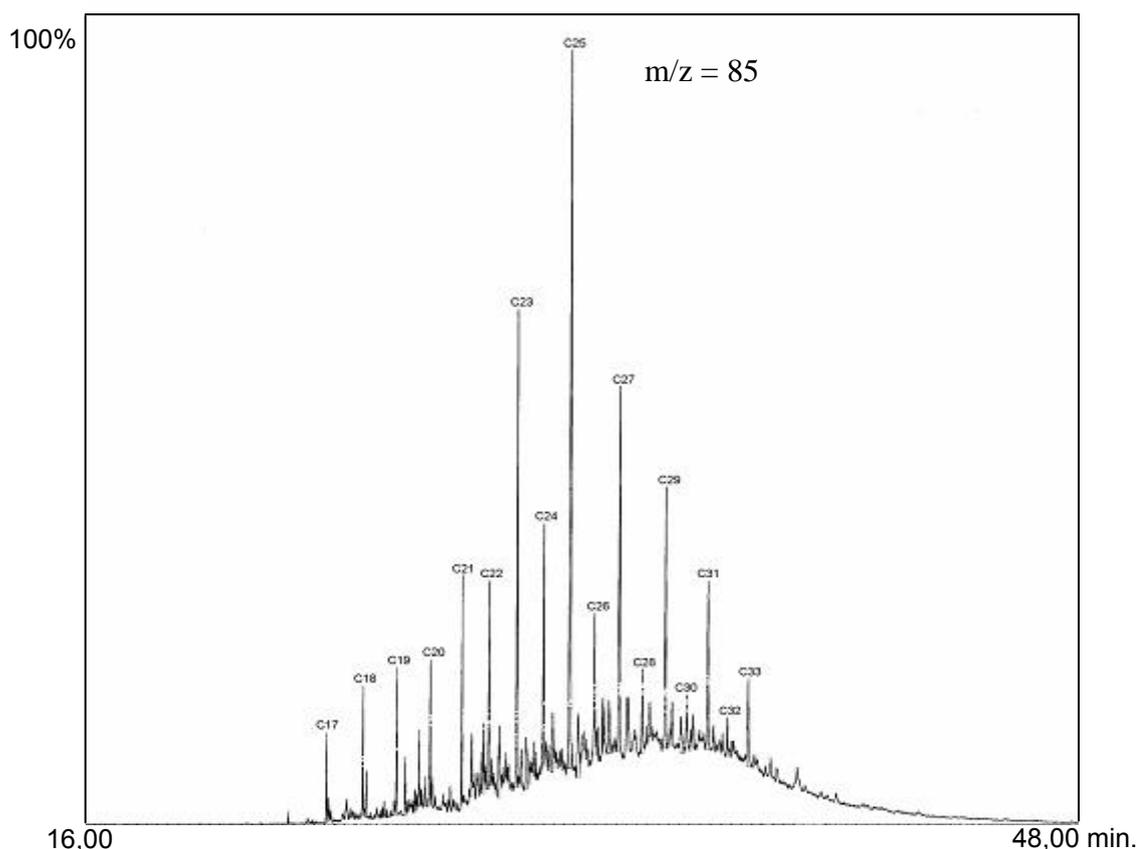


Figura 4.3. Fragmentograma ($m/z = 85$) da fração dos hidrocarbonetos alifáticos.

Na figura 4.3 observa-se a elevação da linha de base do cromatograma ao longo da análise assemelhando-se ao perfil de uma mistura complexa não resolvida (UCM), porém esta hipótese pode ser descartada, pois na presença de poluentes procedentes de combustíveis fósseis os hidrocarbonetos lineares apresentam uma distribuição linear na qual a razão entre os compostos com números de pares sob os ímpares é próximo a 1.

A partir dos resultados obtidos nas Figuras 4.2 e 4.3 e do cromatograma obtido para a segunda fração, observou-se que não foi detectada a presença de HPA no sedimento, podendo estes ter ficado abaixo do limite de detecção do método.

4.2. Curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A linearidade da curva analítica corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito. Para as curvas obtidas no fluorímetro utilizaram-se as concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pireno em solução de hexano com excitação em 334 nm.

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi escolhida por possuir alta sensibilidade, resposta rápida e fácil acesso. Porém a linha de regressão não se mostrou reprodutível, pois para cada medida em uma mesma concentração diferentes intensidades de fluorescência eram obtidas, não apresentando boa linearidade e exibindo um coeficiente de correlação (r) abaixo do recomendado pela ANVISA e pelo INMETRO, 0,99 e 0,90, respectivamente.

A baixa linearidade pode ser atribuída ao espalhamento de radiação devido ao material particulado presente nas soluções padrões, pois o filtro utilizado pode não ter sido eficiente para retirar todo material em suspensão.

Na curva analítica obtida com o GC-MS (Figura 4.4) as concentrações utilizadas foram de 0,3; 0,6; 1,2; 5,0 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ empregando como padrão interno criseno- d_{-12} (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em solução de hexano. O coeficiente de correlação médio medido foi de 0,996, ficando dentro da faixa recomendada pelos órgãos brasileiros. O Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica obtendo-se os valores de 0,024 e 0,074 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Ribani *et al.*, 2004), ficando abaixo dos valores relatados na literatura por Yuan *et al.* (2001), Chang *at al.* (2002) entre outros, também utilizando GC-MS, que encontraram valores de LD de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

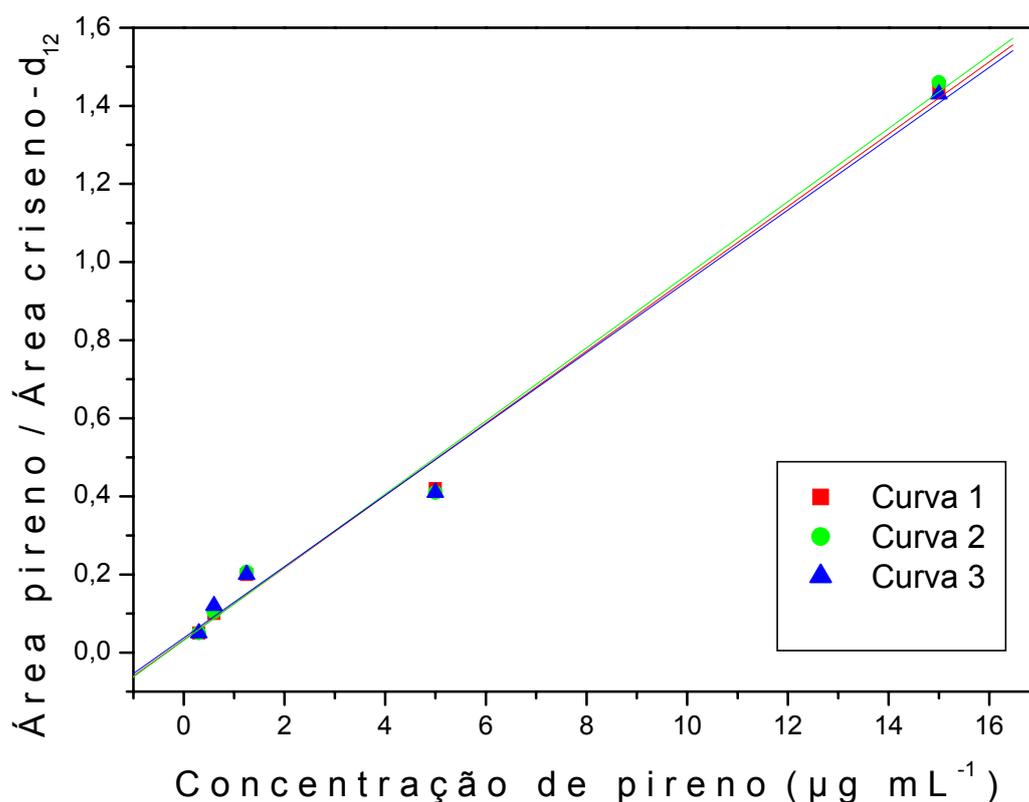


Figura 4.4. Curva analítica para pireno obtida em triplicata para o GC-MS utilizando criseno- d_{12} como padrão interno ($\sigma = 0,00526$).

4.3. Ensaios de recuperação (seção 3.8)

Com o objetivo de verificar a perda de pireno ao longo das diferentes etapas: liofilização, extração e fracionamento, foram realizados ensaios de recuperação. O procedimento foi o de avaliar a perda do *surrogate* p-terfenil d_{-14} ($5 \mu\text{g}$) adicionado logo após as amostras serem retiradas da incubadora e anteriormente ao congelamento. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados podem ser observados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Resultados dos testes de recuperação do p-terfenil d-₁₄ após a etapa de liofilização com extração seguida de fracionamento (LEF)

Amostra	m _{ad} ^a (µg)	m _{tr} ^b (µg)	REC (%)
1	5 µg	2,60	52
2	5 µg	3,22	64
3	5 µg	3,43	69

a: massa de p-terfenil d-₁₄ adicionada.

b: massa total recuperada

A dispersão dos resultados pode ser explicada pela baixa concentração em que o *surrogate* foi utilizado no experimento, sendo recomendado níveis de adição entre 50 até 150% do nível esperado para analito. Os valores aceitáveis de recuperação para análises complexas estão geralmente compreendidos entre 50 e 120%, com precisão de até $\pm 15\%$, ficando a média dos valores obtidos dentro dos limites aceitáveis: $61 \pm 8,7 \%$ (Ribani *et al.*, 2004).

4.4. Efeito da temperatura, pH e salinidade.

Para avaliar o efeito da temperatura na biodegradação do pireno em amostras de sedimento do manguezal do Itacorubi, foram utilizadas as temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C mantendo-se o pH 7 (Figura 4.5). Para o estudo do efeito do pH na biodegradação foram realizados ensaios a pH 5, 6, 7, 8 e 9 mantendo-se a temperatura a 40°C (Figura 4.6). Todos os ensaios foram realizados durante 72 horas.

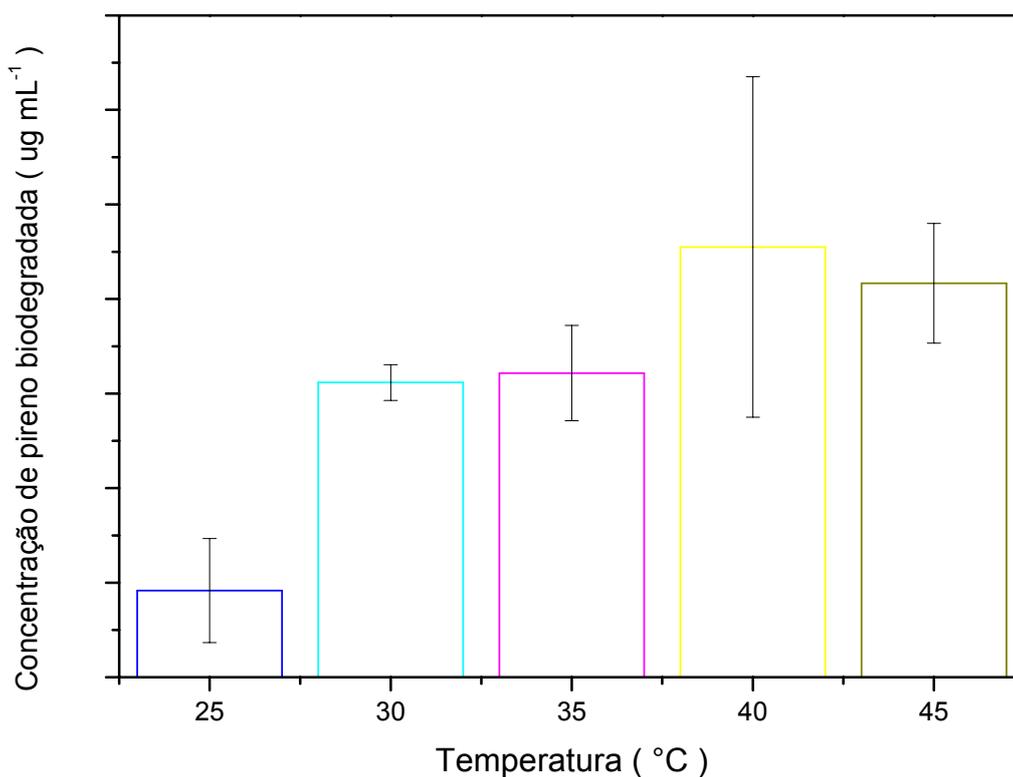


Figura 4.5. Efeito da temperatura na biodegradação do pireno a pH 7 durante 72 horas. Para 25°C: 0,183 ± 0,110 µg mL⁻¹; 30°C: 0,623 ± 0,038 µg mL⁻¹; 35°C: 0,643 ± 0,100 µg mL⁻¹; 40°C: 0,910 ± 0,360 µg mL⁻¹; 45°C: 0,833± 0,126 µg mL⁻¹ (Microcal Origin 6.0).

As concentrações dos padrões foram obtidas a partir de seus íons característicos (picos base) no GC-MS. Para o cálculo da concentração de pireno biodegradado foi levada em consideração a concentração de pireno resultante do ensaio de biodegradação, subtraída da concentração resultante do branco (caso apresentasse variação) sendo assim descartada a hipótese de perdas de concentração por outros processos.

A partir dos resultados apresentados nas figuras 4.5 e 4.6, observou-se que as melhores condições em termos de temperatura e pH para a biodegradação do pireno foram a 40 °C e pH 8. Esses resultados divergem um pouco dos reportados por Yuan *et al.* (2001) que otimizou seus parâmetros em pH 7 e 30 °C usando

sedimentos de rio em Taiwan e Chang *et al.* (2002) que reportou 30 °C e pH 8 em sedimentos do norte de Taiwan, sob condições anaeróbicas de degradação.

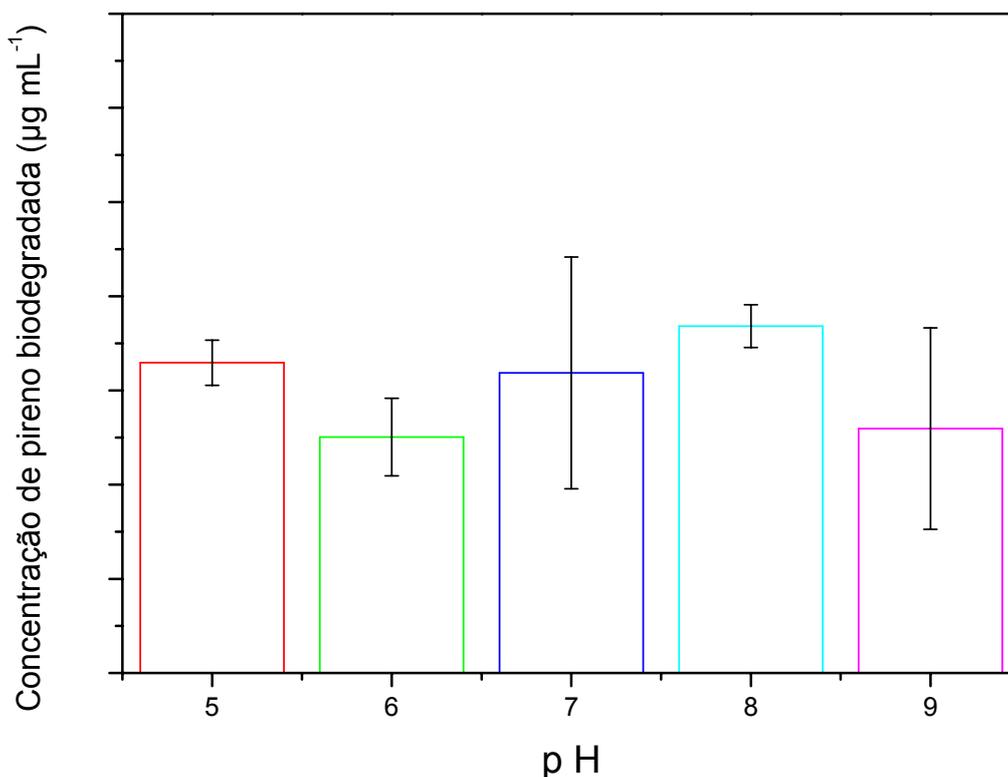


Figura 4.6. Efeito do pH na biodegradação do pireno a 40 °C. Para pH 5: $0,659 \pm 0,048 \mu\text{g mL}^{-1}$; pH 6: $0,501 \pm 0,082 \mu\text{g mL}^{-1}$; pH 7: $0,637 \pm 0,246 \mu\text{g mL}^{-1}$; pH 8: $0,737 \pm 0,045 \mu\text{g mL}^{-1}$; pH 9: $0,519 \pm 0,214 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Apesar de o clima do sul brasileiro ser subtropical como no norte de Taiwan esta variação pode ser explicada pela diferença entre os tipos de microorganismos que podem estar atuando nesses dois ambientes. Chang *et al.* (2002) reportaram que o sedimento era composto por 35,0% de argila, 31,2% de silte, 32,5% de areia e apenas 2,93% de matéria orgânica; enquanto que no sedimento do manguezal do Itacorubi foi encontrada uma média de 10,7% de matéria orgânica e apenas 5,9% de

areia (Soriano-Sierra *et al.*, 1998), atuando assim como um ambiente mais rico em fontes de energia, favorecendo o desenvolvimento de bactérias.

A medida da salinidade presente na água intersticial em 7 amostras de sedimento foi realizada entre os meses de setembro e outubro de 2005 e apresentou extremos de variação entre 20 ‰ a 30 ‰, com valor médio de 25,5 ‰. Este valor foi próximo à média obtida por Sierra durante o ano de 1998 (22,5 ‰).

Tam *et al.* (2002) reportou que para um consórcio de bactérias a alta salinidade não inibe acentuadamente seu crescimento e que a salinidade ótima de biodegradação para o fenantreno em um consórcio enriquecido foi de 10 – 20 ‰, ficando pouco abaixo do observado para manguezal do Itacorubi, porém sem grandes efeitos no retardo da taxa de biodegradação.

4.5. Biodegradação de pireno.

Para amostras de sedimento do manguezal do Itacorubi a biodegradação do pireno foi avaliada ajustando o pH para 8 e a temperatura para 40 °C. Os ensaios foram interrompidos a cada 72, 144, 216 e 294 horas, sendo cada experimento realizado em triplicata.

Analisando a Figura 4.7 observa-se que em apenas 12 dias 90 % de pireno foi degradado pelo consórcio de bactérias presentes no manguezal. Yu *et al.* (2005) reportaram que para um consórcio de bactérias presentes em amostras coletadas no manguezal de Ho Chung, em Hong Kong, apenas 33 % do pireno adicionado foi degradado durante 4 semanas; enquanto que em cultura enriquecida a biodegradação chegou a 98 %, indicando que a degradação de pireno foi fortemente aumentada pela adição de nutrientes.

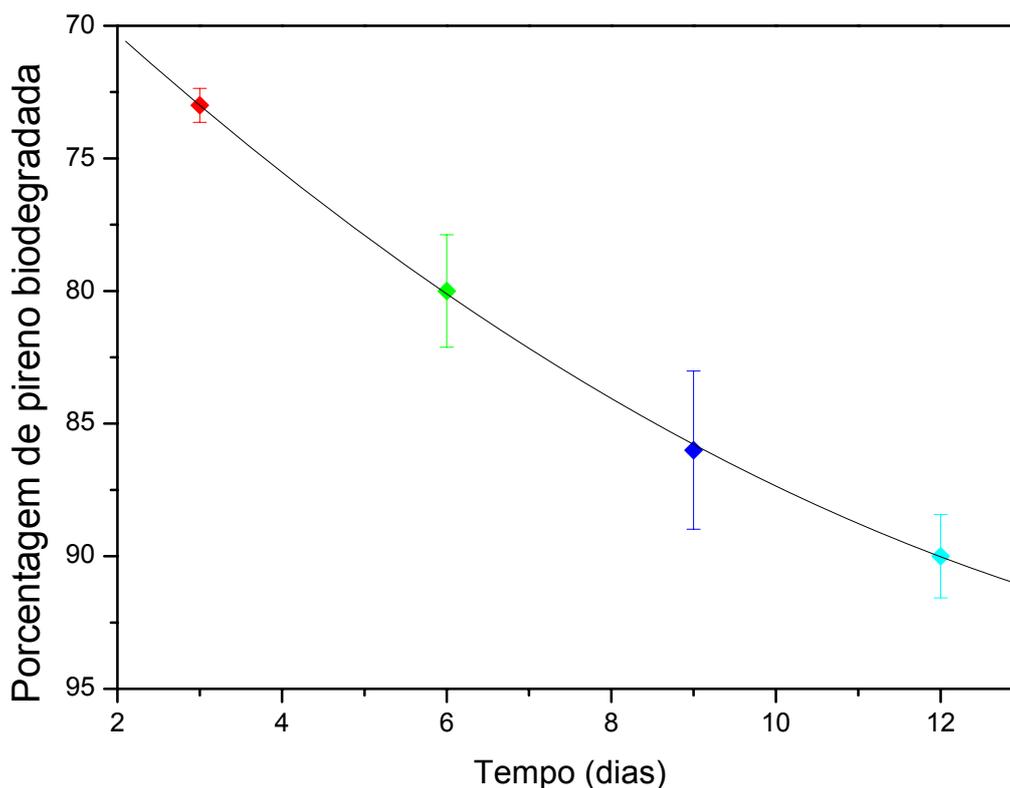


Figura 4.7. Porcentagem de pireno biodegradada, onde (♦) 72 h; (♦) 144 h; (♦) 216 h; (♦) 294 h.

A biodegradação do pireno tem sido documentada por inúmeros grupos, e alguns têm identificado metabólitos e proposto rotas (Cerniglia, 1992; Li *et al.*, 1996; Kanaly *et al.*, 2000; entre outros). As *Mycobacterium sp.* foram isoladas de sedimentos próximos a fontes de hidrocarbonetos e biodegradam pireno quando cultivadas em meio mineral complementado com nutrientes orgânicos. Este microorganismo vem sendo apontado como a principal espécie responsável pela biodegradação de HPA com quatro anéis (Cerniglia, 1992).

O pireno tem sido relatado na literatura como um indutor de culturas de *Mycobacterium* à mineralização (Heitkamp *et al.*, 1988). Observando o crescimento de culturas não induzidas pela adição de pireno nenhuma biodegradação deste pode ser detectada, concluindo que sistemas de enzimas induzidas aparecem como responsáveis pelo efeito de catálise do pireno.

Este efeito de catálise é observado na Tabela 4.3. Com o passar dos dias é possível observar o aumento da razão entre as concentrações de pireno que permaneceram não degradadas de uma medida para a medida posterior.

Tabela 4.3. Razão entre as concentrações de pireno remanescentes no sedimento

Tempo (horas)	72	144	216	294
[Py] remanescente ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$0,735 \pm 0,043$	$0,546 \pm 0,082$	$0,390 \pm 0,058$	$0,282 \pm 0,017$
Razões	[72h]/[144h]	[144]/[216]	[216]/[294]	
Razões entre as concentrações	1,34	1,40	1,39	

Na investigação dos metabólitos do pireno foram analisados os fragmentogramas para 72, 144, 216 e 294 horas. Porém, o principal metabólito, *cis*-4,5-dihidrodiolpireno não foi detectado. A não detecção do *cis*-4,5-dihidrodiolpireno deve-se provavelmente a sua decomposição térmica a pireno, pirenol e outros compostos no injetor do GC (280 °C) (Li *et al.*, 1996).

Para a análise do metabólito por GC-MS Li *et al.* sugerem a acetilação do *cis*-4,5-dihidrodiolpireno onde o pico m/z 320 é o diacetato do *cis*-4,5-dihidrodiolpireno (M^+) e os fragmentos característicos são: 260 (perda CH_3COOH do M^+), 218 (perda do $\text{CO}=\text{CO}^+$ do m/z 260) e 189 (perda do HCO^+ do m/z 218) confirmando assim, a presença do metabólito.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES

Na análise do sedimento os biomarcadores presentes nos locais estudados mostram tanto a influência aquática quanto terrestre. Os valores das razões C/N para as amostras de superfície foram próximos de 10 caracterizando matéria orgânica derivada de uma possível mistura de material húmico, fragmentos de plantas superiores e restos de algas.

A porcentagem de enxofre presente nos sedimentos foi elevada e o tratamento da amostra previamente à análise por GC-MS mostrou-se imprescindível para a análise dos hidrocarbonetos de menor concentração, uma vez que a identificação desses componentes é dificultada pelo aumento da linha base do cromatograma.

Apesar de toda a contaminação que tem ocorrido no Manguezal do Itacorubi, não foi encontrada contaminação por HPA na região analisada dentro do limite de detecção do método. Para melhor avaliação do nível de contaminação seria necessário um rastreamento com maior número de amostragens.

O método de separação em coluna de sílica/alumina se mostrou eficiente resultando em uma porcentagem de recuperação média de pireno de $61 \pm 8,7 \%$, ficando dentro da faixa permitida pela legislação.

Para a curva analítica resultados satisfatórios foram obtidos para GC-MS e novos testes devem ser feitos para o fluorímetro.

Nos efeitos de temperatura, pH e salinidade na biodegradação do pireno nenhuma correlação pôde ser feita, sendo que cada medida apresentou um valor dependente das características do meio de cultura atuante, observando-se uma maior velocidade de biodegradação a 40 °C e pH 8.

A 40 °C e pH 8 em apenas 12 dias 90 % de pireno foi degradado mostrando a eficiência do ambiente na biorremediação deste composto. A *Mycobacterium sp.* é apontada pela literatura como o principal microorganismo responsável pela degradação do pireno. O pireno tem efeito catalisador em culturas de *Mycobacterium sp.* sendo observado um aumento na taxa de biodegradação em culturas induzidas por pireno. Não foi possível observar os metabólitos resultantes da biodegradação do pireno provavelmente devido à decomposição térmica ocorrida no injetor durante a análise por GC-MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEK, S. O.; FIELD, R. A.; GOLDSTONE, M.E.; et al. "Review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons, fate and behavior" **Water Air Soil Pollution**, 60, pp. 279 – 300, 1991.

BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; MICHON, Q.; et al. "Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean sea from mussel and sediment records" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 47, pp. 77-90, 1998.

BROWN, A. B.; WEISS, T. F. "Fate and Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons in the aquatic environment" **Environmental Affairs Department**, Publication nº 4297, American Petroleum Institute, 1978.

BURNS, K. A.; GARRITY, S. D.; LEVINGS, S. C. "How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills?" **Marine Pollution Bulletin**, 26, pp. 249-257, 1993.

CERNIGLIA, C. E. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons" **Biodegradation**, 3, pp. 351-368, 1992.

CETESB, Disponível em: <
http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_toxicologicos.a_sp> Acesso em 27 de dez. 2005.

CHANG, B.V.; SHIUNG, S.Y.; YUAN, S.Y. "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil" **Chemosphere**, 48, pp. 717-724, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. "**Introdução a métodos cromatográficos.**" Editora da UNICAMP, 5ª edição, p. 279, 1993.

EDWARDS, N. T. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment: a review." **Journal of Environmental Quality**, 12, pp. 427-441, 1983.

ESTEVEES, F. A. "Fundamentos de Limnologia" **Interciência – FINEP**, Rio de Janeiro, p. 545, 1988.

FERNANDES, M. "Atenuação natural de Aqüífero contaminado por derramamentos de gasolina" Exame de Qualificação para defesa de Tese de Doutorado-Departamento de Pós-Graduação em Química, UFSC, pp.12-17, 2000.

FLORES-VERDUGO F.J.; GONZÁLEZ-FARÍAS, F.; BLANCO-CORREA, M.; et al. "The Teacapán-Agua Brava-Marismas Nacionales mangrove ecosystem (Pacific coast of Mexico): an ecological and anthropogenic activities profile" En: L.C. Lacerda, E.S. Diop y B. Kjerfve (eds.). Conservation and sustainable utilization of Mangrove forest in Latin America and Africa regions: case studies. UNESCO e ISME (International Society of mangrove ecosystems), pp. 35-46, 1997.

GROSSER, R. J.; FRIEDRICH, M.; WARD, D.M.; et al. "Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates" **Applied and Environmental Microbiology**, 66, pp. 2695-2702, 2000.

GUNDLACH, E. R. & HAYES M. O. "Classification of coastal environments in terms of potential vulnerability to oil spill impact" **Marine Technology Society Journal**, 12, pp. 18-27, 1978.

HANSEL, F. A. "Análise de biomarcadores lipídicos em sedimentos de manguezais" **Dissertação de mestrado em Química, Departamento de Química – UFSC**, 2000.

HEITKAMP, M. A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C. E. "Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium" **Applied and Environmental Microbiology**, 54, pp. 2549-2555, 1988.

JOHNS, R.B. "Biological markers in the sedimentary record" **Methods in Geochemistry and Geophysics**, Elsevier Publishers B. V., pp. 43-99, 1986.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria" **Journal of Bacteriology**, 182, 8, pp. 2059-2067, 2000.

KE, L.; WONG, T.W.Y.; TAM, N. F. Y. "Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill" **Marine Pollution Bulletin**, 45, pp. 339-347, 2002.

KE, L.; WANG, W.Q.; WONG, T. W. Y.; et al. "Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms" **Chemosphere**, 51, pp. 25-34, 2003.

KENNISH, M. J. "Environmental threats and environmental future of estuaries" **Environmental Conservation**, 29(1), pp. 78-107, 2002.

KUBICKI, J.D.; APITZ S.E. "Models of natural organic matter and interactions with organic contaminants" **Organic Geochemistry**, 30, pp. 911-927, 1999.

LEE, L.S.; HAGWALL, M.; DELFINO, J.J.; et al. "Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbon from diesel fuel into water" **Environmental Science and Technology**, 26, pp. 2104-2109, 1992.

LI, X.; CULLEN, W. R.; REIMER, K.J.; et al. "Degradation of pyrene and characterization of a metabolite" **The Science of the Total Environment**, 177, pp. 17-29, 1996.

LIU, k. et al. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from coal fired pilot FBC system" **Journal of Hazardous Materials**, 84, pp. 175-188, 2001.

MARCHAND, C.; LALLIER-VERGÈS, E.; BALTZER, F. "The composition of sedimentary organic matter in relation to the dynamic features of a mangrove-fringed coast in French Guiana" **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 56, pp. 119-130, 2003.

MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL, F. A.; *et al.* "Assessment of lipid compounds and phosphorus in mangrove sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil" **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15, 5, pp. 725-734, 2004.

NETO, R. R.; MADUREIRA, L. A. S. "Caracterização de biomarcadores nos sedimentos da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, SC" **Acta Limnology Brasilienses**, 12, pp. 113-125, 2000.

NOAA, TECHNICAL MEMORANDUM NOS ORCA 71. "**Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program National Benthic Surveillance and Mussel Watch Project 1984 - 1992.**" Silver Spring, Maryland, V. 4, p 179, 1993.

OLINTO, A. (coord.) "O ecossistema manguezal" **Gerenciamento Costeiro de Pernambuco, GERCO**, Pernambuco, 2003. Disponível em: < <http://vivimarc.sites.uol.com.br/manguezal2.htm>>, Acesso em: 28 de dez. 2005.

OLIVEIRA, C. P. L. & PANITZ, C. M. N. “**Evolutionary aspects of Itacorubi Mangrove identified with photo interpretation and field surveys.**”, IPUF, 2003.

PETROBRAS, Disponível em: < <http://www2.petrobras.com.br/portugues/index.asp> >, Acesso em: 17 de jan. 2006.

QIAO, M.; Wang, C.; Huang, S.; et al. “Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China” **Environment International**, 2005.

RAYMOND, J. W.; ROGERS, T. N.; SHONNARD, D. R.; et al. “A review of structure-based biodegradation estimation methods” **Journal of Hazardous Materials**, B84, pp. 189-215, 2001.

READMAN, J. W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; et al. “Petroleum and PAH contamination of the Black Sea” **Marine Pollution Bulletin**, 44, pp. 48-62, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; et al. “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos” **Química Nova**, 27, pp. 771-780, 2004.

SALVO, V.S.; GALLIZIA, I.; MORENO, M.; *et al.* “Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy)” **Marine Pollution Bulletin**, 50, pp. 553–559, 2005.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. “Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation” **Trends in Biotechnology**, 20, pp. 243-248, 2002.

SCOLFIELD, A. L.; GABARDO, I. T.; MENICONI, M. F. G. “Hidrocarbonetos no meio ambiente” Rio de Janeiro, Curso ministrado pelo CENPES/PETROBRÁS, Set. 2002.

SORIANO - SIERRA “Estrutura do mosaico ambiental no manguezal de Itacorubi (Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil)” **Ecologia e gerenciamento do manguezal de Itacorubi**. Editado por Eduardo Soriano - Sierra e Blanca Sierra de Ledo, 3, p 47 – 78, 1998.

SORIANO – SIERRA, E. J.; MACENO-SILVA, J. R. B.; DERNER, R. B.; et al. “Aspectos ecológicos do Manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, Brasil” **Ecologia e gerenciamento do manguezal de Itacorubi**. Editado por Eduardo Soriano - Sierra e Blanca Sierra de Ledo, 6, pp. 115-138, 1998.

SOUZA-SIERRA, M. M.; GIOVANELA M.; VIEIRA, S. M., “Composição elementar e propriedades espectroscópicas de compostos húmicos do Manguezal de Itacorubi, Ilha de Santa Catarina”, **Ecologia e gerenciamento do manguezal de Itacorubi**. Editado por Eduardo Soriano - Sierra e Blanca Sierra de Ledo, 4, pp. 79-102, 1998.

TAM, N. F. Y.; KE, L.; WAN, X. H.; et al. “Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps” **Environmental Pollution**, 114, pp. 255-263, 2001.

TAM , N.F.Y.; GUO, C.L.; YAU, W.Y.; et al. “Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong” **Marine Pollution Bulletin**, 45, pp. 316–324, 2002.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y.S.; et al. “Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments” **Environmental International**, 31, pp. 149-154, 2005.

YUAN, S.Y.; CHANG, J.S.; YEN, J.H.; *et al.* “Biodegradation of phenanthrene in river sediment” **Chemosphere**, 43, pp. 273-278, 2001.

WANG, Z.; FINGAS, M.; BLENKINSOPP, S.; et al. “Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils” **Journal of Chromatograph A**, 809, pp. 89-107, 1998.

WANG, S.F.; LIU, B.Z.; SUN, K. J.; et al.”Gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during the pyrolysis of phenylalanine” **Journal of Chromatograph A**, 1025, pp. 255-261, 2004.

ZWIRTES, I. R. “Uso da geocronologia e da distribuição de lipídios e fósforo na reconstituição histórica dos sedimentos da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC” **Dissertação de mestrado em Química, Departamento de Química – UFSC**, 2003.