

FABRICIO AUGUSTO HANSEL

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM SEDIMENTOS DE  
MANGUEZAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
a obtenção do grau de Mestre.

Curso do Pós - Graduação em Química,

Departamento de Química,

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Dr. Luiz Augustos dos Santos Madureira

FLORIANÓPOLIS

2000

FABRICIO AUGUSTO HANSEL

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM SEDIMENTOS DE  
MANGUEZAIS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no  
Curso de Pós - Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela  
comissão formada pelos professores:

Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira  
**Orientador**

Dr. Valdir Soldi  
**Coordenador**

**Banca examinadora:**

Dr. Roldão R. U. Queiroz

Dr. Claudemir Radetski

Dra. Maria Marta de Souza Sierra

Florianópolis, 29 julho de 2000.

O mundo moderno apresenta-se, superficialmente, como aquele que impeliu, que tende a impelir a racionalização ao seu extremo e que, por isso, permite-se desprezar - ou olhar com uma curiosidade respeitosa - os estranhos costumes, invenções e representações imaginárias das sociedades precedentes. Mas, paradoxalmente, apesar de, ou melhor, por causa desta “racionalização extrema”, a vida do mundo moderno depende do imaginário tanto como qualquer das culturas arcaicas ou históricas.

Cornelius Castoriadis

***Dedico este***

***trabalho aos meus pais.***

## AGRADECIMENTOS

- Ao NEMAR - UFSC, pelas amostras dos manguezais do Itacorubi e do Rio Ratoles (Ilha de Santa Catarina).
- À Profa. Dra. Therezinha Novais (UNIVILLE), pelas amostras da Baía de Babitonga (Joinville).
- À todo o pessoal do laboratório 216 (grupo de química ambiental e geoquímica orgânica) e vizinhança, pela força, criatividade e idéias.
- À central de Análises e CNPq, pelo apoio técnico e financeiro.
- Ao Prof. Dr. L. A. S. Madureira, OBRIGADO.
- Aos meus pais, Ruy e Maria Ivone, pelo incentivo.
- À Gisele, pelas "figurinhas".
- E claro, um obrigado especial àqueles de sempre; minha companheira e minha filha (Sinara e Aruna).

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	9
<b>ABREVIACÕES</b> .....	10
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<i>1.1 Manguezais</i> .....	14
<i>1.2 Regiões de estudo</i> .....	16
<i>i) Manguezal do Rio Ratonos</i> .....	16
<i>ii) Manguezal de Itacorubi</i> .....	17
<i>iii) A Baía de Babitonga</i> .....	19
<i>1.3 Matéria Orgânica</i> .....	21
<i>1.4 Composição química da matéria biogênica</i> .....	23
<i>1.5 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos</i> .....	27
<i>1.6 Lipídios como biomarcadores</i> .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	31
<i>2.1 Objetivos Gerais</i> .....	31
<i>2.2 Objetivos Específicos</i> .....	31
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	34
<i>4.1 Solventes, adsorventes e padrões</i> .....	34
<i>4.2 Limpeza da vidraria</i> .....	35

<i>4.3 Coleta das amostras</i> .....	36
<i>4.3.1 Mangues de Itacorubi e do Rio Ratonas</i> .....	36
<i>4.3.2 Baía de Babitonga</i> .....	36
<i>4.4 Extração dos lipídios totais</i> .....	37
<i>4.5 Extração e fracionamento da amostra</i> .....	39
<i>4.5.1 Extração</i> .....	39
<i>4.5.2 Confeção da micro coluna cromatográfica de vidro</i> .....	39
<i>4.5.3 Fracionamento da amostra</i> .....	40
<i>4.6 Preparo das fortificações com padrões</i> .....	42
<i>4.6.1 Micro coluna cromatográfica de vidro</i> .....	42
<i>4.6.2 Testes de extração (E), liofilização com extração (LE) e liofilização com extração seguida de fracionamento (LEF)</i> .....	42
<i>4.7 Parâmetros cromatográficos</i> .....	43
<i>4.8 Equipamentos utilizados</i> .....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	45
<i>5.1 Micro coluna cromatográfica de vidro: um estudo do comportamento dos padrões de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos</i> .....	32
<i>5.1.1 Diagrama de eluição dos padrões e de um óleo diesel comercial</i> .....	46
<i>5.1.2 Cálculo do Fator Reposta (FR) entre os padrões utilizados</i> .....	50
<i>5.1.3 Aspectos quantitativos da micro coluna cromatográfica de vidro</i> .....	51
<i>5.2 Avaliação do método descrito na seção 4.5 (extração e fracionamento da amostra, uma modificação e otimização de métodos citados na literatura)</i> .....	52
<i>5.3 Lipídios</i> .....	55

<i>5.3.1 Comparação entre os biomarcadores de cadeia linear identificados nos sedimentos, a partir de seus extratos totais</i> .....	55
<i>5.3.2 Outros Biomarcadores identificados nos sedimentos</i> .....	58
<i>5.3.3 Fracionamento dos lipídios, amostra BL (Lagoa do Saguçu)</i> .....	61
<i>i) Fração F1</i> .....	61
<i>ii) Fração F2</i> .....	64
<i>iii) Fração F3</i> .....	68
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>APÊNDICE - FIGURAS</b> .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1 - Manguezal do Rio Ratonos.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 1.2 - Manguezal do Itacorubi.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 1.3 - Baía da Babitonga.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 1.4 - Equação simplificada da fotossíntese.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 1.5 - Importantes eventos supostamente ocorridos na história da Terra.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 1.6 - Biossíntese dos ácidos graxos saturados de plantas e animais.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5.1 - Diagrama de eluição dos padrões estudados: heneicosano, pentacosano, naftaleno, pireno e criseno.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 5.2 - Cromatograma do óleo diesel, fração F1 contendo os hidrocarbonetos alifáticos (HAs).....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5.3 - Cromatograma do óleo diesel, fração F2 contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 5.4 - Cromatograma da amostra proveniente do manguezal de Itacorubi..</b>	<b>59</b>
<b>Figura 5.5 - Cromatograma da Fração F1, amostra BL.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 5.6 - Distribuição dos triterpenos (fragmento, mz = 191) na amostra BL....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 5.7 - Figura 5.7 - Fragmentogramas com os homólogos alquilados do NAF e FEN, encontrados na amostra BL.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 5.8 - Fragmentogramas com os homólogos alquilados do FLU e DBT, encontrados na amostra BL.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 5.9 - Ampliação do cromatograma da Fração F3, amostra BL.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 4.1 - Relação dos reagentes, padrões e absorventes utilizados.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 4.2 - Dados experimentais referentes a micro coluna cromatográfica.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 4.3 - Parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação do método 4.5...</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4.4 - Parâmetros cromatográficos utilizados para as análises dos sedimentos.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 5.1 - Fator Resposta (FR) determinado pelo método da padronização interna.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 5.2 - Resultados quantitativos da micro coluna.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 5.3 - Resultados das fortificações do processo de avaliação por etapas: E, LE e LEF.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 5.4 - Índices Preferenciais de Carbono (IPC) para ácidos carboxílicos (AC), álcoois lineares (OH) e hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e razão Terrestre Aquático (RTA) para os ácidos carboxílicos.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 5.5 - Biomarcadores do tipo hopanóide identificados na fração F1, Baía da Babitonga, Lagoa do Saguaçu (BL).....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 5.6 - Esteróis identificados na fração F3, amostra baía da Babitonga, Lagoa do Saguaçu (BL).....</b>	<b>70</b>

## ABREVIACOES

- AC** > Ácido carboxílico.
- AC-A** > Ácido carboxílico - anteiso.
- AC-D** > Ácido dicarboxílico.
- AC-I** > Ácido carboxílico - iso.
- AC-R** > Ácido carboxílico ramificado.
- Al** > Aldeído.
- BF** > Baía da Babitonga ponto de coleta dentro da baía.
- BL** > Baía da Babitonga, ponto de coleta Lagoa do Saguau.
- C<sub>21</sub>** > Heneicosano.
- C<sub>23</sub>** > Tricosano.
- C<sub>25</sub>** > Pentacosano.
- CRI** > Criseno.
- DBT** > Dibenzotiofeno.
- DCM** > Diclorometano.
- E** > Processo envolvendo a etapa extração.
- E(?)** > Esterol.
- FEN** > Fenantreno.
- FLU** > Fluoreno.
- CG** > Cromatografia gasosa.
- CG - EM** > Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas.
- HA** > Hidrocarboneto Alifático.
- Hi** > Hidrocarboneto insaturado.

- HPA** > Hidrocarboneto policíclico aromático.
- I** > Itacorubi.
- IPC** > Índices Preferenciais de Carbono.
- LE** > Processo envolvendo as etapas de liofilização com extração.
- LEF** > Processo envolvendo as etapas de liofilização com extração seguida de fracionamento.
- MeOH** > Metanol.
- NAF** > Naftaleno.
- OH** > Álcool saturado.
- OHAC** > Hidroxiácido.
- OHR** > Álcool ramificado.
- PI** > Padrão interno.
- PIR** > Pireno.
- RC** > Manguezal do Rio Ratonos, ponto de coleta perto da costa marítima.
- RI** > Manguezal do Rio Ratonos, ponto de coleta interior.
- RTA** > Razão terrestre aquático.
- RSD** > Desvio padrão relativo, do inglês “relative standard deviation”.
- UCM** > Do inglês “unresolved complex mixture”.

**s** ⇒ quando ao lado de algum símbolo indica a pluralidade do mesmo.

**números** ⇒ estes indicam a quantidade de átomos de carbono em um determinado composto, quando da exceção esta é comentada no texto.

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivos a análise qualitativa dos lipídios totais e a otimização de um método de fracionamento adaptado da literatura para análise desses na matéria orgânica provinda de sedimentos de manguezais. Os sedimentos são oriundos de três diferentes manguezais do Estado de Santa Catarina, dois localizados na Ilha de Santa Catarina (manguezais de Itacorubi e do Rio Ratonés), e outro na região do município de Joinville, especificamente na baía de Babitonga. Nos sedimentos provindos dos manguezais da Ilha de Santa Catarina efetuou-se a análise dos lipídios totais, enquanto que em uma das amostras da baía de Babitonga (Lagoa do Saguáçu) aplicou-se o método proposto, com fracionamento. Através do uso de índices desenvolvidos para biomarcadores orgânicos como os Índices Preferenciais de Carbono (ICP) e a razão entre compostos de origem terrestre e aquática (RTA) procurou-se avaliar a origem da matéria orgânica encontrada nestes locais. Os ICPs aplicados para os ácidos carboxílicos variam entre 5,2 e 8,0 para os manguezais do Itacorubi e do Rio Ratonés, indicando a presença de material de origem terrestre. Enquanto que o valor do IPC para os hidrocarbonetos encontrados na Lagoa do Saguáçu foi de 2,8, o qual incita uma contaminação por combustível fóssil, fato este comprovado com a identificação dos biomarcadores do tipo hopanóides e policíclicos aromáticos nessa amostra. Os valores de RTA para os ácidos mostrou a presença de matéria orgânica de origem aquática em todos os locais estudados. A contaminação por combustível fóssil não foi evidenciada para os demais locais estudados (manguezal de Itacorubi e do Rio Ratonés), e, onde a poluição por efluentes não pôde ser confirmada.

## ABSTRACT

The present work aimed to optimise a convenient and simple method of fractionation adapted from the literature to analyse the total lipid extracts of mangrove superficial sediments. The sediments were collected in three different mangroves, two of them located at Santa Catarina Island (Itacorubi and Rio Ratonés) and the third one at Saguau Lake, in Babitonga Bay district of Joinville. Samples from both Itacorubi and Rio Ratonés were extracted and analysed by GC and GC-MS without further fractionation. The sample from Babitonga Bay was extracted and submitted to the method of fractionation. Several organic compounds, named biomarkers, were identified. Indices usually employed as proxies for terrestrial and aquatic inputs such as Carbon Preference Index (CPI) and Terrestrial Aquatic Ratio (TAR) were employed. The CPI values estimated for fatty acids and hydrocarbons from Itacorubi and Rio Ratonés sediments ranged from 5.2 to 8.0, indicating that such compounds are mainly derived of terrestrial input. However, the CPI value of hydrocarbons for Saguau lake was 2.8, which is an indicative of oil contamination. This hypothesis was confirmed by the identification of characteristic non aromatic hydrocarbons derived from oil which were detected in the same fraction of the aliphatic hydrocarbons and also due to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons identified in a more polar fraction. The TAR values estimated for the three regions showed strong predominance of aquatic over terrestrial compounds. In contrast with the Saguau Lake, the results seen here did not show any strong evidence of pollution by fossil fuels for Rio Ratonés and Itacorubi mangroves, though sewage contamination cannot be ruled out.

## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1 Manguezais*

Os manguezais ocupam aproximadamente três quartos das áreas costeiras localizadas entre 25 °N e 25 °S, onde na costa leste da América do Sul, África, Austrália e Nova Zelândia estes estendem-se 10 - 15° mais ao Sul, e no Japão 7° mais ao Norte (Kuenzler, 1974). Totalizando uma área aproximadamente igual a 170.000 km<sup>2</sup>, onde encontram-se cerca de 60 espécies endêmicas de árvores e arbustos.

No continente americano, os manguezais apresentam-se ao longo da costa do Oceano Atlântico entre as latitudes 32°20', Flórida, EUA, e 28°30', Laguna, Brasil (Lacerda, 1993). Na América Latina estas florestas ocupam entre 40.000 km<sup>2</sup> e 60.000 km<sup>2</sup> (Lacerda & Schaeffer - Noveli, 1992).

No Brasil a área geográfica ocupada por mangues é estimada em aproximadamente 14.000 km<sup>2</sup> (Kjerfve & Lacerda, 1993), todavia esta estimativa pode estar reduzida devido aos constantes desmatamentos sofrido nos mangues. Na costa de Santa Catarina, de 25°57'26"S até 29°20'32" S, são 175 km de manguezais, abrangendo 20 % da costa litorânea catarinense (Sierra de Ledo & Soriano - Sierra, 1985), sendo o Estado, o limite austral desses ecossistemas.

Os manguezais foram definidos em 1903 por Shimper como uma formação de plantas baixas que ocorrem dentro da faixa que abrange a maré alta. O fato é que as espécies existentes num manguezal ocorrem somente na zona intertidal, onde apresenta-se a influência da maré - baixa e preamar (Lugo & Snedaker, 1974). Os manguezais são geograficamente definidos em três tipos básicos: franja, ribeirão e bacia (Cintrón & Shaeffer - Noveli, 1983).

Os manguezais possuem alta importância ecológica, isto devido a sua produtividade animal e vegetal. Esses ecossistemas costeiros são extremamente importantes para sobrevivência de muitas espécies nativas assim como espécies xenobióticas. A alta produtividade de matéria orgânica nestas áreas funciona como uma fertilização das regiões costeiras, fazendo com que estas áreas atuem como um importante produtor de peixes, além de possuir um papel essencial na produção de nutrientes para os mais diversos organismos marinhos. Os manguezais são importantes também na proteção das regiões costeiras, pois estes formam uma barreira impedindo a erosão, fornecem habitat para as mais variadas vidas selvagens (pássaros, crustáceos, etc), constituem um excelente filtro biológico para águas provenientes dos mais diversos meios e é um importante produtor de energia para ambientes adjacentes assim como uma viável fonte econômica para as populações ribeirinhas (Flores - Verdugo *et al*, 1997 e suas ref.).

Áreas costeiras como baías e manguezais são classificadas como um dos ambientes críticos para acidentes envolvendo derramamento de óleo (Gundlach & Hayes, 1978), 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 (Lamparelli *et al*, 1997). A localização dos manguezais é estrategicamente propícia à contaminação tanto terrestre como marítima, pois esses estão localizados em regiões costeiras e estuarinas, onde recebem uma enorme quantidade de água por diversas vias. Os manguezais podem, portanto, receber poluentes orgânicos, como HPAs e organoclorados, e metálicos provindo do continente através dos rios e lagoas e marinhos através das correntes marítimas e das variações da maré.

Os manguezais são, portanto grandes receptores de diversos compostos de origem antropogênica e natural, e um dos locais de grande interesse científico, pois acima tudo estes ambientes são considerados como berçário para diversas espécies da fauna e da flora, fundamental para a sobrevivência dos sistemas adjacentes.

## ***1.2 Regiões de estudo***

### ***i) Manguezal do Rio Ratonés***

O manguezal do Rio Ratonés localiza-se à noroeste da Ilha de Santa Catarina, fazendo parte da Estação Ecológica dos Carijós (latitude 27°29" S e longitude 48°30" O), banhado pelas águas da Baía Norte da Ilha de Santa Catarina (Figura 1.1). Este manguezal abrange uma área total de 6,25 km<sup>2</sup>, situado na bacia do Rio Ratonés, entre os morros da Barra do Sambaqui, morros da dorsal do Norte da Ilha, Morro de Jurerê - Canasvieiras e Morro do Forte, com seus 183, 117, 395, 148 metros de altitude máxima, respectivamente. O manguezal estende-se até as proximidades das localidades de Vargem Pequena e dos Ratonés, até esse ponto pode-se verificar os efeitos das mudanças das marés. Este manguezal é recortado pelas seguintes autovias: SC - 401 que liga o centro de Florianópolis às praias do Norte da Ilha e a SC - 402 que liga a SC - 401 às praias de Jurerê e Daniela (Silva, 1990).

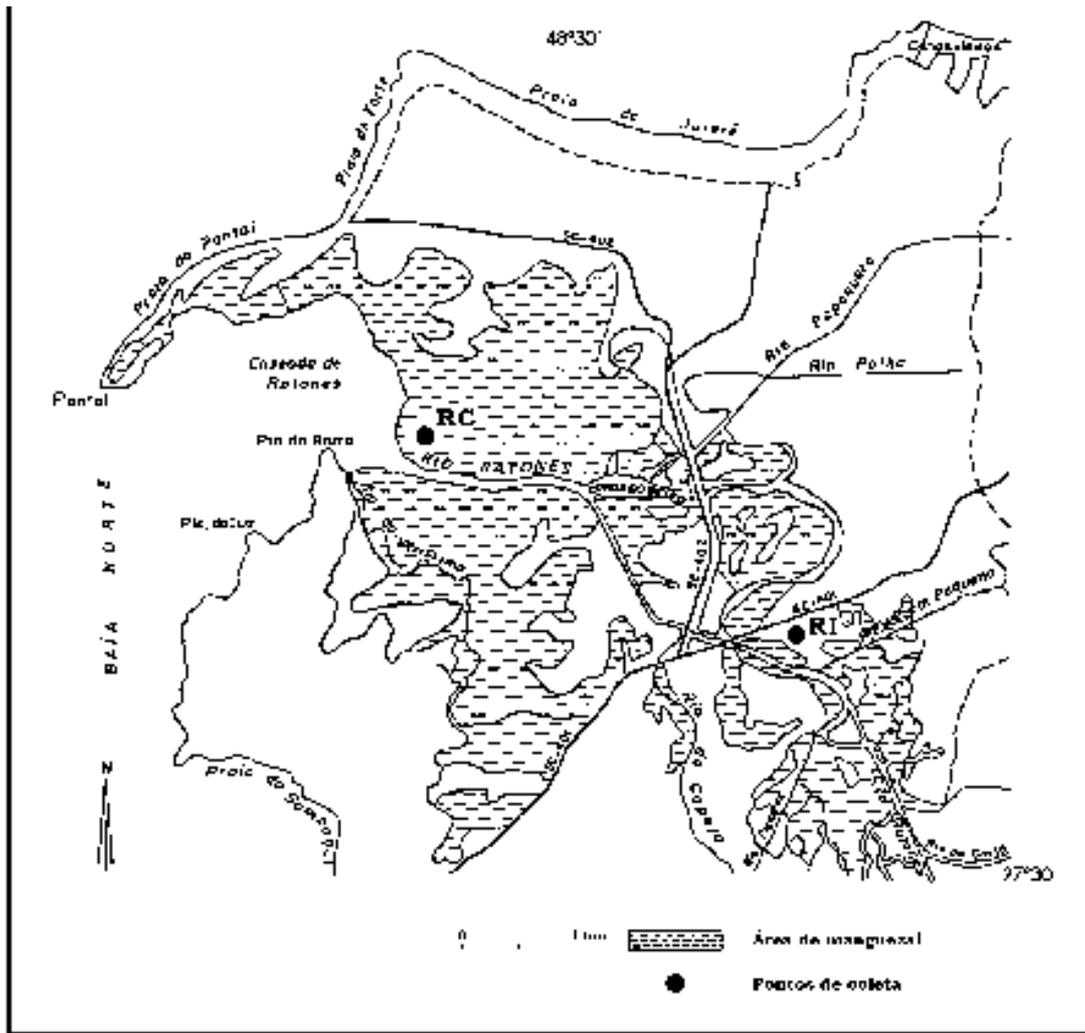


Figura 1.1 - Manguezal do Rio Ratonés. Os pontos de coletas estão demarcados como RC - Ratonés Costa e RI - Ratonés Interior.

## ii) Manguezal de Itacorubi

O manguezal de Itacorubi localiza-se na Ilha de Santa Catarina, banhada pelas águas da Baía Norte, entre as coordenadas  $27^{\circ}34'14''$ - $27^{\circ}35'31''$  LS e  $48^{\circ}30'07''$ - $48^{\circ}31'33''$  LO (Soriano - Sierra, 1998), possuindo uma área de  $1,42 \text{ km}^2$  (Figura 1.2). O manguezal é recortado por dois cursos d'água, o rio Itacorubi e seu afluente o rio Sertão, hoje em dia altamente desconfigurados devido a aterros e canais. O bosque do mangue está circundado por bairros da grande Florianópolis e atravessado pela rodovia

SC - 401 que liga a rodovia Baía Norte às praias do Norte da Ilha de Santa Catarina, e cortado por vários canais do DNOS (Departamento Nacional de Obras e Saneamento). Este manguezal ainda apresenta outra peculiaridade: desde 1978, e até 1987, recebeu diariamente cerca de 249 toneladas de lixo doméstico para a formação de um aterro sanitário sobre sua parte nordeste (Soriano - Sierra *et al*, 1998).

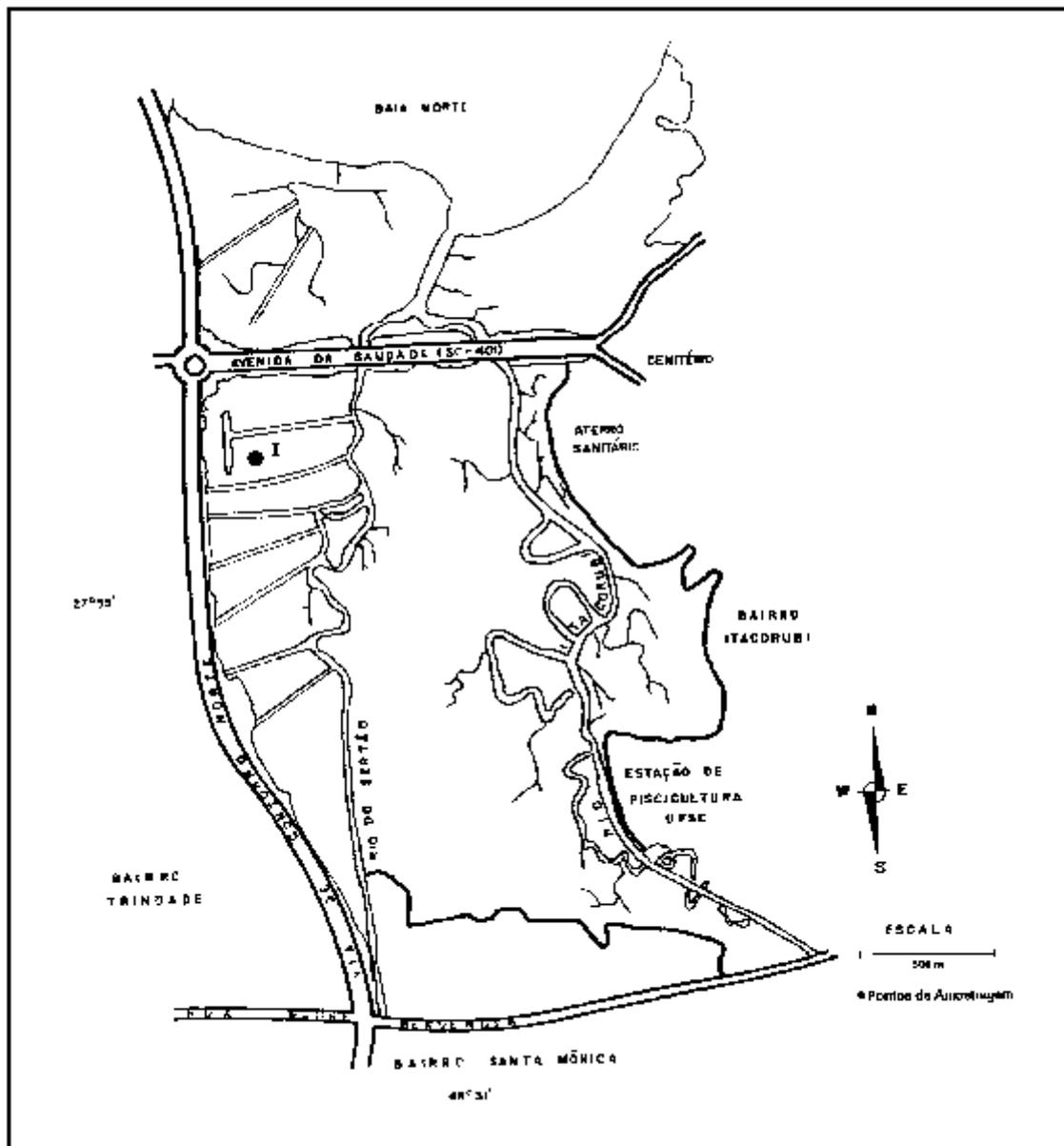


Figura 1.2 - Manguezal do Itacorubi. Ponto de coleta assinalado como I.

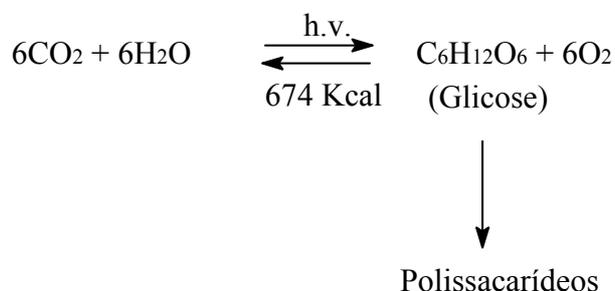
### ***iii) A Baía de Babitonga***

A Baía de Babitonga está situada ao norte do litoral catarinense, entre as coordenadas geográficas de 26°02'-26°28' S e 48°28'-48°50' O, e apresenta uma superfície de 130 km<sup>2</sup> com cerca de 43 km<sup>2</sup> de manguezais (80% da área total dos manguezais do estado de Santa Catarina). A oeste, a Baía de Babitonga limita-se na porção setentrional pela unidade geomorfológica da Serra do Mar e, a leste, a ilha de São Francisco subdivide o complexo em dois setores: a baía da Babitonga propriamente dita e o canal do Linguado (IBAMA, 1998; Souza, 1991) (Figura 1.3). Neste contexto ambiental se verifica uma intensa ação antrópica, provocado principalmente pelo município de Joinville, principal pólo industrial e urbano de Santa Catarina, além de outros como São Francisco, onde a existência de um porto e um terminal petrolífero contribuem concomitantemente com a cidade de Joinville para a degradação deste ambiente. A lagoa do Saguáçu, em processo de colmatação, é uma das regiões mais atingidas pela poluição provinda da cidade de Joinville, onde diariamente são despejadas grandes cargas poluentes e tóxicas originadas dos esgotos urbanos e industriais (Souza, 1991).



### 1.3 Matéria Orgânica

A matéria orgânica é primeiramente sintetizada por organismos vivos e somente após isto é depositada nos sedimentos. A fotossíntese é a base da produção da matéria orgânica, a qual consiste basicamente na transferência do hidrogênio da água para o dióxido de carbono produzindo matéria orgânica na forma de glicose e oxigênio, transformando assim energia luminosa em energia química. Através de um dos produtos desta reação, a glicose, os organismos autotróficos podem sintetizar vários polissacarídeos como a celulose e o amido (Figura 1.4).



**Figura 1.4 - Equação simplificada da fotossíntese. Glicose relativamente rica em energia é formada pelas plantas verdes com ajuda da luz solar.**

No resumo geológico mostrado na Figura 1.5, pode-se observar as interferências sofridas no ciclo do carbono orgânico ao longo das eras geológicas com a introdução de novas espécies. Percebe-se no diagrama que a distribuição da fotossíntese pelo mundo aconteceu no período Pré - cambriano, em torno de 2 bilhões de anos atrás, realizada pelos organismos autotróficos, provavelmente algas verdes - azuis. A difusão da fotossíntese pelo mundo teve como causa a difusão do fitoplâncton (produtores primários, ex: cianofícias), um dos principais fornecedores da matéria orgânica sedimentar. O zooplâncton (foraminíferas e alguns crustáceos), primeiros fósseis datados do início da era Paleozóica, é outro importante grupo contribuinte para matéria orgânica sedimentar, sendo também responsável pelo consumo dos produtores

primários. As bactérias constituem outro importante grupo produtor de matéria orgânica, atuando principalmente como decompositoras em seus ambientes (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993).

Tempo em milhões de anos	Era Geológica		Eventos importantes durante a história da terra
500	Cenozóica		Mamíferos
	Mesozóica		Plantas vasculares
	Paleozóica		Vertebrados
1000	fim	Pré cambriano	Metazoários
1500			Fotossíntese
2000	meio		Bactérias e algas primitivas
2500			Evolução química abiológica
3000	Começo	Grandes quantidades de água na superfície da Terra	
3500		Origem da Terra	
4000			
4500			
5000			

↑ Aumento do oxigênio na atmosfera

↓ Atmosfera reduzida

**Figura 1.5 - Importantes eventos supostamente ocorridos na história da Terra. A produção da matéria orgânica não precede 2 bilhões de anos, época esta em que a fotossíntese não estava disseminada ao longo da superfície terrestre.**

O último grupo de organismos fotossintéticos são as plantas vasculares, comumente chamadas de plantas superiores (pteridófitas, gimnosperma e angiosperma). Estas plantas terrestres originaram-se provavelmente das algas, e possuem como característica marcante o desenvolvimento de uma estrutura de suporte, um tecido de proteção contra a desidratação. As plantas superiores são importantes contribuintes para a matéria orgânica sedimentar de locais terrestres ou próximos a estes, assim como os fitoplânctons são para as águas marinhas e doces (Killops & Killops, 1993).

Existe, portanto, quatro principais fontes da matéria orgânica sedimentar. São elas em ordem de importância: fitoplânctons, bactérias, plantas superiores e zooplânctons. Além desses podemos considerar a existência do reino fungi, mas a sua importância é mais visível em ambientes terrestres, pois em ambientes aquáticos a degradação é feita principalmente pelas bactérias (Killops & Killops, 1993).

#### ***1.4 Composição química da matéria biogênica***

Considerando a formação da matéria orgânica como proveniente das quatro principais fontes acima citadas, tem-se no meio ambiente a associação desses vários grupos de organismos produzindo uma variada composição química e, portanto, determinando o tipo de matéria orgânica que será depositada e incorporada ao sedimento. Todos esses organismos são constituídos basicamente das mesmas classes de compostos químicos, sendo os mais importantes geoquimicamente os carboidratos, proteínas e lipídios (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993).

Os carboidratos funcionam como armazenamento de alimento, material estrutural e antidessecante. A celulose, estrutura básica celular de muitas plantas, é uma das principais fontes de energia, armazenando em sua estrutura 10.000 unidades de glicose, sendo a celulose o composto orgânico natural mais abundante na natureza, encontrado em grandes quantidades nas plantas superiores e algumas algas. Como fonte de energia a D-glicose ainda pode ser armazenada na forma dos seguintes polissacarídeos: amido (plantas) e glicogênio (animais). Encontram-se também outras formas de açúcares na composição estrutural dos seres vivos, como a D - frutose e outros polissarídeos como a quitina e a mureína) (Killops & Killops, 1993).

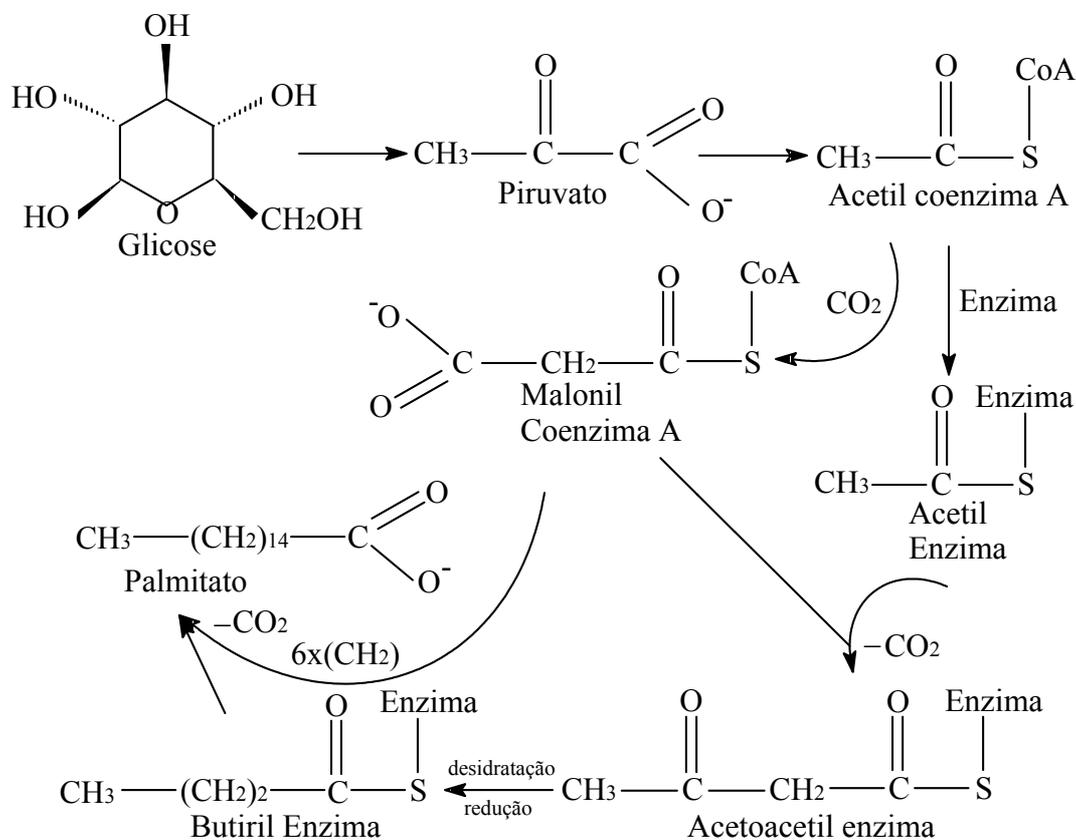
As proteínas são largamente encontradas nos organismos, suas cadeias polipeptídicas são compostas por estruturas regulares repetidas formando fibras. Estas fibras servem como suporte para tecidos animais, por exemplo nas peles e ossos (colágeno), casco e garras (queratina). Existem também algumas proteínas com importantes funções enzimáticas (catálise), hormonal (metabolismo), transportadora (respiração) (Killops & Killops, 1993).

Os lipídios podem ser definidos como todas as substâncias produzidas pelos organismos que são insolúveis em água, mas podem ser extraídas por solventes que dissolvem gorduras (Bergmann, 1963). Os lipídios são encontrados tanto em animais quanto em vegetais; nos animais em forma de gordura e nos vegetais em forma de óleos e ceras. As gorduras são utilizadas como fonte de energia e as ceras têm funções protetoras para as folhas.

Naturalmente os ácidos graxos (gorduras) são encontrados como misturas de vários triglicerídios, os quais são classificados como ésteres. Os ácidos graxos possuem tipicamente entre 12 e 36 átomos de carbono. Nos animais encontram-se principalmente ácidos com cadeias alquílicas saturadas, enquanto em plantas predominam os ácidos insaturados (muitos adotando a configuração cis) e polinsaturados. Nos animais predominam os ácidos de cadeias alquílicas saturadas entre 12 e 18 átomos de carbono. Já nas plantas os ácidos graxos com 18 átomos de carbono mono-, di- e tri-insaturados são mais abundantes, enquanto que os ácidos graxos polinsaturados são mais comuns em algas e plantas superiores.

Os ácidos graxos encontrados na natureza possuem preferencialmente um número par de átomos de carbonos, isto devido a sua síntese, na qual estes são formados

a partir do acetil, que possui duas unidades de carbono ( $C_2$ ), um derivado da glicose (Figura 1.6).



**Figura 1.6 - Biossíntese dos ácidos graxos saturados de plantas e animais. O palmitato é formado por sucessivas adições de Malonil Coenzima A na cadeia enzimática com a perda de uma molécula de  $CO_2$  em cada adição, resultando na adição de  $-(CH_2)_2-$  a cada passo. Detalhes da formação do Butiril ( $C_4$ ) a partir do acetil ( $C_2$ ) é demonstrada, enquanto que a adição subsequente de seis metilenos a partir do malonil forma o palmitato.**

As ceras naturais são misturas de vários constituintes. As ceras diferem dos ácidos graxos no seguinte ponto, o glicerol é substituído por complexos grupos de esteróis e, ou álcoois com grandes cadeias alifáticas, com predominância de números pares de carbono. Ambos, ácidos graxos e álcoois nas ceras, possuem suas cadeias

alifáticas semelhantes, com máximas concentrações entre C<sub>24</sub> e C<sub>28</sub>, pois os números pares são sintetizados preferencialmente (Figura 1.6).

Equação:



(onde n = número ímpar)

Como pode-se perceber na equação acima, existe ainda a possível formação de aldeídos e outros sub produtos como cetonas e hidrocarbonetos ramificados, mas estes são encontrados em menores quantidades.

As ceras das plantas também podem conter hidrocarbonetos, principalmente de longas cadeias alifáticas. Em contraste com os álcoois e ácidos, os hidrocarbonetos contêm preferencialmente números ímpares de átomos de carbono. Esse fato, resulta da biossíntese dos mesmos, no qual o ácido é descarboxilado (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993).

Equação:



(onde n = número ímpar)

Os terpenos são uma classe de lipídios com uma grande variedade de estruturas e funções, mas com a semelhança de serem construídos a partir do isopreno, que contém 5 átomos de carbono. Sendo portanto classificados de acordo com o número destas unidades: monoterpenos contêm duas unidades, sesquiterpenos contêm três, diterpenos contêm quatro e assim por diante. As suas funções são as mais diversas possíveis, eles atuam como: feromônios, óleos de plantas, antibióticos naturais, agentes de proteção contra insetos (inseticidas) e resinas (Killops & Killops, 1993).

Existe ainda os esteróis, outra importante classe de lipídios, comuns em animais e plantas. Estes compostos são biossintetizados a partir da oxidação do esqualeno seguido de ciclização. Os esteróis geoquimicamente importantes encontram-se na faixa dos compostos entre 27 e 30 átomos de carbono,  $\beta$ -hidroxilados no C<sub>3</sub>, e geralmente com insaturação na posição 5 e 6 ( $\Delta^5$ ). Alguns exemplos são o stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, encontrados em plantas; outros podem ser encontrados em plantas e animais, como o colesterol (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993).

Nas plantas superiores existe ainda uma classe de composto denominado de lignina (caracterizada por estrutura aromática fenólica). A lignina é uma molécula de alto peso molecular, polifenólica, formada por reações de condensação (envolvendo desidrogenação e desidratação) de três principais constituintes: coniferil, sinapil e coumaril. A lignina é encontrada como uma rede tridimensional localizada entre as micelas da celulose, nos tecidos de sustentação da planta, funcionando como um importante suporte para o crescimento da planta (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993).

### ***1.5 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos***

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma grande classe de compostos orgânicos, provenientes da pirólise ou combustão incompleta da matéria orgânica.

As principais fontes naturais dos HPAs são os incêndios em florestas e erupções vulcânicas (Baek *et al*, 1991). Como exemplo pode-se citar que cerca de 2000 t/ano de HPAs é liberado para a atmosfera por incêndios naturais em florestas. O carvão é outra

importante fonte natural dos HPAs, cerca de 15 - 25 % do carvão é representado por estruturas aromáticas.

Muitos HPAs são formados durante a combustão e em outros processos utilizados pelo homem. Somente alguns HPAs são empregados comercialmente, nos quais incluem o naftaleno (inseticida, repelente) e o fenantreno (intermediário nas sínteses de inseticidas e resinas) (Internation Programme on Chemical Safety, 1998). A produção e emissão dos HPAs para o ambiente pode ocorrer a partir de uma fonte fóssil, tal como o petróleo. Significantes quantidades de HPAs são produzidas a partir dos combustíveis fósseis e seus derivados: creosote, alcatrão, betumem, ou em seus processamentos como, por exemplo, o refino do petróleo e a queima do carvão (Anderson et al, 1986). Os HPAs são formados também durante a pirólise de alguns materiais comumente utilizados no lazer pelos seres humanos, como por exemplo: alimentos assados e defumados, a fumaça do cigarro, escapamentos de automóveis, incineradores, etc (Internation Programme on Chemical Safety, 1998).

A toxicidade dos composto HPAs parece ser moderada a baixa ( $LD_{50}$  para o naftaleno introduzido via intravenosa e oral, em camundongos, apresentam valores entre 100-500  $mg.kg^{-1}$  de massa corporal). A administração destes via subcutânea, em estudos laboratoriais, demonstram reações adversas como a hiperqueratoses, a qual está relacionada com seus potenciais carcinogênicos. Estudos comprovaram a capacidade que alguns HPAs (Benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, dibenzo[a,h]antraceno, naftaleno) possuem de atravessar a barreira placentária e induzir no embrião algumas reações adversas, e conseqüentemente apresentando efeitos embriotóxico. A mutagenicidade dos HPAs é altamente estudada, e sabe-se por ora que somente os compostos naftaleno, fluoreno e antraceno não possuem tal característica. Muitos

compostos aromáticos possuem testes carcinogênicos negativos, mas possuem características mutagênicas confirmadas (Internation Programme on Chemical Safety, 1998).

### ***1.6 Lipídios como biomarcadores***

A matéria orgânica presente em sedimentos consiste em uma mistura complexa de vários compostos orgânicos, abrangendo compostos dos mais diversos pesos moleculares e estruturas funcionais. O termo biomarcadores (marcadores biológicos) é usado para alguns compostos orgânicos encontrados em amostras geológicas, cuja estrutura básica sugere uma verossímil ligação com seus precursores biológicos (<http://www.main.com/~pra/webhand.htm>, 1998).

A distribuição de certos grupos químicos em um ambiente, como álcoois e ácidos saturados de cadeias lineares e hidrocarbonetos alifáticos (alcanos), pode ser estudada a partir dos Índices Preferenciais de Carbono (IPC) para álcoois, ácidos graxos e hidrocarbonetos com cadeias lineares (Tissot & Welte, 1984; Killops & Killops, 1993). Os Índices Preferenciais de Carbono baseiam-se na razão ímpares/pares de uma determinada família de compostos e são extensivamente utilizados para estimar a presença de compostos terrestres em sedimentos. No caso das ceras epicuticulares de plantas superiores o  $IPC_{HA}$  para alcanos assume valores entre 4 e 10, em contraste os valores dos  $IPC_{HA}$  para compostos de origem marinha como bactérias e algas, com cadeias alquílicas superiores a 20 átomos de carbono, que assumem valores entre 1,0 e 1,5. O mesmo ocorre para os alcanos de origem antropogênica e compostos derivados naturalmente do petróleo/querogênio e pirólise, nos quais a preferência ímpares/pares não predomina (Madureira et al, 1995). Os IPCs podem também ser aplicados para

álcoois e ácidos carboxílicos saturados, nos quais a preferência ímpares/pares é invertida (ver seção 1.4).

IPC para alcanos:

$$IPC_{HA} = \frac{2(\sum \text{ímpares n-C}_{23} \text{ ao } C_{31})}{[\sum(\text{pares n-C}_{22} \text{ ao n-C}_{30}) + \sum(\text{pares n-C}_{24} \text{ ao n-C}_{34})]}$$

onde: *C* pode ser a concentração do referido composto saturado ou a integração de sua área fornecido pelo cromatograma ou fragmentograma característico.

IPC para ácidos e álcoois:

$$IPC_{AC/OH} = \frac{2(\sum \text{pares n-C}_{22} \text{ ao } C_{30})}{[\sum(\text{ímpares n-C}_{21} \text{ ao n-C}_{29}) + \sum(\text{ímpares n-C}_{23} \text{ ao n-C}_{31})]}$$

onde: *C* pode ser a concentração do referido composto saturado ou a integração de sua área fornecido pelo cromatograma ou fragmentograma característico.

Outro índice bastante utilizado é o RTA (razão entre a matéria de origem terrestre e aquática). Esse índice fornece uma relação entre compostos da mesma família, mas com diferentes origens biogênicas. Por exemplo, a presença de  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  e  $C_{31}$  para os alcanos indica a contribuição de ceras epicuticulares de plantas superiores, já os alcanos  $C_{15}$ ,  $C_{17}$ ,  $C_{19}$ , indica a contribuição de algas ( $RTA_{HA}$ ). O mesmo índice pode ser utilizado para ácidos carboxílicos ( $RTA_{AC}$ ) nos quais os ácidos  $C_{24}$ ,  $C_{26}$ ,  $C_{28}$ , são originados preferencialmente por plantas terrestres, e os  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  possuem origem de plantas aquáticas (fitoplâncton). De maneira que:  $RTA > 1$  indica a predominância de matéria orgânica terrestre e  $RTA < 1$  indica a predominância de matéria orgânica aquática (Bourbonniere & Meyers, 1996).

RTA para alcanos:

$$RTA_{HA} = \frac{(C_{27} + C_{29} + C_{31})}{(C_{15} + C_{17} + C_{19})}$$

RTA para ácidos:

$$RTA_{AC} = \frac{(C_{26} + C_{28} + C_{30})}{(C_{14} + C_{16} + C_{18})}$$

onde: *C* pode ser a concentração do referido composto saturado ou a integração de sua área fornecido pelo cromatograma ou fragmentograma característico.

Outras características relevantes de contaminação por combustíveis fósseis podem ser vistas em análises por CG, como o UCM (do inglês “unresolved complex mixture”), hidrocarbonetos não aromáticos (derivados dos hopanos e esteranos) e a presença dos HPAs nos sedimentos, os quais são considerados, hoje em dia, um reflexo desta fonte de contaminação, assim como a combustão da matéria orgânica através de queimadas, por exemplo (Killops & Killops, 1993).

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivos Gerais***

Análise qualitativa de amostras de sedimentos superficiais (até 0,10 m de profundidade) provenientes dos manguezais de Itacorubi, do Rio Ratones e da Baía de Babitonga. Avaliação do aporte de material orgânico de origem terrestre, aquático e possíveis contaminantes de combustíveis fósseis.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

- Identificar os compostos orgânicos presentes nos sedimentos dos manguezais, avaliar a presença de biomarcadores, tais como: hidroxiácidos, álcoois, ácidos

carboxílicos, hidrocarbonetos, possíveis poluentes oriundos de combustíveis fósseis, assim como outros compostos de origem antropogênica.

- Otimização de um método de fracionamento para a análise de biomarcadores no sedimento e estudo da proficuidade desse com a utilização dos padrões hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos; pretendendo observar o comportamento desses padrões durante as etapas que compõem o processo global, sendo essas a extração (E), liofilização/extração (LE), liofilização/extração/fracionamento em micro coluna cromatográfica de vidro (LEF).

- Estudar o fracionamento de um extrato total do sedimento através de uma micro coluna cromatográfica de vidro (sílica gel/alumina) em três frações distintas, F1 (eluente: hexano), F2 (eluente: DCM) e F3 (eluente: Acetato de Etila/MeOH (3:1)).

- Aplicar alguns índices disponíveis na literatura entre os compostos identificados nos extratos totais e fracionado, como os Índices Preferenciais de Carbono (IPC).

- Identificar a origem da matéria orgânica majoritária, isto é, qual é a sua procedência aquática ou terrestre.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A importância dos sistemas costeiros de manguezais para a manutenção do equilíbrio essencial à fauna e à flora endêmica e de suas periferias é inegável. O estudo da matéria orgânica desses ambientes e adjacências pode fornecer importantes dados relacionados a sua origem, estado de conservação e grau de impactação. Sendo os manguezais ambientes costeiros, sua posição é estratégica no que diz respeito à

recepção dos mais variados tipos de compostos orgânicos, tanto de origem biogênica como antropogênica, pelos mais diversos meios de transportes naturais como ventos, rios, chuvas e através do influxo das marés.

A obtenção de informações a respeito destes ecossistemas com relação a composição da matéria orgânica pode servir de base para futuras comparações e também de apoio para pesquisas em áreas afins. A busca pela compreensão da composição da matéria orgânica, as suas influências no ambiente, suas origens, são dados que futuramente poderão auxiliar cientistas na busca de informações referentes a tempos idos, e lançá-los na comparação de suas futuras pesquisas. A identificação de compostos de origem antropogênica, como DDTs e HPAs é uma comprovação da real impactação do meio e, conseqüentemente, um alerta à sociedade, pois os danos desses na cadeia trófica e na preservação dos ecossistemas são extensivamente ressaltados por ambientalistas.

Outra importante ressalva é quanto aos métodos de análise utilizados para a identificação dos lipídios e poluentes na matéria orgânica. A análise do extrato dos lipídios totais presentes no sedimento pode ser eficiente para a identificação e avaliação dos compostos mais abundantes na matéria orgânica como os ácidos graxos, hidrocarbonetos e álcoois. Mas a identificação de outros compostos menos abundantes torna-se difícil. Trabalhos em laboratórios e manuais de análise demonstram a importância do fracionamento do extrato total dos lipídios obtido da matéria orgânica e, ou de organismos vivos, para a identificação dos compostos em menores quantidades (Warner, 1976; Aceves *et al*, 1988; Porte *et al*, 1990; Hühnerfuss & Kallenborn, 1992; Wang *et al*, 1994a, b e c; Schulz - Bull *et al*; 1998).

O trabalho foi desenvolvido a partir da coleta de amostras em três locais distintos do litoral catarinense (ver seção 1.2), onde buscou-se informações gerais e específicas no que tange o estudo dos compostos orgânicos (lipídios solúveis e possíveis poluentes) encontrados nos sedimentos destes locais, assim como a otimização de um método de fracionamento para um estudo mais detalhado da matéria orgânica.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### ***4.1 Solventes, padrões, adsorventes e reagentes***

Os solventes utilizados foram previamente analisados, sendo a pureza constatada a partir da concentração de 50 mL a um volume final de aproximadamente 500  $\mu$ L. Posteriormente um volume de 1,4  $\mu$ L do concentrado foi injetado no cromatógrafo a gás. Somente depois de confirmada a pureza, esses foram utilizados nas análises.

Os padrões empregados foram: naftaleno, pireno, criseno, colestano, heneicosano ( $C_{21}$ ), tricosano ( $C_{23}$ ) e pentacosano ( $C_{25}$ ) e as soluções padrões foram preparadas em tolueno (Tabela 4.1).

### ***4.2 Limpeza da vidraria***

Os vidros foram inicialmente fervidos com uma solução diluída de detergente e depois enxaguados com água em abundância. O passo seguinte constava na imersão da vidraria em uma solução hidroalcoólica (100 g de KOH em 1 litro de solução etanol - água destilada (9:1)). Em seguida os vidros foram enxaguados com água e água destilada, respectivamente, e seco em estufa a uma temperatura de 160°C.

**Tabela 4.1 - Relação dos solventes, padrões, absorventes e reagentes utilizados**

<b>Solvente, padrões e reagentes</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Pureza</b>
Acetato de Etila	Tedia	Pesticida
Diclorometano	Tedia	ABSOLVENTE
Diclorometano	Carlo Erba	Analítico
Hexano	Tedia	HPLC
Metanol	Tedia	HPLC
Tolueno	Tedia	ABSOLVENTE
5 $\alpha$ colestano	Sigma	Cromatografia
Criseno	Sigma	Cromatografia
Heneicosane	Alltech Association	Cromatografia
Naftaleno	Sigma	Cromatografia
Pentacosano	Alltech Association	Cromatografia
Pireno	Sigma	Cromatografia
Tricosane	Alltech Association	Cromatografia
Alumina neutra	Carlo Erba	Analítico
Sílica Gel	Carlo Erba	Analítico
Sulfato de Sódio Anidro	Nuclear	Analítico
Cobre metálico	Nuclear	Analítico
Ácido Clorídrico	Grupo Química	Analítico
BSTFA	Sigma	Cromatografia
Hidróxido de Potássio	Nuclear	Analítico
Metanol	Tedia	HPLC
Nitrogênio (N <sub>2</sub> )	White Martins	4.6

### ***4.3 Coleta das amostras***

#### ***4.3.1 Manguezais de Itacorubi e do Rio Ratonos***

Os sedimentos foram coletados até uma profundidade de 0,10 m em uma superfície isenta de folhas com o auxílio de uma espátula e transferidos para vidros limpos com a precaução de envolver as mãos com luvas de polietileno.

O ponto escolhido no manguezal de Itacorubi (ponto I) é apresentado na Figura 1.2, sendo este estratégico, pois o local era considerado impactado. As amostras coletadas no manguezal do Rio Ratonos são apresentadas na Figura 1.1, onde um dos pontos está sob a influência constante das marés (ponto RC) e o outro muito raramente (ponto RI). Após as coletas os sedimentos foram levados ao laboratório e congelados até o uso.

#### ***4.3.2 Baía de Babitonga***

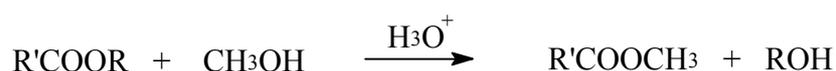
A coleta dos sedimentos foi realizada em dois pontos distintos, um próximo ao centro da cidade de Joinville (lagoa do Saguçu, ponto BL), e conseqüentemente sob a alta influência desta, e outro próximo à foz da Baía da Babitonga (ponto BF), mais precisamente no local conhecido como Vila Vigorelli (Figura 1.3). Os sedimentos foram coletados com o auxílio de um amostrador do tipo Van Veen, e posteriormente acondicionados com diclorometano em frascos de vidro limpos. No laboratório as amostras foram congeladas até o momento da análise.

#### 4.4 Extração dos lipídios totais

Estando as amostras liofilizadas ( $\approx 24$  horas), uma massa de sedimento em torno de 8-9 g foi dividida entre dois tubos de ensaio. Em seguida adicionou-se cerca de 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $5\alpha$ -colestano ( $1.805 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em cada tubo. Seguidamente efetuou-se três extrações (sólido/líquido) de 20 min em ultrassom ( $\nu = 25 \text{ kHz}$ ), nesta ordem: MeOH:DCM (1:1) e DCM duas vezes (Rodrigues - Neto, 1998). O volume de solvente utilizado em cada extração foi proporcionalmente igual a 2:1, ou seja, adicionou-se sempre o dobro de solvente em relação ao volume de sedimento, e o sistema líquido/sólido foi misturado com o auxílio de um agitador do tipo vortex. A cada etapa da extração os tubos foram centrifugados ( $g = 167,7 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$  por 2 min.), com o intuito de separar as fases sólida e líquida, e os sobrenadantes transferidos para um balão. Os quais foram concentrados a um volume conveniente ( $\approx 1 \text{ mL}$ ) no rota vaporizador (temperatura do banho  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O extrato foi então transferido para outro tubo de ensaio e seco completamente sob fluxo de nitrogênio, no qual também se efetuou a reação de metilação.

A reação de metilação (esterificação/transesterificação de Fisher de ácidos graxos e ésteres de cadeia alcoólica superior a uma metila) tem por finalidade diminuir a polaridade dos ácidos carboxílicos.

Reação:



onde: R = H (esterificação), R =  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$  (transesterificação)

O procedimento da reação de metilação obedeceu a seguinte seqüência: em um balão (50 mL) adicionou-se 2 mL de cloreto de acetila sobre 20 mL metanol recém retirado do congelador. Uma alíquota com cerca de 2mL do reagente foi adicionado no

tubo de ensaio contendo a amostra previamente dissolvida em  $\approx 1$  mL de tolueno. A solução foi mantida em estufa por 12 horas à temperatura entre 50 - 60 °C sob atmosfera de nitrogênio. Após as 12 horas, foi adicionada à amostra 1 mL de DCM e 1 mL de solução 10 % de KCl (quando necessário efetuou-se extrações excedentes com DCM para evitar perda de material para a fase aquosa). A amostra foi então centrifugada ( $g = 167,7 \text{ cm.s}^{-2}$  por 2 min.) para obter-se uma melhor divisão entre as fases orgânica e aquosa (desprezada). A fase orgânica (inferior) foi retirada e submetida posteriormente a uma micro coluna de vidro contendo sulfato de sódio anidro. O eluato foi recolhido em tubo de vidro ( $\approx 2$  mL), e concentrado a um volume apropriado com o auxílio de um leve fluxo de nitrogênio, antes de se proceder a silanização (Rodrigues - Neto, 1998).

A silanização foi realizada pelo mesmo motivo que se pronunciou para a metilação, salvo que a função química silanizada são as hidroxilas de álcoois, hidroxiácidos, esteróis, etc. O procedimento baseou-se na adição de 30  $\mu\text{L}$  do agente silanizante bistrimetilsilil - trifluoracetamida (BSTFA) ao tubo de vidro ( $\approx 2$  mL) contendo a amostra seca. Em seguida esta foi levada a estufa sob atmosfera de nitrogênio. Após uma hora de acondicionamento a 60 °C, o agente silanizante excedente foi evaporado com a ajuda de um leve fluxo de nitrogênio. Ao término do processo adicionou-se um volume apropriado de DCM e acondicionou-se a amostra no congelador até a sua análise por CG e, ou CG - EM.

## **4.5 Extração e fracionamento da amostra**

### **4.5.1 Extração**

Amostras liofilizadas pesando entre 8 e 9 g foram distribuídas em dois tubos de ensaio, nos quais adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  das soluções padrões de  $5\alpha$ -colestano ( $1.805 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e criseno ( $1.464 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em cada tubo. Em seguida efetuou-se três extrações, na seqüência: hexano/DCM (1:1), DCM (2 vezes) (Wang *et al*, 1994c), sempre em ultrassom por 20 min ( $v = 25 \text{ kHz}$ ) 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 2:1 em relação ao sedimento. Os extratos foram então centrifugados ( $g = 167,7 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$  por 2 min.), combinados e concentrados a um volume conveniente ( $\approx 1 \text{ mL}$ ) no rota vaporizador (temperatura do banho  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### **4.5.2 Confeção da micro coluna cromatográfica de vidro**

Os adsorventes utilizados foram a sílica gel e alumina neutra (Tabela 4.1), inicialmente estes foram purificados com diclorometano (grau analítico) no extrator Soxhlet por 24 horas, e após secos foram ativados em uma mufla durante 4 horas a temperatura de  $400^\circ\text{C}$  (Collins *et al*, 1993) e armazenados em um dessecador até o uso. A micro coluna cromatográfica foi empacotada com sílica gel (2 g, porção inferior) e alumina neutra (2 g, porção superior) sobre uma lâ de vidro (0,08 g) (Aceves *et al*, 1988; NOAA, 1993; Wang *et al*, 1994a). Os adsorventes foram introduzidos cuidadosamente no interior da coluna sob um volume de 20 mL de hexano, procurando-se ao máximo evitar a retenção de bolhas. Após o empacotamento a torneira foi aberta para permitir a eluição do solvente até uma altura de 1 mm acima do adsorvente, quando

então foi fechada. Os dados referentes a micro coluna cromatográfica de vidro podem ser encontrados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2 - Dados experimentais referentes a micro coluna cromatográfica**

Comprimento	25,0 cm
Diâmetro interno	1,0 cm
Altura da Fase Estacionária	10,1 cm
Volume da Fase Estacionária <sup>a</sup>	2,7 cm <sup>3</sup>
Volume Morto do Solvente <sup>b</sup>	3,2 cm <sup>3</sup>
Massa de Silica Gel	2,00 g
Massa de Alumina Neutra	2,00 g
Massa da Lã de Vidro	0,08 g
Vazão	1 - 2 mL/min

a, b: Medidas realizadas com água.

#### **4.5.3 Fracionamento da amostra**

Após a extração do material (seção 4.5.1), 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 Pauster. Em seguida, efetuaram-se mais duas lavagens extras no frasco com 1 mL de hexano, adicionando-se estas intercaladamente no interior da micro coluna. Um balão de 250 mL foi colocado embaixo da coluna e iniciou-se o recolhimento da fração um (F1). Para isto abriu-se a torneira e permitiu-se inicialmente a eluição do solvente até a altura 1 mm acima do adsorvente, quando fechou-se a torneira. Então, cuidadosamente, adicionou-se na micro coluna 13 mL de

hexano; a torneira foi novamente aberta para permitir o escoamento do solvente até a altura de 1 mm acima do adsorvente, quando então foi fechada (final da primeira fração, F1). O frasco de 250 mL foi substituído por outro idêntico para dar início a segunda eluição. Operou-se desta forma duas lavagens no frasco do extrato com 1mL diclorometano (NOAA, 1993), inserindo-os seqüencialmente no interior da micro coluna, com posterior eluição o solvente até a altura 1mm acima do adsorvente. Após adicionou-se na coluna 18 mL de diclorometano permitindo-se a seguir a eluição do solvente à altura de 1mm acima da fase estacionária; término da segunda fração (F2). Para o recolhimento da fração 3 (F3) o procedimento é idêntico aos anteriores alterando-se somente os solventes. Foram feitas duas lavagens do frasco do extrato com 1mL de solução acetato de etila/metanol 3:1, e posterior eluição com 18 mL da referida mistura de solventes acetato de etila/MeOH 3:1 (F3) (Sicre *et al*, 1994). Os solventes dos frascos F1 e F2 foram concentrados a um volume conveniente com a ajuda do rota vaporizador seguido de um leve fluxo de nitrogênio, e as amostras acondicionadas em congelador até as análises por CG e, ou CG - EM. A fração (F3) foi silanizada, procedimento idêntico ao descrito na seção 4.4, antes de proceder as análises cromatográficas.

Observação: Nas frações F1 e F2 detectou-se a presença de enxofre e, portanto, efetuou-se uma etapa extra nessas. 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).

#### **4.6 Preparo das fortificações com padrões**

##### **4.6.1 Micro coluna cromatográfica de vidro**

A aplicação do teste de fortificação realizado com a micro coluna teve por objetivo observar a eficiência da coluna na recuperação de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos (Heneicosano ( $C_{21}$ ), Pentacosano ( $C_{25}$ ), naftaleno (NAF), pireno (PIR) e criseno (CRI)) quando estes eram submetidos ao fracionamento. Os procedimentos utilizados na avaliação da micro coluna consistiam em: a) adicionar 100 $\mu$ L da solução padrão ( $C_{21}$  (1.018  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>),  $C_{25}$  (1.011  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), NAF (1.014  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), PIR (1.071  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e CRI (995  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>)) no interior da coluna e b) adicionar 100 $\mu$ L de óleo diesel na coluna, para posteriormente efetuar o procedimento utilizado no fracionamento da amostra, todavia, somente para as frações F1 e F2.

##### **4.6.2 Testes de extração (E), liofilização com extração (LE) e liofilização com extração seguida de fracionamento (LEF)**

Com o objetivo de observar possíveis perdas dos compostos durante as etapas de extração, liofilização e fracionamento, foram realizados três testes distintos com uma mistura de padrões ( $C_{21}$ ,  $C_{25}$ , NAF, PIR e CRI). No primeiro teste foi realizado apenas a extração dos padrões, no segundo foi feito a liofilização com extração e o terceiro foi com a liofilização, extração seguida de fracionamento. Dessa forma procurou-se avaliar as etapas envolvidas no processo progressivamente, ou seja, extração (E), liofilização/extração (LE), liofilização/extração/fracionamento (LEF).

Em um balão de 100 mL inseriu-se cerca de 10 g de sedimento seco previamente extraído. Para os testes LE e LEF além dos 10 g de sedimento efetuou-se a adição de

água marinha em porcentagem idêntica a encontrada no sedimento do manguezal do Rio Ratonés (57,2 %). Os testes de E e LE foram realizados em triplicata, com a adição de 100 µL da solução padrão contendo 101,8 µg de C<sub>21</sub>; 101,1 µg de C<sub>25</sub>; 101,4 µg de naftaleno; 99,5 µg de criseno e 107,1 µg de pireno. Essas massas são semelhantes às encontradas em 100 µL de petróleo (Wang *et al*, 1994a). Os balões utilizados no teste de liofilização passaram por agitações esporádicas, com intervalos de quinze minutos entre uma agitação e outra durante uma hora antes de serem levados ao congelador.

Para o teste LEF adicionou-se a mesma solução de padrões (C<sub>21</sub>, C<sub>25</sub>, naftaleno, criseno e pireno). As amostras foram preparadas em duplicata contendo a seguinte quantidade dos padrões: 97,4 µg de C<sub>21</sub>; 89,3 µg de C<sub>25</sub>; 85,3 µg de naftaleno; 74,3 µg de criseno e 103,1 µg de pireno. Após a adição do padrão aplicou-se sobre a amostra um fluxo brando de nitrogênio a fim de evaporar o solvente com o qual a solução padrão foi preparada. Neste ínterim, com o auxílio de um agitador, fez-se agitações esporádicas do balão em intervalos de quinze minutos; processo este que durou além do tempo do uso do fluxo de nitrogênio, aproximadamente uma hora. Com o término da agitação, deixou-se as amostras em repouso durante a noite a 4°C, para no dia seguinte submetê-las a mais uma sessão de 1 hora de agitações esporádicas (Swartz *et al*, 1997). O passo final foi o congelamento da amostra com posterior liofilização, extração, fracionamento e análise.

#### **4.7 Parâmetros cromatográficos**

Os parâmetros cromatográficos usados para as análises estão descritos nas Tabelas 4.3 e 4.4, sendo a primeira utilizada na avaliação do método de fracionamento e a segunda para as análises dos sedimentos.

**Tabela 4.3 - Parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação do método 4.5**

Tempo de “Splitless”	1 min
Divisão de Fluxo	1:40
Fluxo do Gás Carreador	2 mL/min
Temperatura Inicial do Forno	80 °C
Tempo de Isoterma a 80 °C	2 min
Taxa de aquecimento entre 80 e 300 °C	8 °C/min
Tempo de Isoterma a 300 °C	5 min
Taxa de aquecimento entre 300 e 310 °C	4 °C/min
Tempo de isoterma a 310 °C	1 min

**Tabela 4.4 - Parâmetros cromatográficos utilizados para as análises dos sedimentos**

Tempo de “Splitless”	1 min
Divisão de Fluxo	1:40
Fluxo do Gás Carreador	2 mL/min
Temperatura Inicial do Forno	40 °C
Taxa de aquecimento entre 40 e 180 °C	10 °C/min
Taxa de aquecimento entre 180 e 310 °C	4 °C/min
Tempo de isoterma a 310 °C	15 min

**4.8 Equipamentos utilizados**

- Os sedimentos foram liofilizados através do liofilizador EDWARDS MICROMODULYO 15k acoplado à bomba EDWARDS - E2M2.

- As amostras de sedimento foram pesadas na balança analítica METLER - H80 (precisão  $\pm 0,5$  mg), já as soluções padrões foram preparadas com a auxílio da balança analítica METLER TOLEDO - AT21 (precisão  $\pm 0,005$  mg).
- Os equipamentos utilizados nas extrações foram: ultrassom UNIQUE - USC 1450 (25 kHz), agitador de tubos do tipo vortex PHOENIX - AP56, centrífuga FANEN - EXCELSA BABY II - 206R e rota vaporizador FISATON 802 com banho termostaticado 550D (1200W).
- Nas análises da avaliação do método foi utilizado um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GC-17A, com uma coluna de sílica fundida LM-1 (25 m x 0,25 mm d.i. e 0,25  $\mu$ m de espessura de fase), equipado com um detector de ionização de chama (FID), no qual o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. Enquanto que nas amostras utilizou-se um cromatógrafo a gás de marca Shimadzu, modelo CG14B, acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo CGMS-QP2000 A (impacto de elétrons 70 eV), com uma coluna cromatográfica de sílica fundida CBP1 (25 m x 0,25 mm d.i) no qual o gás de arraste foi o hélio.

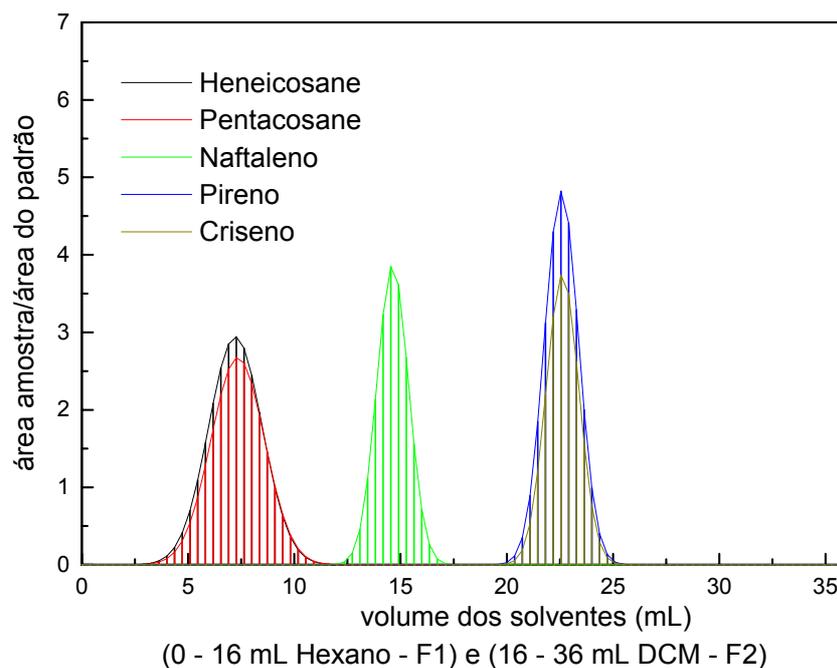
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### ***5.1 Micro coluna cromatográfica de vidro: um estudo do comportamento dos padrões de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos***

Uma micro coluna cromatográfica de vidro, preparada conforme descrito na seção 4.5.2, foi utilizada para avaliar a eficiência na separação entre os hidrocarbonetos alifáticos (HAs) heneicosano e pentacosano, e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) naftaleno, pireno e criseno.

### 5.5.1 Diagrama de eluição dos padrões e de um óleo diesel comercial

A Figura 5.1 mostra a seqüência de eluição de 5 padrões de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos: o heneicosano ( $C_{21}$ ), o pentacosano ( $C_{25}$ ), o naftaleno (NAF), o pireno (PIR) e o criseno (CRI).



**Figura 5.1 - Diagrama de eluição dos padrões estudados: heneicosano, pentacosano, naftaleno, pireno e criseno. Para a eluição dos compostos utilizou-se primeiramente 16 mL de hexano (F1) e após 20 mL de DCM (F2).**

A confecção do diagrama procedeu-se da seguinte maneira: primeiramente introduziu-se 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão contendo os compostos  $C_{21}$  ( $1.018 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ),  $C_{25}$  ( $1.011 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), NAF ( $1.014 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), PIR ( $1.071 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e CRI ( $995 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Posteriormente os eluatos foram coletados em alíquotas de 2 mL, nas quais foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução padrão contendo o composto tricosano ( $1.940 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Após a corrida cromatográfica de cada alíquota efetuou-se a divisão das áreas dos padrões ( $C_{21}$ ,  $C_{25}$ , NAF, PIR e CRI) pela área do padrão  $C_{23}$  adicionado depois.

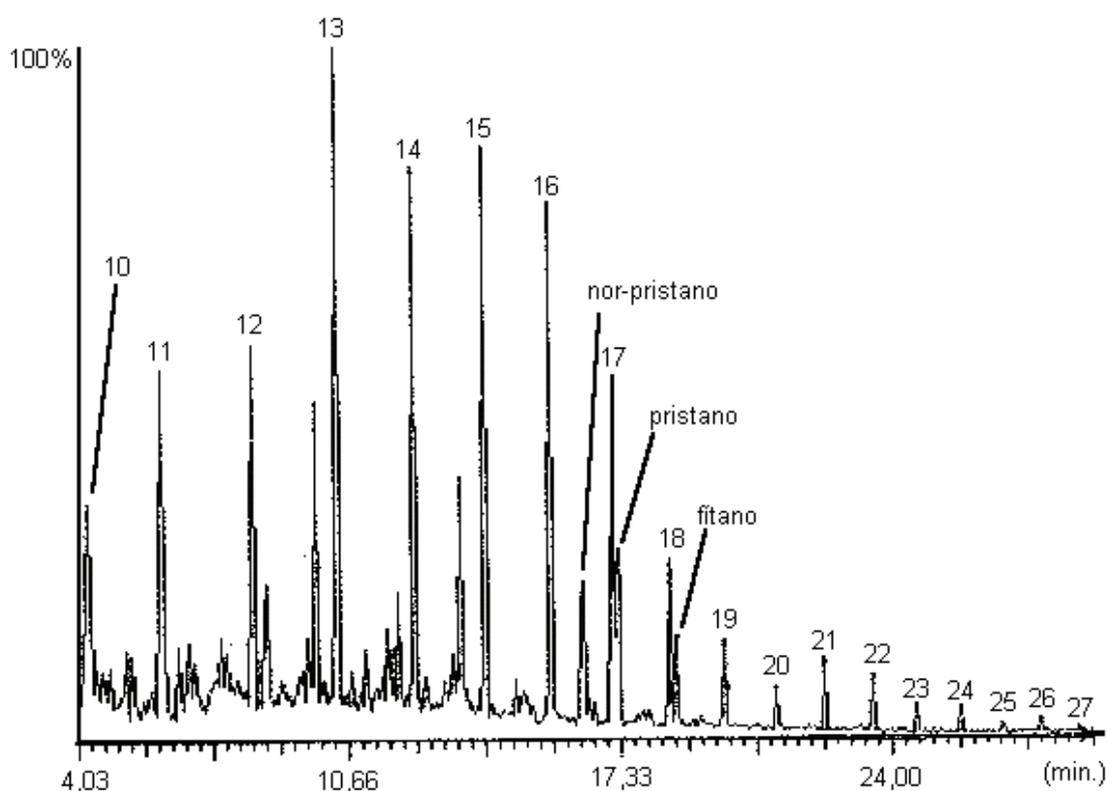
O volume de eluição relativo a fração F1, 16 mL de hexano, foi determinado empiricamente, de modo semelhante ao descrito para a confecção do diagrama. Testes com volumes de hexano superior a 16 mL foram realizados, e a constatação da total eluição dos hidrocarbonetos alifáticos ( $C_{21}$  e  $C_{25}$ ) foi observada aos 16 mL. O mesmo procedimento foi utilizado para a determinação do volume do solvente DCM, no qual a total eluição dos HPAs foi observada com a utilização de 16 mL de DCM; os 4 mL restantes de DCM foram utilizados por motivo de segurança.

A confecção do diagrama teve como intuito a observação do comportamento dos padrões estudados frente a força dos eluentes utilizados. O que se pode observar no diagrama é a completa eluição dos hidrocarbonetos alifáticos na primeira fração (solvente hexano), e uma parcial eluição do NAF. Os demais compostos, PIR e CRI, permaneceram adsorvidos na fase estacionária, e as suas eluições só foram observadas após a adição do DCM (maior polaridade do que a do hexano).

Com o intuito de observar o comportamento da micro coluna cromatográfica frente a uma amostra complexa, efetivou-se um teste de eluição com um óleo diesel comercial, no qual realizou-se o fracionamento do óleo diesel em duas frações, F1 e F2. As Figuras 5.2 e 5.3 apresentam os cromatogramas obtidos para as frações F1 e F2 respectivamente. Nos cromatogramas os hidrocarbonetos foram monitorados pelo seu fragmento característico  $m/z$  85, e os policíclicos aromáticos pelo íon molecular.

O cromatograma da fração F1 (eluente hexano) apresenta os hidrocarbonetos entre  $C_{10}$  e  $C_{27}$ , incluindo o fitano, pristano e nor - pristano, assim como o naftaleno e seus homólogos com 1 e 2 metilas ligadas ao anel, somente detectados através dos

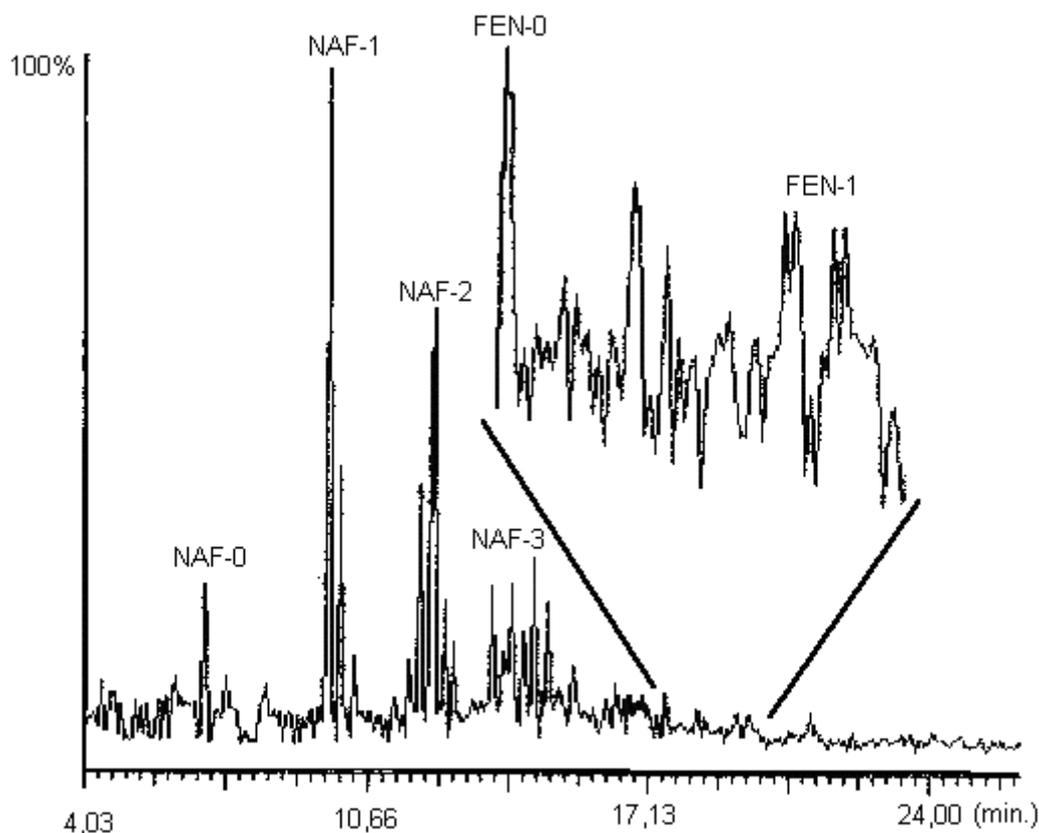
fragmentogramas de seus íons moleculares. A presença do naftaleno nesta fase já era esperada, sendo isto somente uma constatação do que já fora exposto no diagrama acima (Figura 5.1). A identificação de policíclicos aromáticos acima de três anéis na fração F1 não ocorreu.



**Figura 5.2 - Cromatograma do óleo diesel, fração F1 contendo os hidrocarbonetos alifáticos (Has). Os números sobre os picos indicam o número de átomos de carbono do composto. Condições cromatográficas conforme descrito na Tabela 4.3.**

O cromatograma da fração F2 apresenta o naftaleno e seus homólogos com 1, 2, 3 metilas ligadas ao anel aromático, sendo que este homólogo tri-metilado não foi identificado na fração F1. Outra característica desta fração foi a identificação do fenantreno e seus homólogos metilados (não identificados na fração F1).

O objetivo da separação em microcoluna cromatográfica de vidro é de proporcionar uma melhor visualização e identificação dos compostos encontrados em sedimentos, pois estes são misturas complexas difíceis ou praticamente impossíveis de serem separadas sob o auspício único da cromatografia gasosa.



**Figura 5.3 - Cromatograma do óleo diesel, fração F2 contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os números 0, 1, 2 e 3 indicam o número de metilas ligadas aos homólogos dos HPAs. Condições cromatográficas conforme descrito na Tabela 4.3.**

A divisão entre as frações F1 e F2 foi determinada, como a mais conveniente, após a eluição de 16 mL de hexano, mesmo percebendo a perda de naftaleno e seus homólogos para a fração F1, pois a redução no volume de eluição na fração F1 levaria a presença de compostos alifáticos na fração F2, o que ocasionaria uma perda significativa

dos HAs para F2, uma vez que os HAs não foram quantitativamente eluídos, além é claro, de poderem interferir (coelundo) em futuras análises e identificação dos HPAs.

Trabalhos em laboratórios já demonstraram a eluição dos compostos aromáticos com uma mistura de hexano com DCM (1:1), além do uso de uma quantidade superior de sílica/alumina (8 g de cada) (Warner, 1976; Aceves *et al*, 1988; Porte *et al*, 1990; NOAA, 1993). No entanto, o objetivo era reduzir o volume de solvente utilizado para a eluição dos compostos alvos, motivo pelo qual se procedeu a diminuição da fase estacionária para 2 g de sílica e 2 g de alumina. O aumento da polaridade do solvente na eluição da segunda fração, no caso o uso do DCM 100%, teve como objetivo a possível identificação de organoclorados nesta fase, já que dados na literatura apresentaram a total eluição de compostos como DDT, aldrin, enedrin com a utilização do DCM puro (Aceves *et al*, 1988).

### ***5.1.2 Cálculo do Fator Reposta (FR) entre os padrões utilizados***

O método de quantificação utilizado foi o da padronização interna, no qual dentre os compostos estudados escolheu-se um composto de cada fração de eluição. Para a escolha do padrão observou-se alguns cuidados: o naftaleno foi o primeiro a ser descartado devido a sua eluição em ambas as fases; outro fator observado foi o ponto de fusão de cada composto estudado pois a perda dos compostos na liofilização era objetivado. Verificando estas primícias escolheu-se como padrão interno para fração F1 o pentacosano e para fração F2 o criseno (Tabela 5.1).

O FR resposta foi calculado a partir da seguinte equação:

$$FR = \frac{A_A C_{PI}}{A_{PI} C_A}$$

onde:

$A_{PI}$  = Área do padrão interno  
 $A_A$  = Área do analito

$C_{PI}$  = Concentração do padrão interno  
 $C_A$  = Concentração do analito

**Tabela 5.1 - Fator Resposta (FR) determinado pelo método da padronização interna<sup>a</sup>**

	<b>FRs</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>faixa de concentração (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>
<b>F1</b>	-	-	-
<b>C<sub>21</sub></b>	1,192	4,95	2,6 - 407,1
<b>NAF</b>	1,944	17,90	2,2 - 405,6
<b>C<sub>25</sub></b>	PI	PI	2,4 - 404,4
<b>F2</b>	-	-	-
<b>PIR</b>	1,589	16,17	2,7 - 428,4
<b>NAF</b>	3,981	17,76	2,2 - 405,6
<b>CRI</b>	PI	PI	2,0 - 380,2

a: Foram preparadas cinco soluções com concentrações diferentes de cada padrão entre os valores citados na tabela e efetuou-se três leituras de cada solução para a obtenção destes valores de FR.

A variação no valor do RSD ficou entre 4,95 e 17,90. Esses valores demonstram um RSD < 20%. Portanto, podem ser considerados como constantes para a faixa de concentração estudada, e então aplicados nos cálculos (EPA, 1997).

### **5.1.3 Aspectos quantitativos da micro coluna cromatográfica de vidro**

A Tabela 5.2 mostra os valores encontrados na recuperação dos compostos estudados. Pode-se perceber uma boa separação dos compostos aromáticos, criseno e

pireno, uma vez que estes não foram identificados na fração F1, assim como os hidrocarbonetos alifáticos heneicosano e pentacosano, que não foram identificados na fração F2. Os valores de recuperação para os compostos heneicosano e pireno foram acima de 80%.

O naftaleno, como já era esperado, ficou dividido entre as duas frações, apresentando-se em maior quantidade na primeira fração. A recuperação total do naftaleno foi de 20,0 % (18,8 % na fração F1 e 1,2 % na fração F2), este valor foi baixo provavelmente devido às etapas de concentração das amostras, realizadas em um rota vapor e fluxo de nitrogênio. Pois sendo o naftaleno, dentre os compostos estudados, o mais volátil (ponto de ebulição = 218 °C), suspeita-se que a sua perda tenha ocorrido nessas etapas.

**Tabela 5.2 - Resultados quantitativos da micro coluna**

compostos	m <sub>AD</sub> <sup>a</sup> (μg)	m <sub>F1</sub> <sup>b</sup> (μg)	m <sub>F2</sub> <sup>c</sup> (μg)	Rec (%)	N
C <sub>21</sub>	101,8	96,6 ± 0,2	ND	94,9	2
C <sub>25</sub>	101,1	PI	ND	PI	2
NAF	101,4	19,1 ± 0,9	1,2 ± 0,1	20,0	2
PIR	107,1	ND	87,8 ± 1,1	82,0	2
CRI	99,5	ND	PI	PI	2

a: massa adicionada no teste de fortificação.

b: massa recuperada na fração F1.

c: massa recuperada na fração F2.

### 5.2 Avaliação do método descrito na seção 4.5

O procedimento para se avaliar o método foi dividido em três partes distintas: a - liofilização, b - extração e c - fracionamento. Com o intuito de observar o comportamento dos padrões nas diferentes etapas realizou-se os testes de fortificação

em sedimentos previamente extraídos (ver parte experimental seção 4.6.2). Portanto avaliou-se as etapas envolvidas no processo progressivamente, ou seja, extração (E), liofilização/extração (LE), liofilização/extração/fracionamento (LEF). A Tabela 5.3 mostra os valores encontrados nestes testes.

**Tabela 5.3 - Resultados das fortificações do processo de avaliação por etapas: E, LE, LEF**

compostos	m <sub>AD</sub> (µg)	m <sub>F1</sub> (µg)	m <sub>F2</sub> (µg)	m <sub>TR</sub> <sup>c</sup> (µg)	REC (%)	N
C <sub>21</sub> (E) <sup>a</sup>	101,8	-	-	86,3 ± 1,3	84,8	3
C <sub>21</sub> (LE) <sup>a</sup>	101,8	-	-	76,5 ± 10,8	75,1	3
C <sub>21</sub> (LEF) <sup>a</sup>	97,4	66,9±3,6	ND	-	68,7	2
NAF (E) <sup>a</sup>	101,4	-	-	51,9 ± 13,8	51,2	3
NAF (LE) <sup>a</sup>	101,4	-	-	10,1 ± 2,4	10,0	3
NAF (LEF) <sup>a,b</sup>	85,2	2,2±0,1	0,8±0,5	-	3,5	2
PIR (E) <sup>b</sup>	107,1	-	-	89,8 ± 2,5	83,8	3
PIR (LE) <sup>b</sup>	107,1	-	-	95,3 ± 2,6	89,0	3
PIR (LEF) <sup>b</sup>	103,1	ND	60,9±0,6	-	59,1	2

a: Padrão interno C<sub>25</sub> utilizado como base nos cálculos.

b: Padrão interno Criseno utilizado como base nos cálculos.

c: massa total recuperada

Os padrões apresentaram características distintas, no que tange ao comportamento em cada etapa do procedimento. O composto C<sub>21</sub> demonstra uma queda em sua recuperação durante os processos, ou seja, com o acréscimo de uma etapa a sua recuperação diminui. Analisando os dados para o composto C<sub>21</sub> observa-se um fato curioso com respeito ao alto desvio encontrado durante a etapa de LE (±10,8), o que sugere além da perda do composto durante o processo de liofilização, que a recuperação

varia de acordo como o tempo de liofilização. Quanto à aplicação do método total (LEF), o valor o desvio padrão diminuiu ( $\pm 3,6$ ) o que indica uma melhor repetitividade. O fato marcante para a incongruência dos resultados entre as etapas LE e LEF, no que diz respeito ao desvio padrão, foi causado devido ao fato de duas amostras (teste realizado em triplicata) terem permanecido um tempo extra no liofilizador, e os resultados obtidos iguais a 67,5  $\mu\text{g}$ , 73,4  $\mu\text{g}$  e 88,5  $\mu\text{g}$  (média - Tabela 5.4).

O comportamento do naftaleno foi semelhante ao  $C_{21}$ , pois a sua perda aumentou durante a adição das etapas, salvo em relação aos seus valores, os quais demonstraram uma menor recuperação, o que indica que além da perda na etapa de liofilização ocorreu também uma significativa perda do composto nas etapas de concentração.

Os resultados oferecidos pelo pireno a primeira vista parecem inconsistentes, primeiramente observa-se um aumento na recuperação com a adição de uma etapa, onde se esperaria uma diminuição. A diferença entre essas etapas E e LE foi de 6,3 %, sendo que este valor está dentro do esperado pela EPA para as curvas de calibração, na qual a diferença entre os sinais não pode ultrapassar  $\pm 15\%$ . Portanto pode-se considerar que esta diferença pode ter sido promovida pelo cromatógrafo a gás (EPA, 1997) e, ou ainda pelo analista, já que os testes foram realizados separadamente, e, ou efeito de matriz. Este dado forneceu respaldo para a discussão de que a perda do pireno não tenha ocorrido na etapa de liofilização, ou melhor, se alguma perda ocorreu esta foi equivalente a do criseno (padrão interno). Já a menor recuperação apresentada pelo pireno no teste total (LEF) foi devido a junção de mais uma etapa, no caso o fracionamento, que conseqüentemente diminuiu a porcentagem de recuperação.

### **5.3 Lipídios**

Os procedimentos realizados para as análises dos lipídios estão descritos nas seções 4.4 e 4.5. A primeira consiste na análise dos lipídios totais (seção 4.4), sendo os resultados apresentados nas seções abaixo 5.3.1 e 5.3.2. Na segunda, seção 4.5 da parte experimental, realizou-se o fracionamento da amostra em três frações distintas F1, F2 e F3, e os resultados são apresentados na seção 5.3.3. Esta análise envolvendo o fracionamento teve por objetivo uma melhor avaliação do sedimento provindo da Lagoa do Saguçu (BL) e a aplicação do método proposto para análise dos hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e policíclicos aromáticos (HPAs). Uma característica peculiar dessa etapa é a eluição da terceira fração (F3), como não havia os padrões necessários para testes prévios, e sabendo de antemão da existência de álcoois na amostra BL (através da extração total), efetuou-se testes sobre essa fração na tentativa de promover a separação dos álcoois e esteróis dos ácidos carboxílicos, compostos esses presentes em abundância.

#### ***5.3.1 Comparação entre os biomarcadores de cadeia linear identificados nos sedimentos, a partir de seus extratos totais.***

Os biomarcadores foram identificados a partir de seus fragmentogramas, nos quais detectou-se a presença dos seguintes compostos: ácidos carboxílicos (AC) metilados, identificados a partir do fragmento  $m/z$  74 ( $C_3H_6O_2^+$ ) (pico característico dos ésteres); hidrocarbonetos alifáticos (HAs), identificados pelo fragmento  $m/z$  85 ( $C_6H_{13}^+$ ), e os álcoois lineares (OH) silanizados que foram identificados pelos fragmentos  $m/z$  75 ( $(CH_3)_2SiOH^+$ ) e  $M^+-15$  (da perda de uma metila do grupo trimetilsilil). Conseqüentemente, os cálculos dos índices apresentados na Tabela 5.4

foram efetivados a partir das áreas oferecidos pelos fragmentogramas comentados anteriormente, no caso dos álcoois utilizou-se o m/z 75.

**Tabela 5.4 - Índices Preferenciais de Carbono (IPC) para ácidos carboxílicos (AC), álcoois lineares (OH) e hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e razão Terrestre Aquático (RTA) para os ácidos carboxílicos**

	RC <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	BL <sup>c</sup>	BF <sup>d</sup>	I <sup>e</sup>
IPC <sub>HAS</sub>	5,3	8,0	2,8	4,9	5,2
IPC <sub>OH</sub>	7,9	3,7	5,9	20,9	5,5
IPC <sub>AC</sub>	5,6	6,0	6,0	13,0	6,3
RTA <sub>AC</sub>	0,6	0,4	0,1	0,1	0,8

a: ponto Ratores Costa.

b: ponto Ratores Interior

c: ponto Baía da Babitonga (Lagoa do Saguau)

d: ponto Baía da Babitonga Foz.

e: ponto Itacorubi.

Os Índices Preferenciais de Carbono apresentados acima são baseados em uma razão par/ímpar para ácidos e álcoois e ímpar/par para os hidrocarbonetos (ver introdução seção 1.6). Esses são extensivamente utilizados na avaliação da origem da matéria orgânica. Os IPC<sub>S</sub> para todos os ambientes estudados apresentam valores maiores 4, exceto para o IPC<sub>OH</sub> da amostra RI e o ICP<sub>HAS</sub> para a amostra BL. Estes valores altos de ICPs demonstram a influência de matéria orgânica originária de plantas vasculares, especificamente de tecidos epicuticulares. Isto é reforçado pela grande presença dos hidrocarbonetos C<sub>23</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> predominantes na matéria orgânica de origem terrestre. A presença de hidrocarbonetos inferior a 20 átomos de carbonos foi inviabilizada devido a presença de uma enorme quantidade de ácidos carboxílicos nas amostras e que sobrepuseram aos HAs, o que sugere então, a “baixa” concentração dos HAs. Alguns valores mostrados na Tabela 5.4 apresentam uma considerada variação em

relação aos demais (valores entre 3,7 - 8,0), como por exemplo: o  $ICP_{HAS}$  para a amostra BL (2,8), e os  $ICP_{OH}$  e  $ICP_{AC}$  para a amostra BF (20,9 e 13,0 respectivamente).

O valor encontrado para  $ICP_{HAS}$  da amostra BL significa um relativo aumento na concentração dos hidrocarbonetos pares em relação aos ímpares, valores  $ICP_{HAS}$  em torno de 1 e 1,5 sugere a presença de compostos antropogênicos (Madureira *et al*, 1994). A presença de contaminantes fósseis não é evidenciada pelo valor oferecido, mas o seu decréscimo, quando comparado aos demais, e a identificação de HPAs na amostra apontam para este fim. Portanto o “alto” valor oferecido pelo  $ICP_{HAS}$ , especificamente neste caso, pode ser devido a larga influência da matéria orgânica de origem terrestre, pois a Lagoa do Saguçu (BL) se encontra no interior da Baía da Babitonga e recebe grandes quantidades de matéria orgânica provinda do continente através dos rios que ali desembocam. Outro fator que pode contribuir para o aumento deste valor é o fato das áreas envoltas da lagoa terem sido devastadas devido ao crescimento da cidade de Joinville, o que contribui, através da erosão, para um aumento da carga oriunda do continente para a lagoa (Souza, 1991). Os altos valores encontrados para o  $ICP_{AC}$  e o  $ICP_{OH}$ , na amostra BF, sugere o mesmo comportamento descrito acima no que tange a matéria orgânica de origem terrestre, uma vez que não foram identificados HPAs no extrato total na amostra BF. O valor do  $ICP_{HAS}$  mostrado, nesta amostra, é relativamente inferior ao restantes (RC, RI, I), o que pode concordar com fato da relativa distância entre os dois pontos (BF e BL), onde poderia se esperar uma certa influência entre ambos. Os valores de  $ICP_{OH}$  e  $ICP_{AC}$  para a amostra BL assemelham-se as demais e é relativamente baixo quando comparados com a amostra BF, o que poderia sugerir uma alta atividade bacteriana no sedimento da Lagoa do Saguçu, onde existiria uma maior chance para a degradação dos compostos.

Os valores de RTAs para as amostras indicam a predominância do material de origem aquática. Os valores para todos os pontos apresentam-se  $< 1$ . Os ácidos de cadeia longa com  $C_{24}$ ,  $C_{26}$  e  $C_{28}$  são amplamente encontrados em tecidos epicuticulares de plantas superiores assim como em suas folhas, flores e pólenes, entretanto os ácidos de cadeia curta  $C_{12}$ ,  $C_{14}$  e  $C_{16}$  são extensivamente produzidos por algas (Bourbonniere *et al*, 1980). Entre os valores encontrados pode-se perceber uma grande atividade de algas em todos os pontos de coleta, destacando os pontos do manguezal da Baía de Babitonga BL e BF, que apresentam valores menores que os demais.

Comparando os resultados oferecidos pelos índices ICPs e RTAs observa-se a contribuição tanto de matéria orgânica de origem terrestre quanto aquática, no qual esta última apresenta-se em maior proporção, fatos estes condizentes com a localização dos manguezais, pois estando estes localizados em regiões estuarinas pode-se perceber claramente o porquê da contribuição da matéria orgânica por ambos os trâmites.

### **5.3.2 Outros Biomarcadores identificados nos sedimentos**

Os ambientes estudados possuem basicamente as mesmas características, ou seja, todas as amostras são provenientes de regiões costeiras de manguezais, salvo a amostra BL, proveniente de uma lagoa, mas que também está cercada por manguezais. A Figura 5.4 mostra o cromatograma do extrato total da amostra do manguezal de Itacorubi, localizado na Ilha de Santa Catarina. Esse apresenta um perfil geral dos compostos encontrados em todos os locais estudados. Todos os pontos estudados apresentam uma grande variedade de ácidos carboxílicos entre os compostos lineares de 14 a 18 átomos de carbono, destacando-se a presença de ácidos lineares ramificados, principalmente os ácidos iso e anteiso com 15, 16 e 17 átomos de carbono. Os espectros

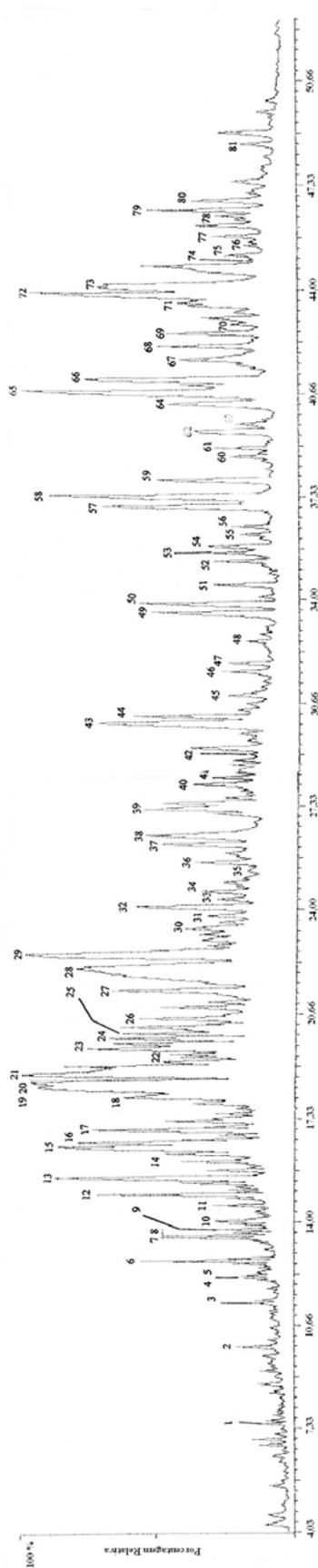


Figura 5.4 - Cromatograma da amostra proveniente do manguezal de Iacourubi (D), sendo os números os seguintes compostos: 1) fenil metoxi, 2) AC10, 3) AC11, 4) AC-R12, 5) AC-R12, 6) AC12, 7) m-hidrossifenil etoxi, 8) AC-R13, 9) AC-R13, 10) AC13, 11) 2-(propenil-3-metoxi)naftaleno, 12) AC-R14, 13) AC14, 14) OH14, 15) AC-115, 16) AC-A15, 17) AC15, 18) AC-R16, 19) AC-116, 20) AC-A16, 21) AC16, 22) ácido férulico, 23) OH16, 24) AC-A17, 25) AC-A17, 26) AC17, 27) OH17, 28) HZ1, 29) AC18, 30) OHR18, 31) OH18, 32) HZ2, 33) AC19, 34) AC-D16, 35) OH19, 36) m-OHAC16, 37) HA23, 38) AC20, 39) OH20-40) HA24, 41) AC21, 42) OH21, 43) HA25, 44) AC22, 45) OH22, 46) HA26, 47) AC23, 48) OH23, 49) HA27, 50) AC24, 51) OH24, 52) HA28, 53) AC25, 54) colestano (pantão), 55) OH25, 56) m-OHAC22, 57) HE29, 58) AC26, 59) OH26, 60) HA30, 61) AC27, 62) OH27, 63) m-OHAC24, 64) HA31, 65) AC28, 66) OH28, 67) HA32, 68) AC29, 69) OH29, 70) m-OHAC26, 71) HA33, 72) AC30, 73) OH30, 74) HA34, 75) AC31, 76) OH31, 77) m-OHAC28, 78) HA35, 79) AC32, 80) OH32, 81) m-OHAC30.

de massas dos ácidos iso e anteiso pentadecanóico na forma de ésteres podem ser vistos no apêndice, Figuras 1 e 2, respectivamente. A constatação desses ácidos nas amostras indicam a presença de bactérias, uma vez que estes são constituintes de sua parede celular (Tissot & Welte, 1984; Cranwell *et al*, 1987; Killops & Killops, 1993). Os ácidos iso e anteiso pentadecanóico também foram identificados na Lagoa do Peri, no trabalho de mestrado desenvolvido por Rodrigues - Neto (1998).

Os  $\omega$ -hidroxiácidos também foram identificados, e sua detecção foi realizada a partir da comparação dos espectros fornecidos com os apresentados na literatura, além da visualização dos fragmentos característicos  $m/z$  75 ( $(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}^+$ ),  $m/z$  146 ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{SiO}_2^+$ ),  $M^+ - 15$  e  $M^+ - 47$ , oferecido pelos  $\omega$ -hidroxiácidos metilados e silanizados (Eglinton *et al*, 1968). Estes tipos de compostos apareceram sem distinção em todas as três localidades, nas quais citam-se os compostos com 16, 22, 24, 26, 28, 30 átomos de carbono. O espectro de massas do composto  $\omega$ -hidroxihexacosanóico, silanizado e metilado, pode ser visto no apêndice, Figura 3. Os hidroxiácidos com um número superior a 20 átomos de carbono são originários de plantas superiores, especificamente de camadas protetoras como a cutina e a suberina. Já os hidroxiácidos com um número menor que 20 átomos de carbono, no caso o  $\omega$ -hidroxihexadecanóico, pode tanto ser de origem bacteriana como de plantas superiores (Killops & Killops, 1993).

Também foi possível identificar outros derivados de plantas superiores nos locais estudados, sendo estes os derivados da lignina. Detectou-se a presença do composto 1-fenil metanol em todas as amostras (RC, RI, I, BL, BF). A presença de compostos fenólicos também foi observadas na amostra BL, sendo eles o p-metil fenol e o m-metil fenol. A presença do ácido ferúlico, um dos derivados da oxidação alcalina

com cobre do coniferil (derivado da lignina) (Killops & Killops, 1993), pôde ser detectado nas amostras, todas oriundas de manguezais (RC, RI, I, BF). O espectro de massas desse composto encontra-se no apêndice Figura 4.

### ***5.3.3 Fracionamento dos lipídios, amostra BL (Lagoa do Saguçu)***

Como mencionado anteriormente a amostra BL foi separada em três frações distintas F1, F2 e F3, contento cada fração uma diferente classe de compostos.

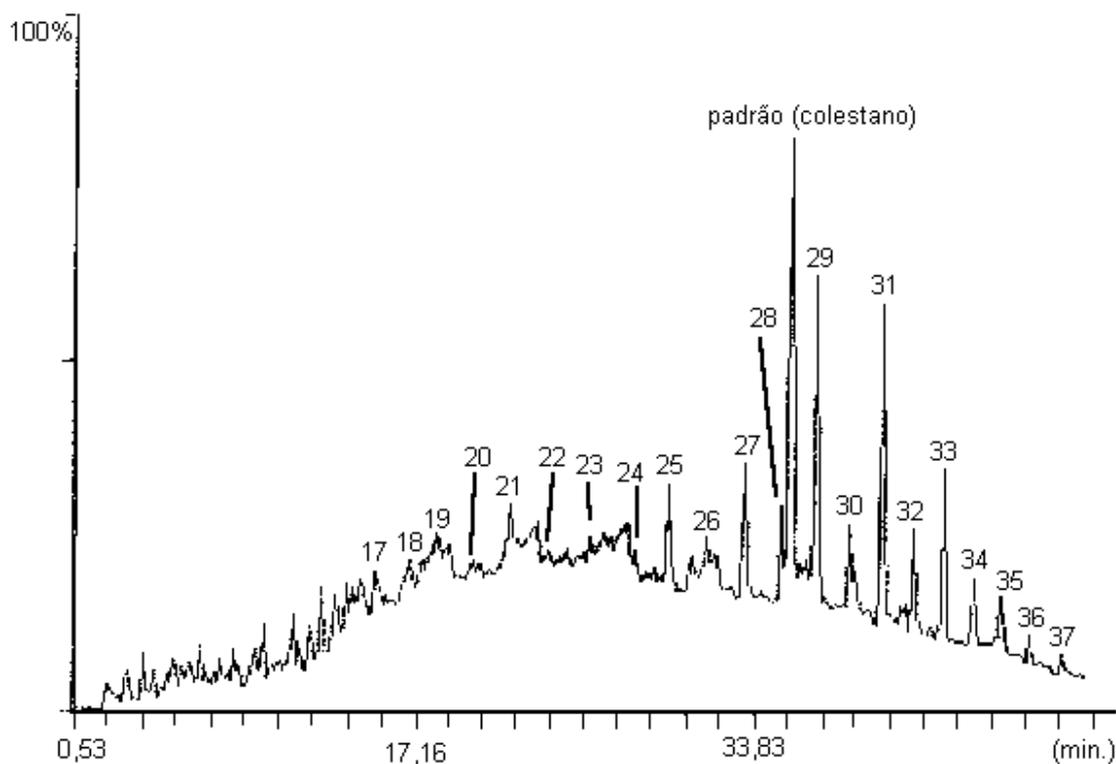
#### ***i) Fração F1***

eluente: hexano;

volume utilizado: 16 mL.

Nesta fração foi detectado a presença de compostos hidrocarbonetos alifáticos, além de importantes isoprenóides como o fitano, pristano e nor - pristano, largamente utilizados por vários laboratórios em análises de óleos, e outros biomarcadores do tipo hopanóides. A Figura 5.5 mostra o cromatograma obtido para F1, no qual percebe-se claramente a presença dos hidrocarbonetos alifáticos entre 25 e 37 átomos de carbono.

O estudo geoquímico, com relação aos índices IPC e RTA para os hidrocarbonetos alifáticos nessa fração, confirmam os dados discutidos na seção 5.3.1. O índice de  $IPC_{HAs}$  foi igual a 3,4 para a amostra fracionada, sendo neste caso maior do que o encontrado no  $IPC_{HAs}$  da análise dos lipídios totais (2,8). Isto é esperado uma vez que os compostos de menores concentração (número par átomos de carbono para os HAs) na análise dos lipídios totais tende a apresentar um maior efeito de matriz, no caso a coeluição com outros compostos, o que acrescentaria um ganho no cálculo de suas áreas.

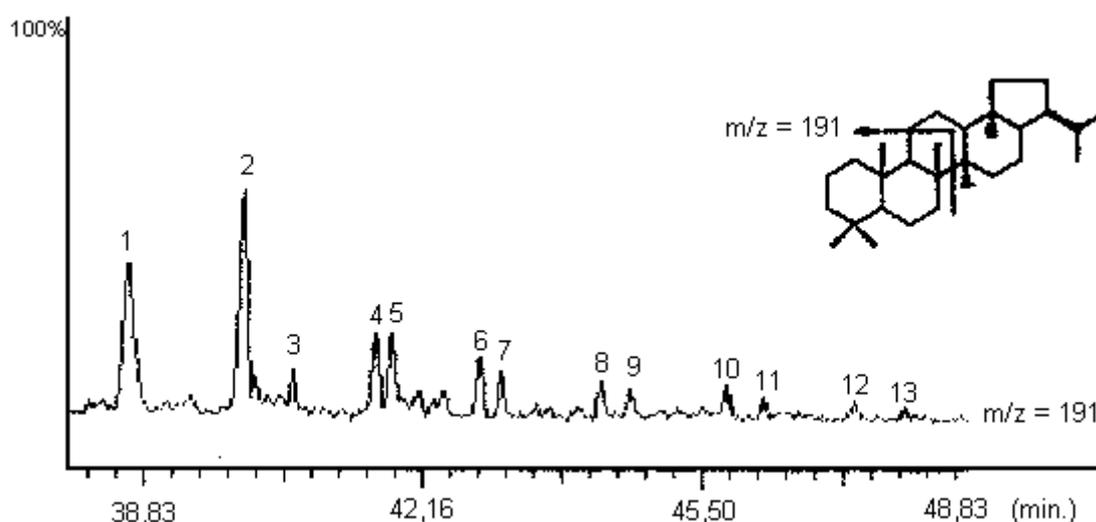


**Figura 5.5 - Cromatograma da Fração F1, amostra BL. Condições cromatográficas conforme descrito na Tabela 4.4. O cromatograma apresenta predominantemente a presença dos compostos hidrocarbonetos alifáticos entre 25 e 37 átomos de carbono. Os números acima dos picos indicam o número de átomos de carbono no composto.**

O índice  $RTA_{HAs}$  não foi possível de ser calculado na análise dos lipídios totais devido a presença dos ácidos carboxílicos de cadeia curta entre 15 e 18 átomos de carbono, os quais sobrepuseram os HAs de cadeia curta. Com o fracionamento foi possível calcular o  $RTA_{HAs}$  devido a ausência dos ácidos carboxílicos, e o seu valor foi de 7,88. Tal valor indica que a origem da matéria orgânica é terrestre, uma vez que os HAs,  $C_{27}$ ,  $C_{29}$  e  $C_{31}$  são originário de plantas superiores, enquanto que os HAs de cadeia curta,  $C_{15}$ ,  $C_{17}$  e  $C_{19}$ , indicam a contribuição de algas (Bourbonniere & Meyers, 1996).

O RTA<sub>AC</sub> para essa amostra (BL) (Tabela 5.4) mostra a contribuição de algas contrastando com o RTA<sub>HAS</sub>, resultado mencionado acima, que apresenta a contribuição de plantas superiores. Este resultado foi observado também em sedimentos superficiais do lago Huron por Meyers e colaboradores (1980), onde ácidos carboxílicos de cadeia curta indicam a presença de algas e os HAS são majoritariamente de origem terrestre.

Na amostra F1 foram detectados compostos biomarcadores do tipo hopanóides (triterpenos), que foram identificados a partir do seu pico característico  $m/z$  191 e pela ordem de eluição apresentada no seu fragmentograma  $m/z$  191 (Figura 5.6)(Wang *et al*, 1994b).



**Figura 5.6 - Distribuição dos triterpenos (fragmentograma  $m/z$  191) na amostra BL, o qual é característico de hopanóides. Os números grafados sobre os picos são referentes a Tabela 5.5.**

A presença de compostos da série de hopanóides  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)$  e  $17\beta(H)$ ,  $21\alpha(H)$ , em sedimentos recentes pode ser um indicativo de contaminação por combustível fóssil. A confirmação deste tipo de contaminação é reforçada pela presença dos epímeros 22S e 22R dos hopanóides com 31 a 35 átomos de carbono (Madureira,

1994 e suas ref.). Os resultados apresentados para a amostra BL levam à evidência da contaminação por combustível fóssil, pois a identificação dos hopanóides entre 28 e 35 átomos de carbono foi comprovada. O espectro de massas de um dos hopanóides, o 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-norhopano, pode ser visto na Figura 5 do apêndice.

**Tabela 5.5 - Biomarcadores do tipo hopanóide identificados na fração F1, Baía da Babitonga, Lagoa do Saguçu (BL)**

pico	composto	fórmula	MM
1	17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-norhopano	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub>	398
2	17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-hopano	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub>	412
3	17 $\beta$ (H),21 $\alpha$ (H)-30-hopano	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub>	412
4	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-homohopano	C <sub>31</sub> H <sub>54</sub>	426
5	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-homohopano	C <sub>31</sub> H <sub>54</sub>	426
6	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31-bishomohopano	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub>	440
7	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31-bishomohopano	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub>	440
8	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32-trishomohopano	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub>	454
9	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32-trishomohopano	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub>	454
10	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32,33-tetraquis-homohopano	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub>	468
11	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32,33-tetraquis-homohopano	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub>	468
12	22S-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32,33,34-pentaquis-homohopano	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub>	482
13	22R-17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30,31,32,33,34-pentaquis-homohopano	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub>	482

**ii) Fração F2**

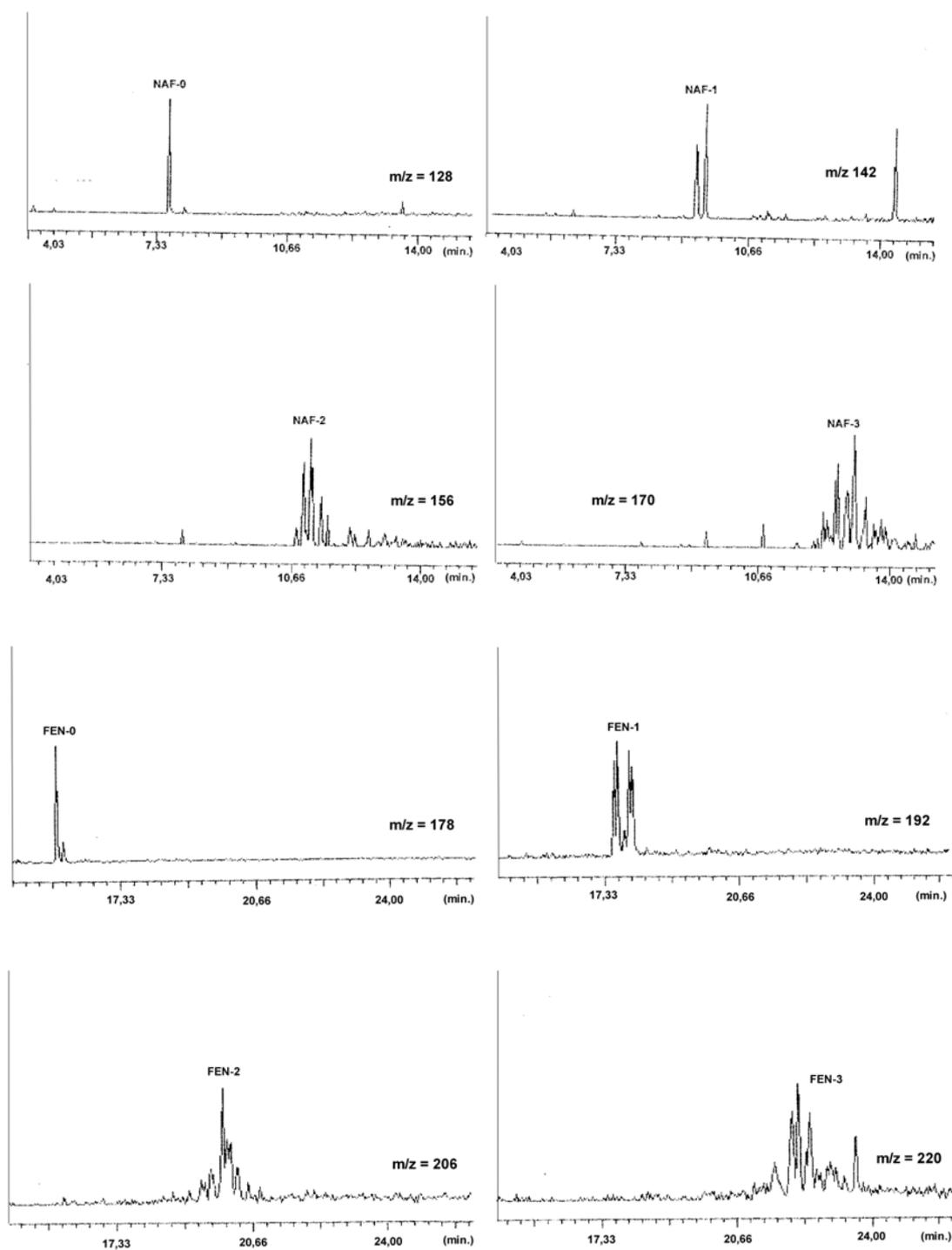
eluente: DCM;

volume utilizado: 20 mL.

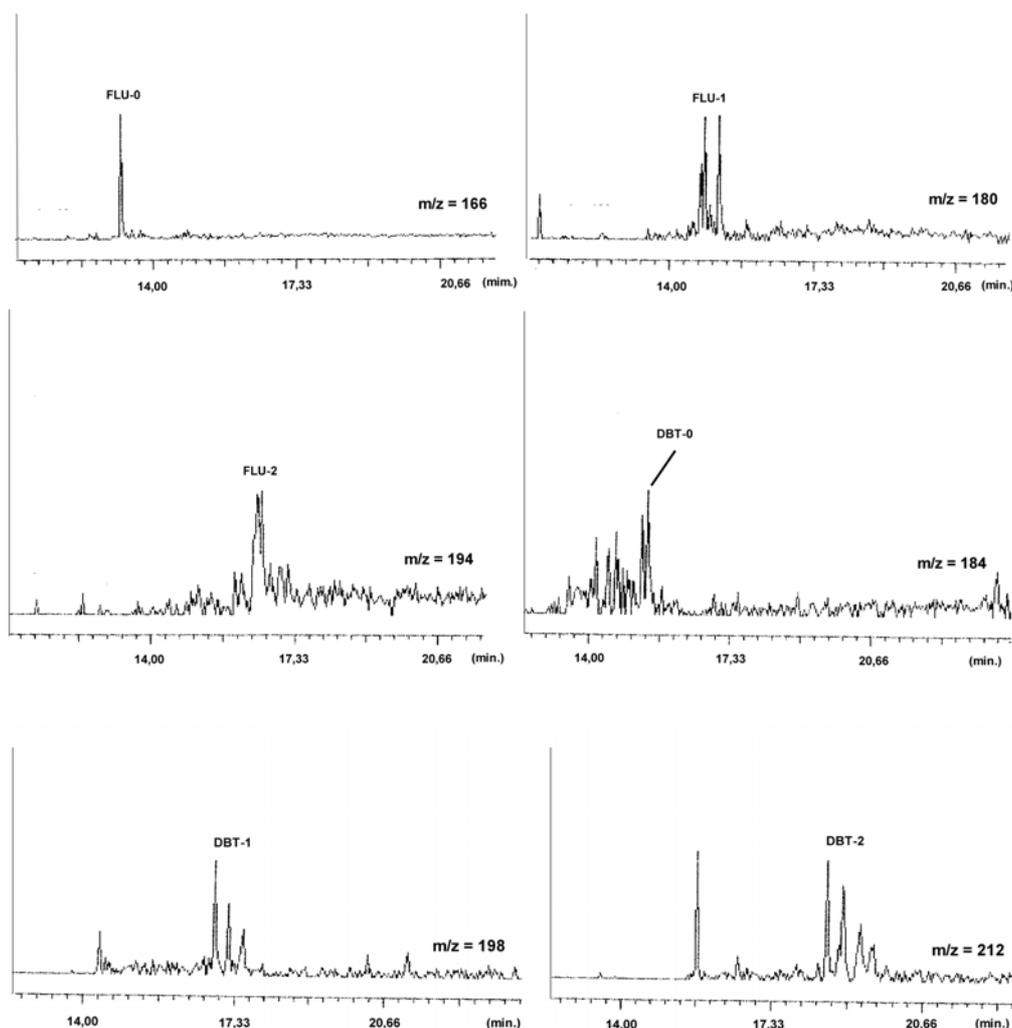
Na segunda fração, definida como a fração dos policíclicos aromáticos, os aldeídos foram identificados como componentes majoritários. A identificação desse grupo foi feita a partir da comparação dos espectros obtidos com os encontrados na literatura. A identificação singular dos aldeídos não foi possível devido a falta de padrões, e da não detecção do íon molecular destes, isto devido aos ruídos naturais do aparelho, ou ainda a complexidade da matriz ambiental. A presença dos aldeídos é justificável uma vez que este é um intermediário na síntese dos álcoois a partir dos ácidos carboxílicos originados nos tecidos epicuticulares de plantas superiores, ver seção 1.4 da introdução.

A presença de outros compostos como os ftalatos também foi observada nesta fração, a origem destes ainda é duvidosa, uma vez que podem ser contaminantes do meio ambiente com origem em plastificantes, ou originários do próprio processo de análise, através do contato acidental com substâncias plastificantes como as tampas dos tubos de ensaios ou no rota vaporizador.

A identificação dos HPAs foi realizada a partir de seus íons moleculares ( $M^+$ ). Na amostra BL verificou-se os seguintes compostos aromáticos: naftaleno (NAF) e seus homólogos alquilados mono e di e tri; dibenzotiofeno (DBT) e seus homólogos mono e di-alquilados; fentantreno (FEN) e seus homólogos alquilados; fluoreno (FLU) e seus homólogos alquilados (Figura 5.7a e b). Foram identificados também compostos como o antraceno, o pireno, o fluoretano, o bifenil e o 3-metil bifenil. A região do cromatograma onde os HPAs foram detectados e os espectros de massas de alguns destes podem serem vistos nas Figuras 6, 7, 8 e 9 do apêndice.



**Figura 5.7 - Fragmentogramas com os homólogos alquilados do NAF e FEN, encontrados na amostra BL. A identificação foi realizada a partir dos seus íons moleculares ( $M^+$ ), onde os números 0, 1, 2 e 3 indicam o número de metilas ligadas aos HPAs.**



**Figura 5.8 - Fragmentogramas com os homólogos alquilados do FLU e DBT, encontrados na amostra BL. A identificação foi realizada a partir dos seus íons moleculares ( $M^+$ ), onde os números 0, 1 e 2 indicam o número de metilas ligadas aos HPAs.**

A distribuição dos HPAs nos sedimentos superficiais da Lagoa do Saguçu é um forte indicativo da contaminação por combustíveis fósseis, como petróleo e seus derivados. Entretanto a origem dos HPAs em sedimentos recentes também pode ser atribuída à combustão incompleta da matéria orgânica, como madeira e combustíveis fósseis. Os HPAs espalharam-se pelo mundo após a revolução industrial e em

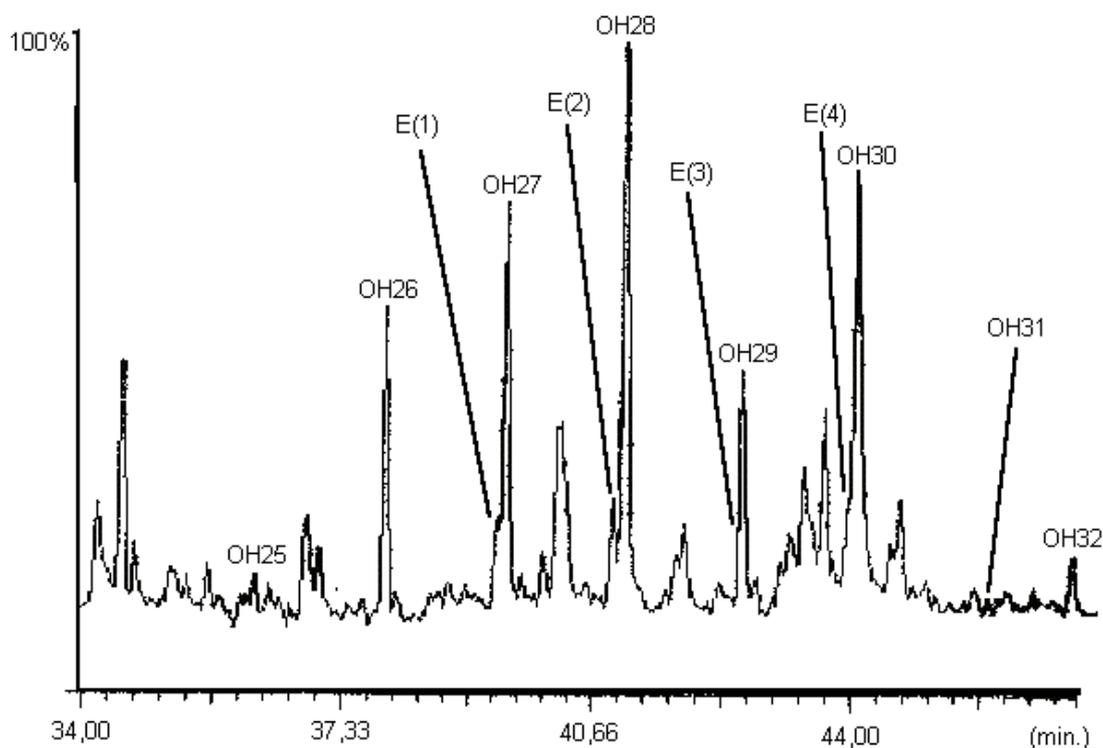
conseqüência disso estes podem demonstrar a influência antropogênica no meio (Killops & Killops, 1993). Um estudo realizado em amostras de sedimentos da lagoa de Veneza, Itália procurou distinguir os HPAs originários da combustão biogênica e, ou antropogênica dos provenientes de outras fontes, sendo que a predominância dos homólogos não substituídos pode sugerir a combustão como fonte predominante (Pavoni *et al*, 1987). Portanto a identificação dos homólogos alquilados no sedimento superficial da Lagoa do Saguau indica a contaminação por combustível fóssil.

### ***iii) Fração F3***

eluente: acetato de etila/metanol (3:1)

volume utilizado: 20 mL.

O estudo da terceira fração neste trabalho teve como primícia básica, a extensão do método descrito para as análises dos HAs e HPAs, e a sua possível aplicação em trabalhos futuros. Como visto anteriormente, no estudo dos lipídios totais, a visualização mais detalhada das amostras ambientais pode apresentar-se como um problema na avaliação da matéria orgânica, principalmente nas análises de compostos em concentração menores. Com o intuito de separar os compostos hidroxilados como álcoois e esteróis dos ácidos e dos hidrocarbonetos (F1), aldeídos, ésteres e HPAs (F2), realizou-se a eluição dessa terceira fração. A Figura 5.8 mostra do cromatograma com a eluição desses compostos, podendo-se visualizar a presença tanto dos álcoois como dos esteróis e estanóis detectados.



**Figura 5.9 - Ampliação do cromatograma da Fração F3, amostra BL. Tempo de retenção entre 34 e 47 min. Condições cromatográficas conforme descrito na Tabela 4.4. Esta faixa do cromatograma apresenta os álcoois (OH) entre 24 e 32 átomos de carbono, e alguns esteróis, nomeados na Tabela 5.6.**

Na fração F3 detectou-se, além dos álcoois entre 15 e 32 átomos de carbono e esteróis, a presença dos derivados fenólicos da lignina, como o p-hidroxifenil-metanol (Figura 10, apêndice) discutidos previamente na seção 5.3.2. Os esteróis identificados nessa fração não foram identificados no extrato total da Lagoa do Saguçu, isto provavelmente devido a sua baixa concentração. Mesmo nessa fração os esteróis e, ou estanois apareceram coeluídos com os álcoois 27, 28, 29, e 30.

O que se pode afirmar a respeito destes esteróis ou estanois identificados nesta fração é a certeza de sua eluição na fração F3. A caracterização destes compostos é dificultada devido ao problema da coeluição com os álcoois, o que interfere na

segurança de sua identificação. Comparando dados oferecidos pela literatura (Walker *et al*, 1982; Smith *et al*, 1983), com os espectros encontrados para os compostos identificados no cromatograma acima pode-se verificar os resultados apresentados na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6 - Esteróis identificados na fração F3, amostra baía da Babitonga, Lagoa do Saguçu (BL)**

<b>Esterol</b>	<b>MW</b>	<b>Fragmentos característicos<sup>a</sup></b>
<b>E(1) 5-<math>\beta</math>-colestano-3<math>\beta</math>-ol (coprostanol)</b>	460	371, 355, 215
<b>E(2) 5-colesteno-3<math>\beta</math>-ol (colesterol)</b>	458	458(M <sup>+</sup> ), 368, 353, 329, 129
<b>E(3) 24-etil-5-<math>\beta</math>-colestano-3<math>\beta</math>-ol</b>	488	431, 398, 385, 215
<b>E(4) 24-etil-5-colesteno-3<math>\beta</math>-ol</b>	486	486(M <sup>+</sup> ), 471, 396, 357, 357, 129

a: Fragmentos característicos desses esteróis silanizados.

Em muitos ambientes aquáticos, incluindo sedimento e coluna da água, a constatação de esteróis é evidenciada, tendo como os mais comuns o colesterol e seus derivados como o  $\beta$ -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol, originários de plantas superiores, onde o coprostanol não é identificado. A presença do coprostanol no meio ambiente foi evidenciada por Loehr e Higgins em efluentes domésticos, e subseqüentemente por outros pesquisadores em águas contaminadas (Walker *et al*, 1982 e suas ref.). O uso do coprostanol como bioindicador de poluição fecal tem sido extensivamente estudado (Walker *et al*, 1982). A identificação deste composto, o coprostanol (Figura 11, apêndice) na Baía da Babitonga, mais especificamente na Lagoa do Saguçu, pode ser um forte indicativo da contaminação fecal destas águas. Isto não seria nada espantoso uma vez que a lagoa recebe diariamente uma grande quantidade de efluentes domésticos.

## 6. CONCLUSÃO

O fracionamento dos padrões HAs e HPAs em uma micro coluna cromatográfica de vidro, com adsorventes sílica e alumina (1:1), mostrou-se eficiente para os HPAs de igual e superior a três anéis aromáticos, pois a eluição do naftaleno e seus derivados (observados na análise do óleo diesel) foi evidenciada na fração F1 (eluente hexano) e na fração F2 (eluente DCM).

No fracionamento dos padrões estudados obteve-se uma separação quantitativa dos padrões C<sub>21</sub> e PIR, já que estes, assim como os compostos utilizados como padrões internos (C<sub>25</sub> para a fração F1 e Cri para a F2) foram identificados em suas respectivas frações (F1 - HAs e F2 - HPAs). A recuperação dos padrões C<sub>21</sub> e PIR no fracionamento foi de 94,9 e 82,0 %, respectivamente. Faz-se uma ressalva para o caso do naftaleno, este além de ser identificado em ambas frações F1 e F2, apresentou uma baixa recuperação em relação aos demais, 20 % (somente na etapa de fracionamento). A sua baixa recuperação deve-se as etapas de concentração. Portanto, essas etapas devem ser realizados com extremo cuidado. Por exemplo, o banho do rota vaporizador não deve ser aquecido e o fluxo de nitrogênio deve ser o mais brando possível.

Na avaliação total do método proposto para o fracionamento das amostras, observou-se uma perda gradativa ao longo do processo, este que contava com três etapas distintas (liofilização, extração e fracionamento). Sendo os valores de recuperação final (LEF) para os padrões C<sub>21</sub>, NAF e PIR iguais a 68,7, 3,5 e 59,1 %, respectivamente.

A perda dos compostos em cada etapa é distinta para cada composto: observa-se por exemplo, que a perda maior para o C<sub>21</sub> é na etapa de extração (15,2 %), para o PIR existe uma equidade na perda entre as etapas de extração e fracionamento ( $\approx 20\%$ ), já para o NAF a etapa determinante é a da liofilização, no qual a perda foi de 80,4 %.

Os biomarcadores presentes nos sedimentos dos locais estudados mostram tanta a influência aquática como terrestre. Os IPCs para os ácidos carboxílicos (em todos os locais) mostram a contribuição da matéria orgânica de origem terrestre (valores todos acima de 4,0). O mesmo ocorre para os IPCs dos hidrocarbonetos, com exceção da Lagoa do Saguçu, onde a baixo valor (2,8), quando comparado com os demais, aponta para uma contaminação por combustível fóssil. Já os RTAs para os ácidos mostram uma contribuição predominantemente aquática.

O tratamento prévio da amostra (fracionamento) antes da análise por CG-EM foi útil para a diminuição de interferências como efeito de matriz, além do que o fracionamento do extrato total mostrou-se imprescindível para a análise dos biomarcadores em menor concentração, uma vez que a identificação desses componentes é dificultada pela presença dos ácidos carboxílicos.

Na amostra fracionada (Lagoa do Saguçu - BL) identificou-se os biomarcadores do tipo hopanoídes na fração F1 e os compostos HPAs na fração F2, indicando assim uma contaminação por combustível fóssil. Nos demais pontos de coleta estas características não foram verificadas nos extratos totais.

Com respeito a contaminação por efluentes doméstico, esta é sugerida na amostra da Lagoa do Saguçu devido a presença do bioindicador fecal coprostanol na fração F3, entretanto, a sua confirmação requer um estudo aprofundado, como por exemplo a determinação das razões  $5\alpha:5\beta$  - estanois proposta por Grimalt e colaboradores. Quanto aos demais pontos nada se pode afirmar conclusivamente uma vez que o fracionamento não foi realizado.

**REFERÊNCIAS CITADAS**

ACEVES, M.; GRIMALT, J.; ALBAIGÉS, J.; BROTO; COMELLAS , L.; & GASSIOT, M.. (1988). **Analysis of hydrocarbons in aquatic sediments, II Evaluation of common preparative for petroleum and chlorinated hydrocarbons.** Journal of Chromatography, V.436, p 503 - 509.

ANDERSON, J. W.; NEFF, J. M. & BOEHM, P. D.. (1986). **Sources of fates and effects of aromatic hydrocarbons in the Alaska marine environmenteith recommendations for monitoring strategies.** Sequin, Washington, Battelle Pacific Northwest Laboratories, p 230 (Report N. Epa/600/3 - 86 - 018).

BAEK, S. O.; FIELD,R. A.; GOLDSTONE, M.E.; KIRK,P.W.; LESTER; J.N. & PERRY, R.. (1991). **A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons, fate and behavior.** Water Air Soil Pollut, 60, p 279 - 300.

BOURBONNIERE, R. A. & MEYERS, P. A.. (1996). **Sedimentary geolipid records of historical changes in the watersheds and productivities of Lakes Ontario and Erie.** Limnology Oceanographic. 4 (2), p 352 - 359.

CINTRÓN, G.; SHAEFFER - NOVELLI, Y.. (1983). **Introducion a la ecologia del manglar.** UNESCO/ROSTLAC, Uruguay, p 109.

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

CRANWELL, P. A; EGLINTON, G. & ROBINSON, N.. (1987). **Lipids of aquatic organism as potential contributor to lacustrine sediments - II**. Org. Geochem., 11, p. 513 - 527.

EGLINTON G.; HUNNEMAN, D. H. & McCORMICK. (1968). **Gas chromatographic - mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids. - III**. Organic Mass Spectrometry, 1, p. 593 - 611.

EPA. (1997). **Gas Chromatography**. Method 8000A, CD - ROOM.

FLORES - VERDUGO, F. J.; FARIAS - GONZÁLES, M.; BLANCO - CORREA; PASTÉN - NUÑES. (1997). **The Teacapan - Agua Brava - Marismas Nacionales mangrove ecosystem on Pacific coast of Mexico**. Mangrove Ecosystem Studies in Latin American and Africa, Edited by Björn Kjerfve, Luiz Drude de Lacerda and El Hadji Salif Diop, p 35 - 46.

GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; BAYINA, J. M. AND ALBAIGÉS, J.. (1990). **Assessment of fecal steroids and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters**. Environmental. Science. & Technology, 24, n. 3, p. 357 - 363.

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

HÜHNERFUSS, H. & KALLENBORN, R.. (1992). **Chromatographic separation of marine organic pollutants.** Journal of Chromatography, 580, p 191- 214.

IBAMA. (1998).. **Proteção e Controle de Ecossistemas Costeiros - MANGUEZAL DA BAÍA DA BABITONGA.** Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca 25, Editado pelo IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, p 145.

INTERNATION PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. (1998). **Select Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** World Health Organization Geneva, p 883.

INTERNET. (1998). <http://www.main.com/~pra/webhand.htm>. Capturado em 21 de agosto de 1998.

KILLOPS, S. D.; KILLOPS, V. J.. (1993). **An Introduction to Organic Geochemistry.** Longman Scientific & Technical. New York, p 263.

KUENZLER, E. J.. (1974). **Mangrove Swamps Systems.** Coastal Ecological Systems of the United States, The Conservation Foundation, B. J. Copeland, Edited by B. J. Copeland and E. A. MacMahon, V 1, p 346 - 372.

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D.. (1993). **Mangroves of Brazil. Conservation and sustainable utilization of forest in Latin America And Africa regions. Part 1 - Latin America.** Edited by Lacerda, L. D. ITTO/International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, p 245 - 272.

LACERDA, L. D.. (1993). **Conservation and sustainable utilization of mangrove forest in Latin America and Africa Regions.** Part 1 - Latin America, ISME Technical Report 2, p 1 - 272.

LACERDA, L. SCHEFFER - NOVELLI, Y.. (1992). **Mangrove of Latin America: the need for conservation and sustainable utilization.** ISME Newsletter 5, p 4 - 6.

LAMPARELLI, C. C.; RODRIGUES, F. O. MOURA, D. O.. (1997). **Long - term of an oil spill in a mangrove forest in São Paulo, Brazil.** Mangrove Ecosystem Studies in Latin American and Africa, Edited by Björn Kjerfve, Luiz Drude de Lacerda and El Hadji Salif Diop, p 191 - 203.

LUGO, A.; & SNEDAKER, S.. (1974). **The ecology of mangroves.** Ann. Rev. Ecol. and Syst., V 5, p 39 - 64.

MADUREIRA, L. A. S.. (1994). **Lipids in recent sediment of the eastern north Atlantic.** Tese de Doutorado em Filosofia apresentada a Escola de Química da Universidade de Bristol, Unidade de Geoquímica Orgânica, Inglaterra, RU.

MADUREIRA, L. A. S.; CONTE, M.H. & EGLITON, G. (1995). **Early diagenesis of lipid biomarker compounds in North Atlantic sediment.** *Paleoceanography*, V. 10., p 627 - 642.

NOAA, TECHNICAL MEMORANDUM NOS ORCA 71. (1993). **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.

PANITZ, C. M. N.. (1997). **Ecological description of Itacorubi mangroves, Ilha de Santa Catarina, Brazil.** *Mangrove Ecosystem Studies in Latin American and Africa*, Edited by Björn Kjerfve, Luiz Drude de Lacerda and El Hadji Salif Diop, p 204 - 223.

PAVONI, B.; SFRISO, A. & MARCOMINI, A.. (1987) **Concentration and flux profiles of PCBs, DDTs and PAHs in a dated sediment core from the Lagoon of Venice.** *Marine Chemistry*, 21, p 25 - 35.

- PORTE, C.; BARCELÓ, D.; TAVARES, T. M.; ROCHA, V. C. E ALBAIGÉS. (1990). **The use of mussel watch and molecular marker concepts in studies of hydrocarbons in a tropical bay (Todos os Santos, Bahia, Brazil).** Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19, p 263 - 274.
- RODRIGUES - NETO, R.. (1998). **Determinação de Feopigmentos, Proteínas e Lipídios em Sedimento da lagoa de Peri, Ilha de Santa Catarina - SC.** Tese de Mestrado em Química, Departamento de Química - UFSC.
- SCHIMPER, A. (1903). **Plant Geography on a Physical Basis.** Oxford, p 839.
- SHULZ - BULL, D. E.; PETRICK, G.; BRUHN, R.; DUINKER, J. C.. (1998). **Cholorobiphenyls (PCB) and PHAs in water masses of northen North Atlantic.** Marine Chemistry, 61, p 101 - 114.
- SICRE, M. A.; TIAN, R. C. & SALIOT, A.. (1994). **Distribution of sterols in the suspended particles of Chang Jian Estuary and Adjacent East China Sea.** Org. Geochem., 21, p 1 - 10.
- SIERRA DE LEDO, B.; SORIANO - SIERRA, E. J. (1985). **Mangrove swamps and coastal lagoons: uses and stressors.** Proc. 4º Symp. on coastal and ocean management "Coastal zone 85", ASCE, Baltimore, V 1, p1170 - 1178.

SILVA, A. D.. (1990). **Estudo - Geo Estrutural do Manguezal de Ratoes na Ilha de Santa Catarina. Município de Florianópolis, SC.** Tese de Mestrado em Geografia, Departamento de Geo - Ciências - UFSC.

SMITH, D. J.; EGLINTON, G.; MORRIS, R. J.; PUOTANEN, E. L.. (1982) **Aspect of steroid geochemistry of a recent diatomaceous sediments from the Namibian Shelf.** *Oceanologica Acta*, 5, p. 365 - 374.

SORIANO - SIERRA. (1998). **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, p 47 - 78.

SORIANO - SIERRA, E. J.; SILVA, J. R. B. M.; DERNER, R. B.; BRANCO, J. O.. (1998). **Aspectos ecológicos do manguezal de Itacorubi, Santa Catarina, Brasil.** Ecologia e gerenciamento do manguezal de Itacorubi. Editado por Eduardo Soriano - Sierra e Blanca Sierra de Ledo, p 47 - 78.

SOUZA, L. A.. (1991). **O processo de ocupação das áreas de mangues em Joinville: agentes, estratégicas e conflitos.** Dissertação de Mestrado em Geografia, Departamento de Geo - Ciências - UFSC.

SWARTZ, R. C.; FERRARO, S.; LAMBERSON, J.; COLE, F. A.; OZERETICH, R. J.; BOESE, B. L.; SHULTS, D. W. BEHRENFELD, M. & ANKLEY, G. T. (1997).

**Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons compounds in marine sediment.** Environment Toxicology and Chemistry, V 16, p 2151 - 2157.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H.. (1984). **Petroleum Formation and Occurrence.** 2° edition Springer-Verlag, p 699.

WALKER, R. W.; WUN, C. K.; LITSKY, W.. (1982). **Coprostanol as in an indicator of fecal pollution.** CRC - Critical Reviews in Environmental Control, p. 91 - 112.

WANG, Z.; FINGAS, M. & LI, K.. (1994a). **Fraction of Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic and Biomarker Compounds by CG - FID and CG - MS, Part I.** Journal of Chromatographic Science, V. 32, p 361 - 366.

WANG, Z.; FINGAS, M. & LI, K.. (1994b). **Fraction of Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic and Biomarker Compounds by CG - FID and CG - MS, Part II.** Journal of Chromatographic Science, V. 32, p 367 - 382.

WANG, Z.; FINGAS, M. & SERGY, G.. (1994c). **Study of 22 - Year - Old Arrow Oil Samples Using Biomarker Compounds by CG - MS.** Environment Science Technology, V. 28, p 1733 - 1746.

WARNER, J. S.. (1976). **Determination of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine organism.** Analytical Chemistry, 48, p 578 - 583.

## APÊNDICE - FIGURAS

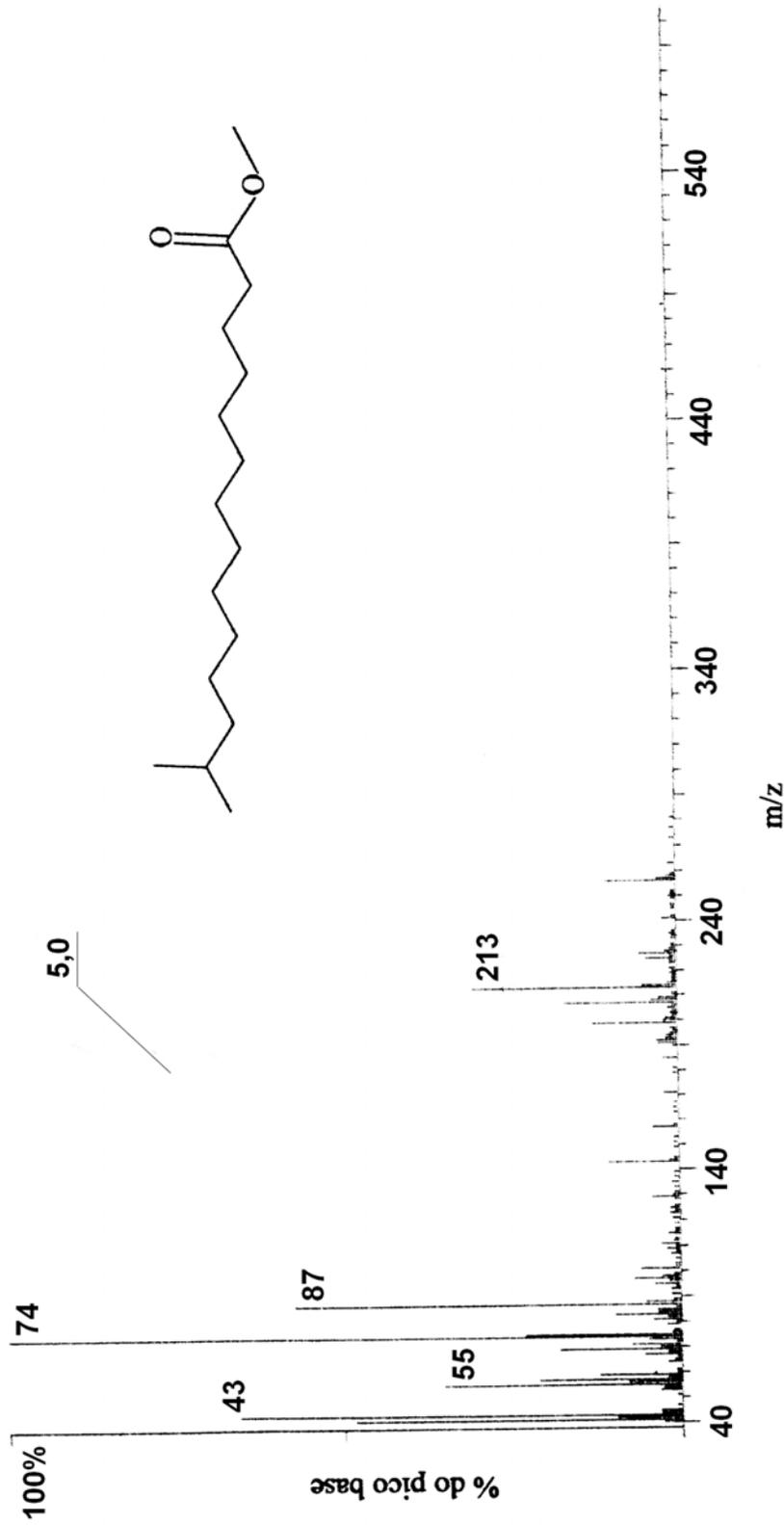


Figura 1 - Espectro de massas do composto ácido iso-pentadecanóico na forma de éster, identificado no extrato total de todos os pontos estudados.

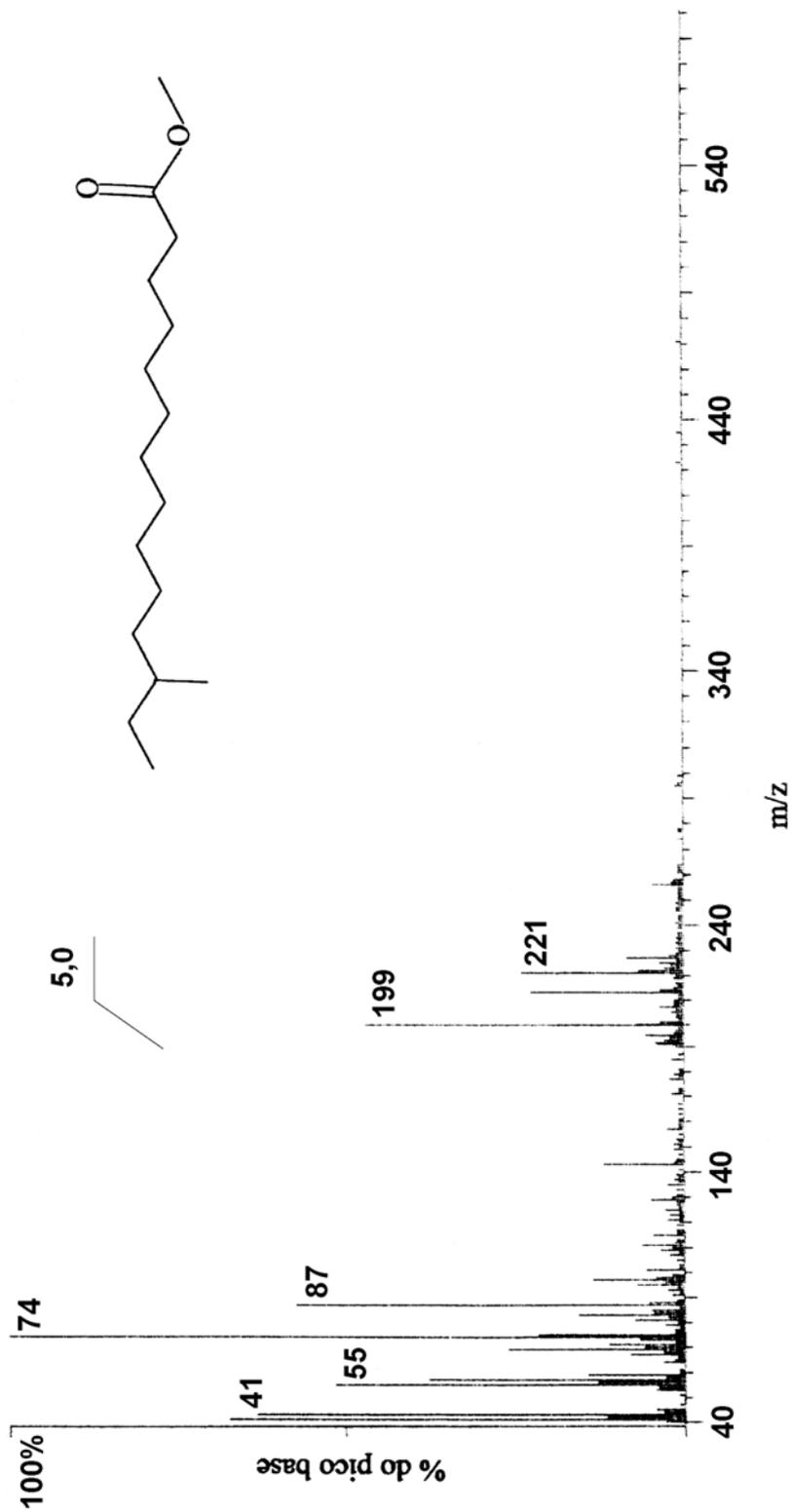


Figura 2 - Espectro de massas do composto ácido anteiso-pentadecanóico na forma de éster, identificado no extrato total de todos os pontos estudados.

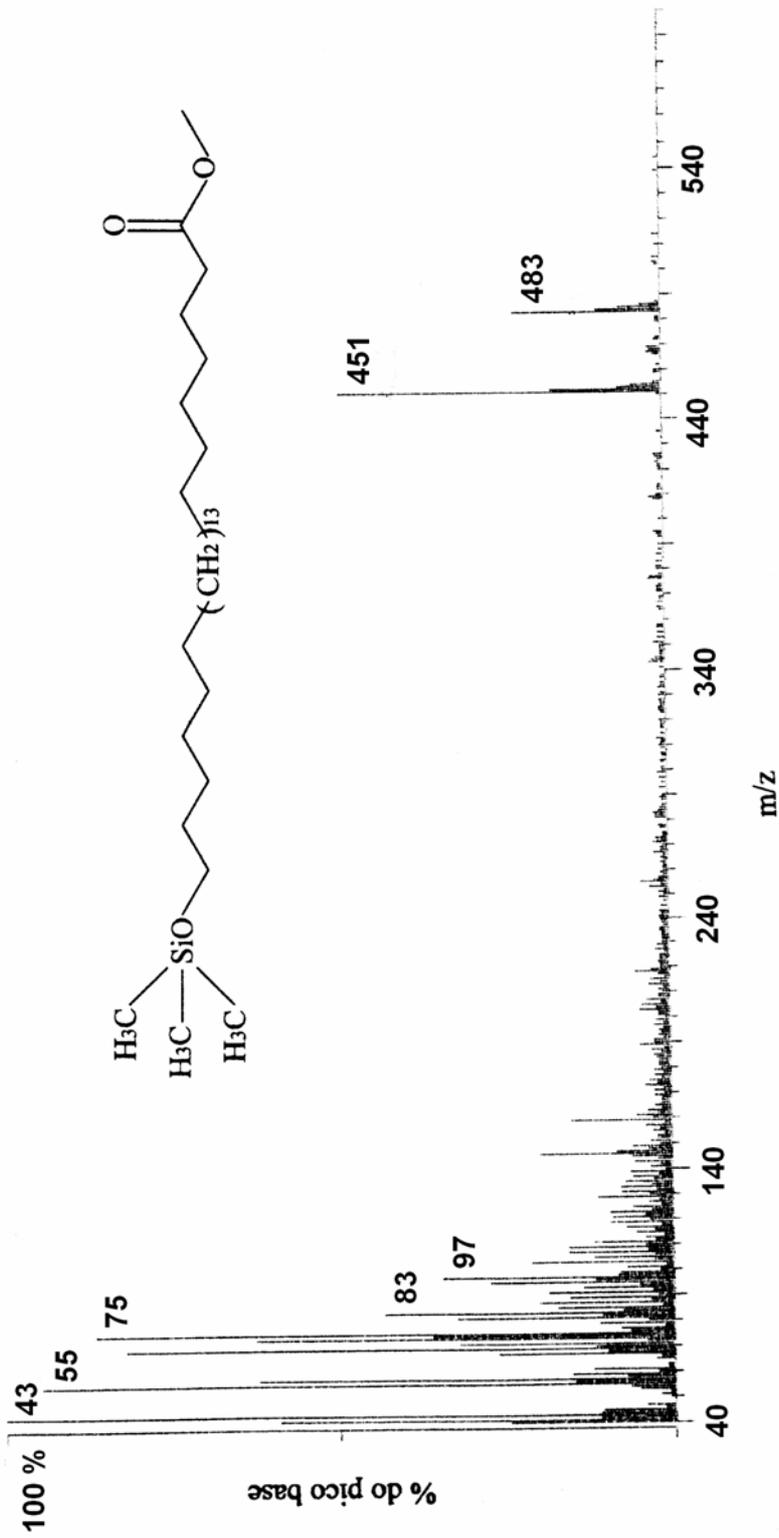


Figura 3 - Espectro de massas do composto  $\omega$ -hidroxihexacosanoico silanizado e metilado, identificado no extrato total de todos os pontos estudados.

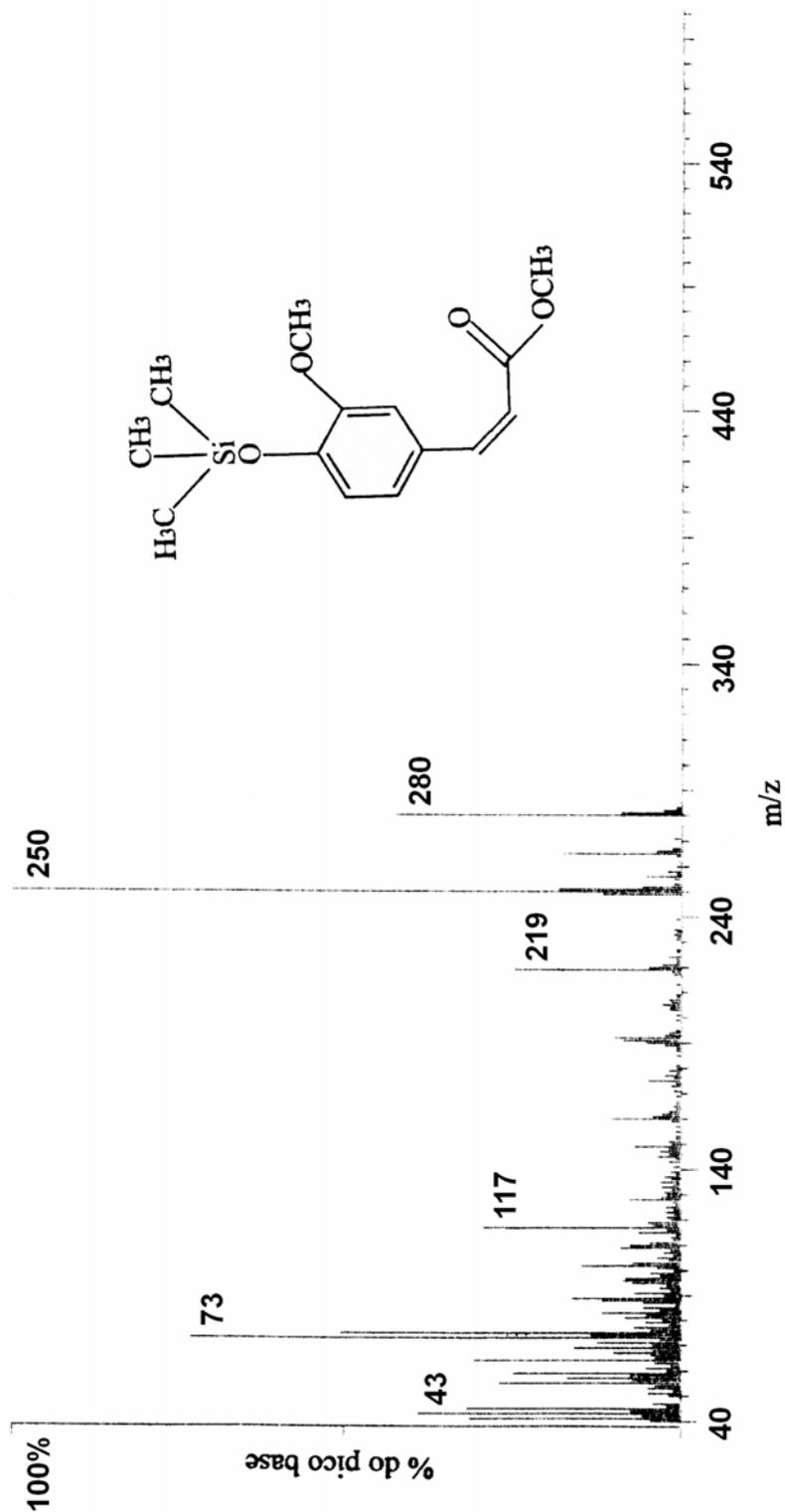


Figura 4 - Espectro de massas do composto ácido ferúlico silanizado e metilado, identificado no extrato total dos pontos estudados, exceto na amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguauçu).



Figura 5 - Espectro de massas do composto 17 $\alpha$ (H),21 $\beta$ (H)-30-norhopano, identificado na fração F1, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguau).

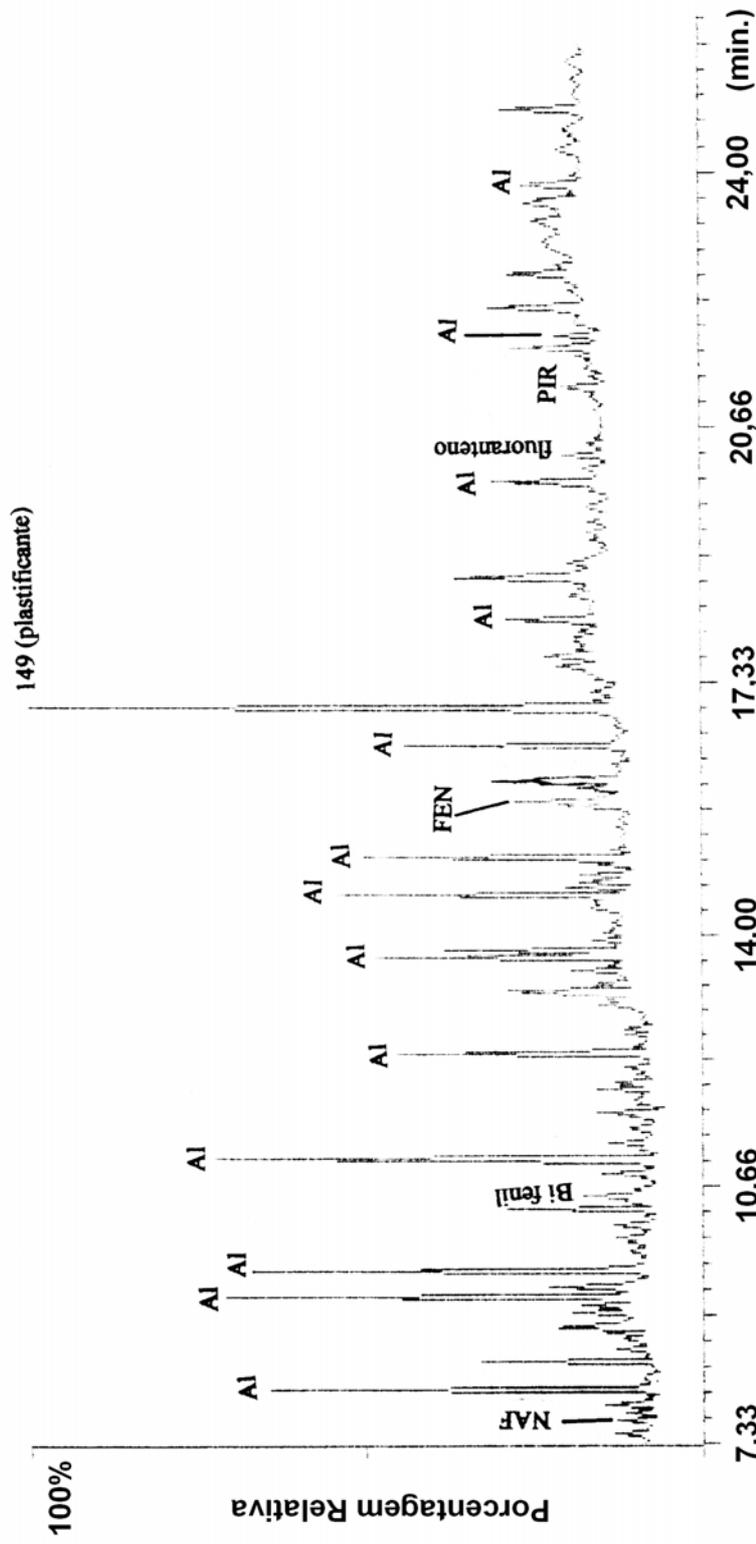


Figura 6 - Ampliação do cromatograma da Fração F2, onde a abreviatura - AI - indica aldeído, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguauçu). Tempo de retenção entre 7 e 27 min. Condições cromatográficas conforme descrito na Tabela 2.4. Nesta região do cromatograma foram identificados os HPAs.

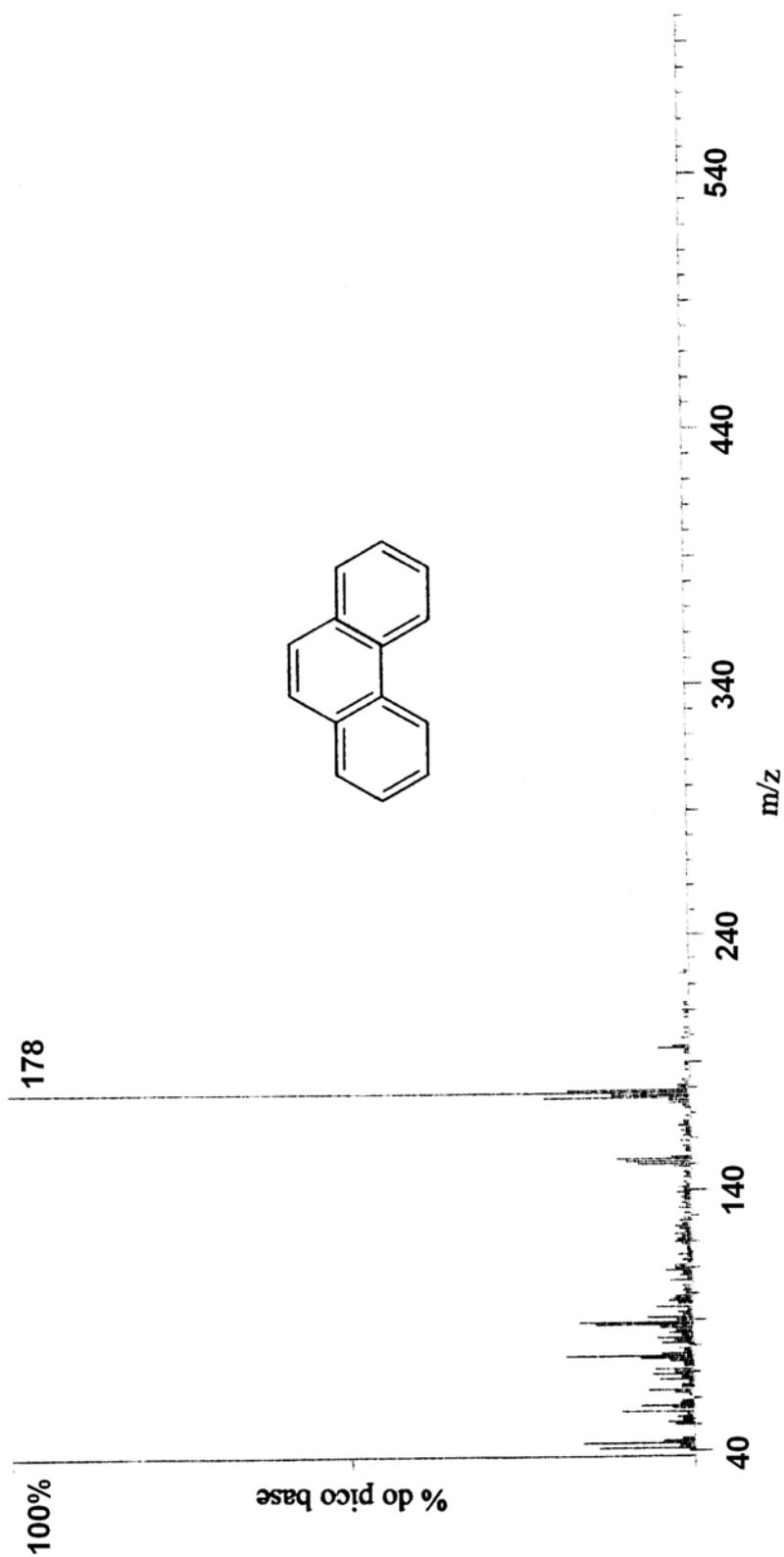


Figura 7 - Espectro de massas do composto fenantreno, identificado na fração F2, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguapé).

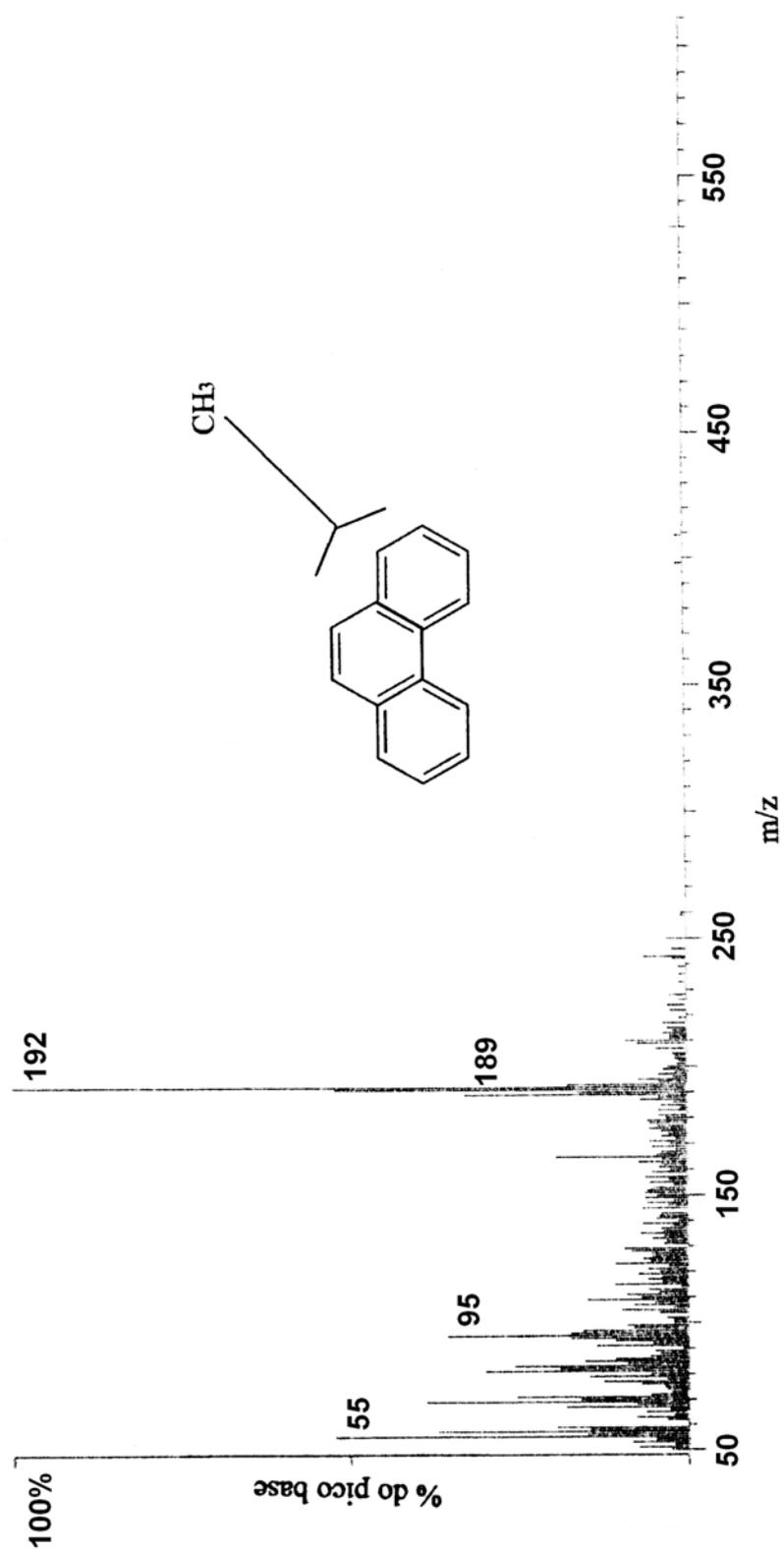


Figura 8 - Espectro de massas do composto homólogo do fenantreno mono - metilado, identificado na fração F2, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguauçu).

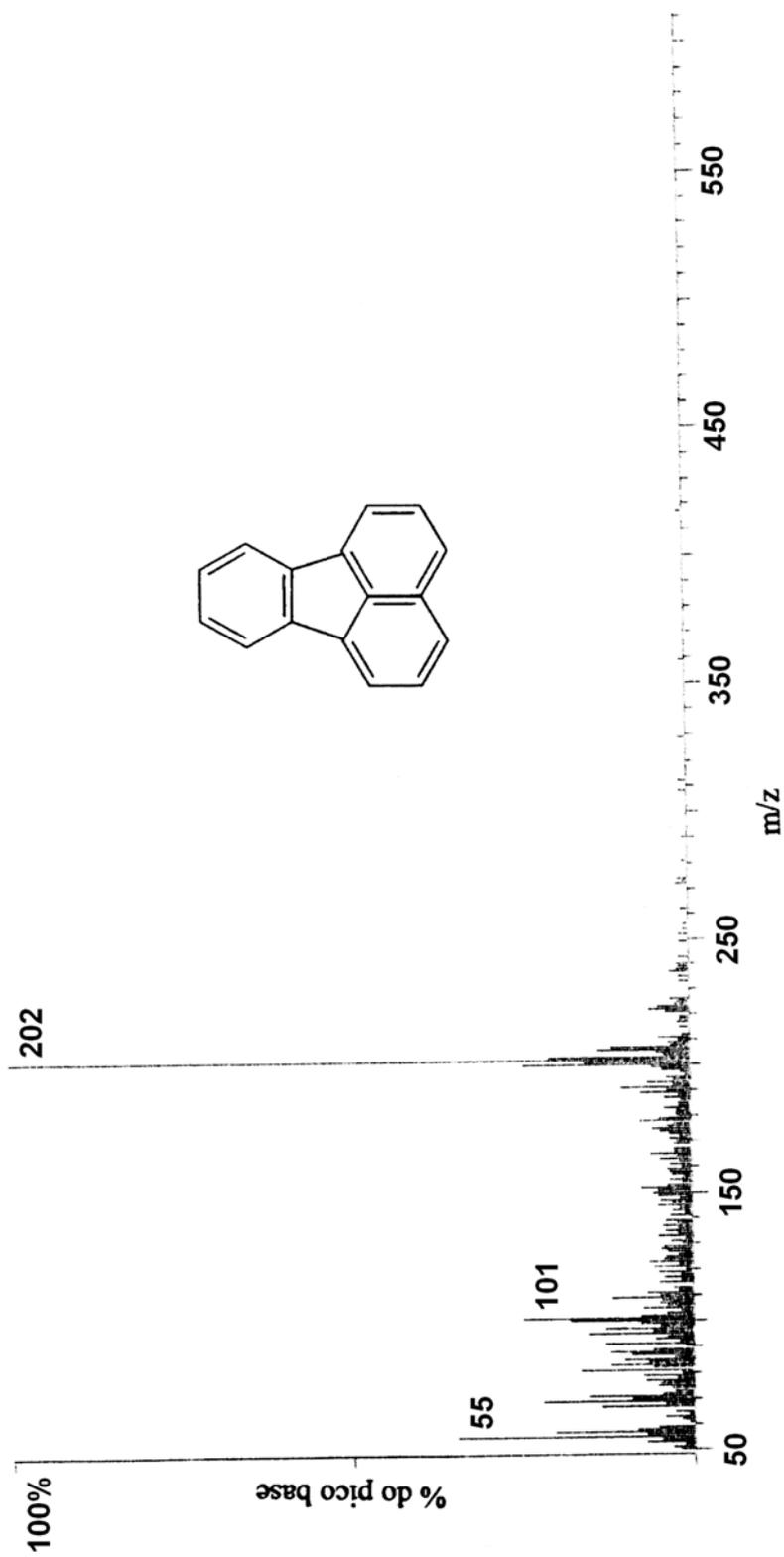


Figura 9 - Espectro de massas do composto fluoranteno, identificado na fração F2, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguauçu).

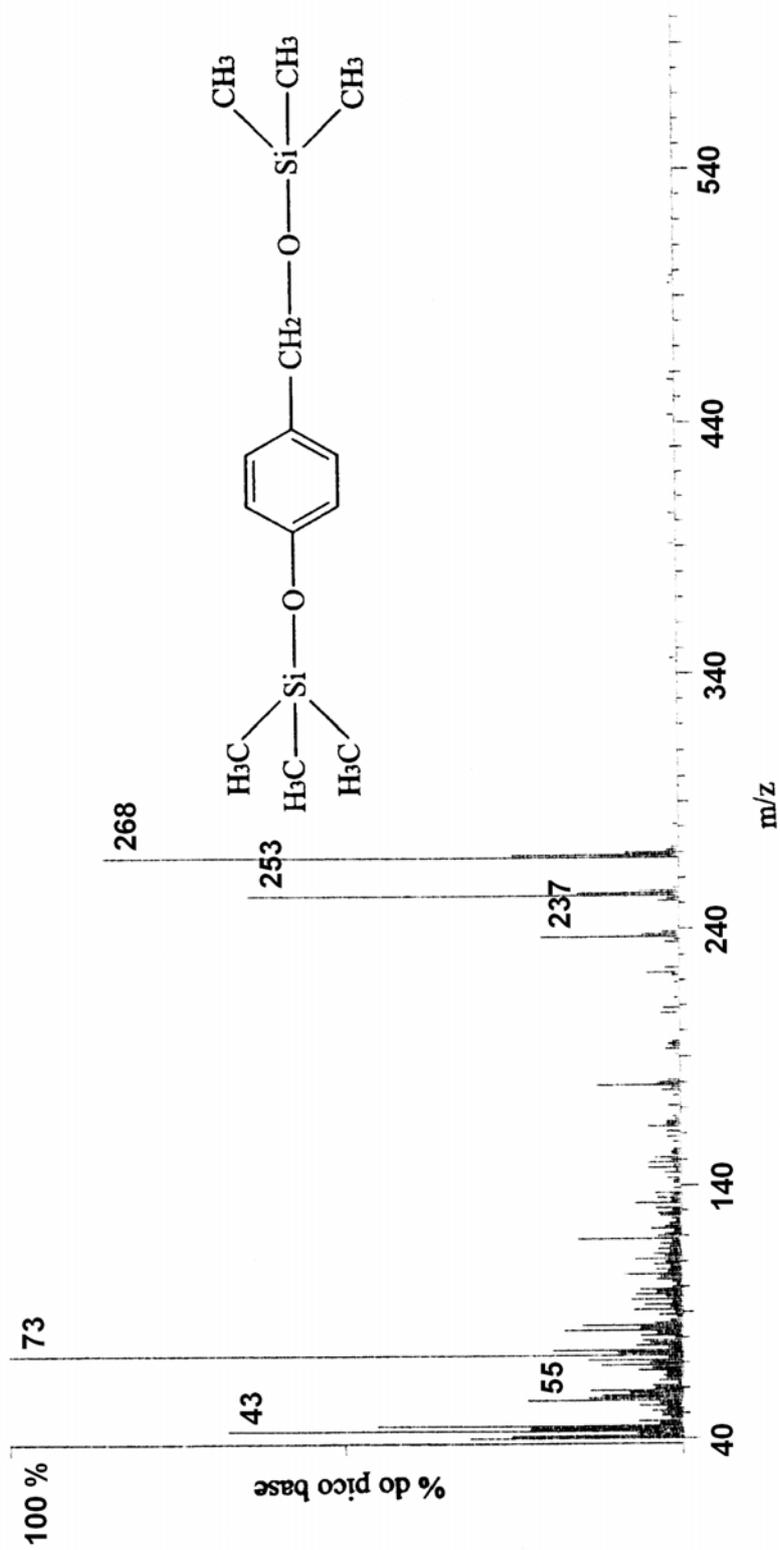


Figura 10 - Espectro de massas do composto p-hidroxifenil-metanol silanizado, identificado na fração F3, amostra BL (Baía da Babitonga,

Lagoa do Saguauçu).

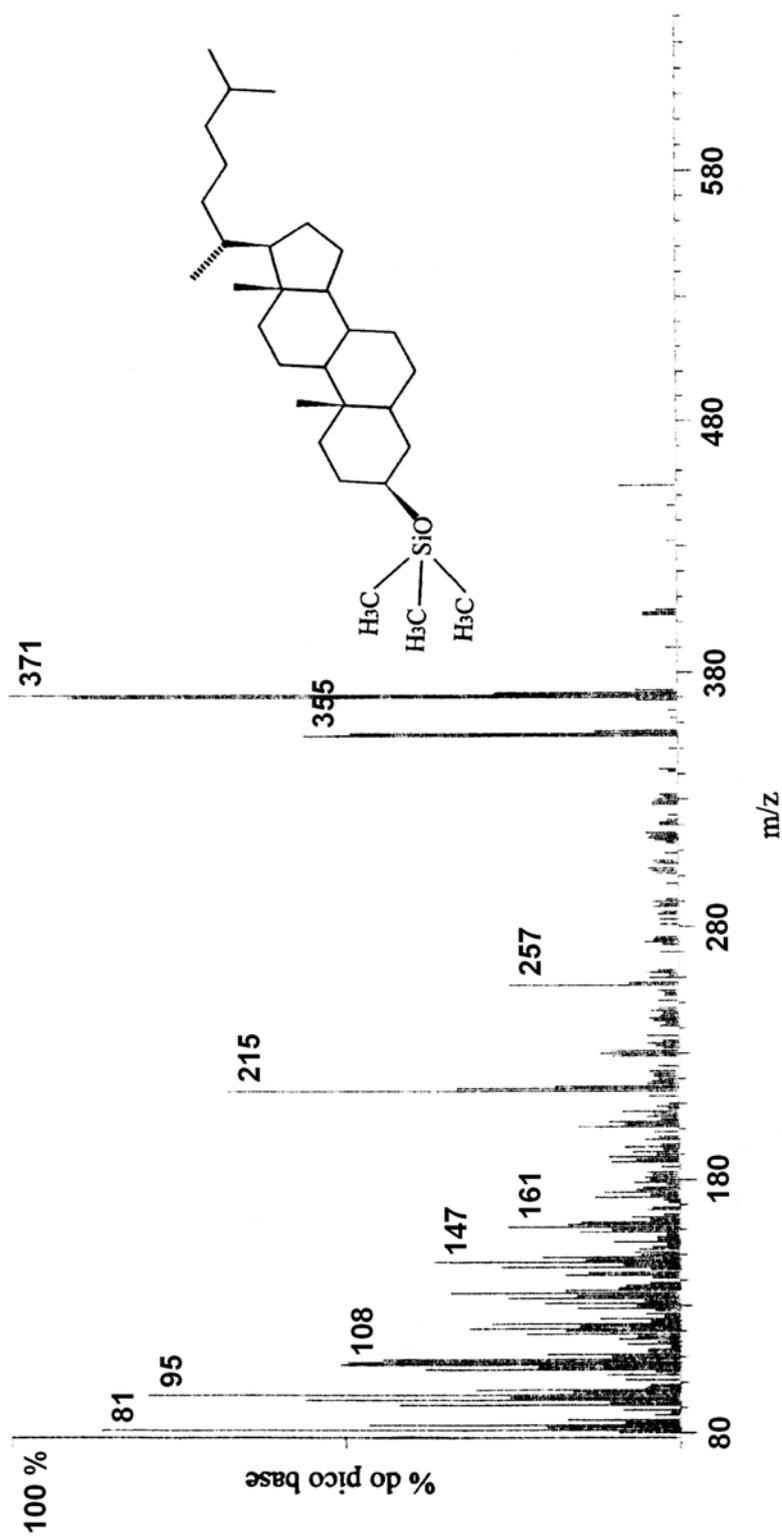


Figura 11 - Espectro de massas do composto 5- $\beta$ -colestano-3- $\beta$ -ol (coprostanol) silanizado, identificado na fração F3, amostra BL (Baía da Babitonga, Lagoa do Saguauçu).