



Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Departamento de Geociências
Laboratório de Oceanografia Geológica
Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica



Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS

Douglas Mayer Bento

Dissertação apresentada na Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Baisch
Co-orientadora: Prof^{da}. Dr^a. Isabel Machado

Rio Grande – RS
Março 2005

“É melhor tentar e falhar do que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final”

M. Luther King

Agradecimentos

Ao orientador prof. Dr. Paulo Baisch pela oportunidade e pelos conhecimentos transferidos durante o curso de pós-graduação.

A co-orientadora profa. Dra. Isabel Machado pelo apoio nas horas difíceis e sempre com alguma solução aos problemas enfrentados. Na verdade foste mais que uma co-orientadora és uma verdadeira amiga.

A profa. Dra. Elina Caramão pela sua fundamental cooperação e disponibilidade para realização das análises cromatográficas.

A Agência Nacional do Petróleo (ANP) pelo financiamento deste trabalho, pela bolsa de estudos e pelo apoio para complementação curricular.

Ao prof. Gilberto Griep coordenador do PRH-27 da ANP.

Ao prof. Dr. Jorge Costa e Msc. Vilásia Martins pela cooperação na realização das análises microbiológicas e montagem do experimento.

Ao laboratório de Oceanografia Geológica, funcionários e professores.

Aos colegas de mestrado (Guilherme, Luciano, Marina, Liziara, Salete, Clarissa, e outros).

Ao Oc. Renato Koike pela amizade e disponibilidade nos momentos mais inoportunos.

Para um secretário muito especial, valeu Clabisnei.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada, que sempre me apoiaram.

A Hedi, a mãe da minha esposa, por ter sempre me incentivado.

Ao meu pai e a minha mãe, pois sem o carinho, amor e a amizade deles, não estaria aqui.

À minha esposa e filha, que sempre tiveram paciência e compreensão nas horas em que tive maior dificuldade, obrigado Nieve e Ândria, eu amo vocês.

Lista de siglas

ANP: Agência Nacional do Petróleo

B(a)P: Benzo(a)Pireno

COT: carbono orgânico total

CPI: *Carbon preference index* (índice preferencial de carbonos)

Eh: potencial de oxirredução

F1: fração da extração dos hidrocarbonetos alifáticos

F2: fração da extração dos HPAs

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

ND: não detectável

p: nível de significância

pH: potencial hidrogeniônico

UCM: *Unresolved Complex Mixture* (mistura complexa não resolvida)

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos)

Σ HPAs: somatório de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Lista de Unidades

%: porcentagem

$\mu\text{g/g}$: micrograma por grama

$\mu\text{g/Kg}$: micrograma por quilograma

μg : micrograma

μL : microlitro

μm : micrometro

cm: centímetro

g: grama

keV: quilo elétron-volts

Kg/m^3 : quilograma por metro cúbico

Kg: quilograma

L: litro

m: metro

m^3 : metro cúbico

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mm: milímetro

mV: milivolts

N: normal (normalidade da solução)

ng/g : nanogramas por grama

ng/Kg : nanogramas por quilograma

nm: nanometros

$^{\circ}\text{C}$: grau Celcius

ppb: partes por bilhão

ppm: partes por milhão

s: segundos

Índice

Agradecimentos	3
Lista de siglas	4
Lista de Unidades	5
1- Introdução	15
2- Objetivos	19
3- Revisão Bibliográfica	19
3.1- Histórico de acidentes envolvendo derrame de petróleo e seus derivados	19
3.2- Tempo de residência relacionados aos processos de intemperização do petróleo no mar	21
3.3- Caracterização dos hidrocarbonetos do petróleo	22
3.4- Classificação química e física dos hidrocarbonetos do petróleo	23
3.5- Biossurfactantes	27
3.5.1 - Processos de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos	28
3.5.2- Biodegradação da fração saturada	29
3.5.3- Biodegradação da fração aromática	30
3.5.4- Microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos	30
3.5.5- Efeito de fatores físicos e químicos na biodegradação	31
3.6- Dispersantes Químicos	32
4- Material e Métodos	35
4.1- O experimento e sítio de estudo	35
4.2- Tipo de óleo usado no experimento	37
4.3- Produção do biossurfactante pelo <i>Aspergillus fumigattus</i>	37
4.3.1- Fermentação em Estado Sólido	37
4.4- Limpeza dos materiais e preparação dos reagentes	38
4.5- Amostragem de sedimento	38
4.6- Análise <i>in situ</i>	38
4.7- Análise granulométrica e porosidade	39
4.8- Contagem de bactérias e fungos	39
4.9- Análise dos nutrientes	39
4.9.1- Carbono orgânico total (COT)	40
4.9.2- Nitrogênio total	40
4.9.3- Fósforo total	40
4.10- Análise dos hidrocarbonetos	41
4.10.1- Esquema das análises dos hidrocarbonetos	44

4.11- Tratamento dos dados	45
5- Resultados e Discussão	47
5.1- Análise granulométrica	47
5.2- Potencial hidrogeniônico (pH) e potencial redox (Eh)	49
5.3- Monitoramento microbiológico	51
5.3.1- Experimento com óleo diesel	52
5.3.2- Experimento com o biossurfactante	52
5.3.3- Experimento com o dispersante químico	53
5.4- Análise dos nutrientes- COT, nitrogênio total e fósforo total	53
5.4.1- Carbono orgânico total	53
5.4.2- Nitrogênio total	56
5.4.3- Fósforo total	59
5.5- Análise dos resultados de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos	61
5.5.1- Análise dos cromatogramas	63
5.5.1.1- Evolução da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos	63
5.5.1.2- Evolução da concentração dos HPAs	71
5.5.2- Discussão dos resultados obtidos por meio dos cromatogramas – análise das concentrações	77
5.5.2.1- Hidrocarbonetos Alifáticos	77
5.5.2.2- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	82
6- Conclusões	89
7- Recomendações	91
8- Bibliografia	92
9.- Anexos	103
Anexo .9.1	103
Anexo 9.2	105
Anexo 9.3	107
Anexo 9.4	110
Anexo 9.5	112

Índice de tabelas

Tabela 1 – Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados como poluentes de prioridade ambiental pela EPA (Agência de Proteção Ambiental) norte americana (Sims <i>et al</i> , 1988).	26
Tabela 2 – Taxas de biodegradação de algumas espécies de HPAs (USEPA, 2000)	31
Tabela 3- Composição média (%) do solo acondicionado em cada uma das caixas usadas neste trabalho	47
Tabela 4– Resultado do pH durante o experimento por 180 dias	50
Tabela 5– Resultados Eh (potencial redox) durante o experimento por 180 dias	51
Tabela 6- Contagem de fungos e bactérias em cada um dos ensaios	52
Tabela 7- Resultados de carbono orgânico total, em porcentagem, para cada experimento	55
Tabela 8- Resultados de nitrogênio total, em porcentagem, para cada experimento.	58
Tabela 9- Resultados de fósforo total, em porcentagem, para cada experimento.	60
Tabela 11- Comparação da fonte de n-alcanos ao meio ambiente. Fonte adaptada (Bishop, 1983 e Medeiros 2000).	78
Tabela 12- Concentrações de n-alcanos totais em sedimentos. Fonte: adaptado de Taniguchi, 2001	80
Tabela 13- Mostra a concentração inicial e final, expressa em ug/kg, dos HPAs.	82

Índice de figuras

Figura 1- Tempo e fatores que agem na intemperização do óleo (Clark, 1989 adaptado)	21
Figura 2- Fórmula estrutural plana do metano	24
Figura 3- Fórmula estrutural plana do eteno	24
Figura 4- Fórmulas estruturais planas, respectivamente, do metil-propano e do fitano	24
Figura 5- Fórmula estrutural plana do ciclo hexano	25
Figura 6- Fórmula estrutural do benzeno	25
Figura 7- Biodegradação de um n-alcano	29
Figura 8- Biodegradação do fenantreno	30
Figura 9 - Representação da ação do dispersante sobre uma mancha de óleo (IPIECA, 1993).	33
Figura 10- Mapa de localização do estuário da Lagoa dos Patos e localização da Ilha dos Cavalos	35
Figura 11- Esquema do experimento.	36
Figura 12- Local das caixas no ambiente em estudo	36
Figura 13 - Diagrama triangular de classificação granulométrica (Shepard, 1954) dos valores médios do sedimento da caixa do óleo, dispersante e biossurfactante.	48
Figura 14 - Cromatograma do óleo diesel do 1º dia do experimento	64
Figura 15- Cromatograma da caixa do óleo diesel após 30 dias do experimento.	65
Figura 16- Cromatograma do óleo diesel após 180 dias do experimento.	66
Figura 17- Cromatograma do dispersante do 1º dia e do 30º dia do experimento	67
Figura 18- Cromatograma do dispersante após 180 dias do experimento	68
Figura 19- Cromatograma do biossurfactante do primeiro dia do experimento	69
Figura 20- Cromatograma da caixa do biossurfactante após 90 dias do experimento.	70
Figura 21- Cromatograma do óleo diesel após 180 dias do experimento.	70
Figura 22- Cromatograma do óleo diesel do 15º dia após o início do experimento	71
Figura 23- Cromatograma da caixa do óleo diesel 180 dias após o início do experimento.	72
Figura 24- Cromatograma do dispersante do 1º dia do experimento	73
Figura 25- Cromatograma da ação do dispersante após 30 e 180 dias do início do experimento	74
Figura 26- Cromatograma do biossurfactante do 1º e do 15º dia do experimento	75
Figura 27 - Cromatograma da caixa do biossurfactante após 90 e 180 dias após o início do experimento.	76

Índice de gráficos

Gráfico 1- Comparação da concentração final do fenantreno nas	84
Gráfico 2- Comparação da taxa de degradação HPAs > 4 anéis	85
Gráfico 3- Comparação da taxa de degradação durante 180 dias	86
Gráfico 4- Comparação da taxa de degradação HPAs com 3 anéis aromáticos	87

Resumo

As técnicas convencionais de limpeza de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados podem ser complementadas com a remediação, pelo uso de dispersantes químicos ou de biossurfactantes. A biorremediação minimiza o impacto de substâncias recalcitrantes no ambiente. O dispersante químico pode promover a biodegradação mais rápida do óleo, mas a sua aplicação deve ser sempre avaliada por profissionais especializados em meio ambiente, já que ela pode ser vista como uma introdução deliberada de um contaminante. O presente trabalho avaliou a influência da utilização de um dispersante químico e de um biossurfactante (produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus*), em derrame controlado de óleo diesel, ocorrido na primavera/2003 na Ilha dos Cavalos localizada no estuário da Lagoa dos Patos. O ambiente foi monitorado durante seis meses, selecionando-se um local com óleo diesel, outro com óleo diesel e dispersante químico e outro com óleo diesel e biossurfactante. Foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: granulometria, pH, Eh, COT, nitrogênio e fósforo total do sedimento, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. O tratamento estatístico consistiu na análise de variância (ANOVA) e no teste de Tukey ($p < 0,05$), para os nutrientes analisados. Os hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos provenientes da degradação do óleo diesel foram determinados por CG-MS. Os resultados mostraram que o uso de técnicas alternativas, principalmente com a introdução de espécies não nativas, deve ser bem estudado antes de ser aplicado, pois na caixa onde houve adição do fungo *Aspergillus fumigatus* a biota microbiana demorou a se recuperar, e a taxa final de degradação nas três caixas foram muito parecidas.

Palavras Chave: hidrocarbonetos, biodegradação, remediação e óleo diesel.

Abstract

The conventional cleaning techniques of infected areas with petroleum and its derived products can be complemented by remediation, with the use of chemical surfactants or biosurfactants. Bioremediation minimizes the impact of recalcitrant substances in the environment. The chemical surfactant can promote fast oil biodegradation, however, its application should always be evaluated by specialized professionals in the environment, in order to avoid the understanding that it is a deliberate introduction of a pollutant. In such a case, this work evaluated the influence of using a chemical surfactant and a biosurfactant (produced by the fungus *Aspergillus fumigatus*) in a controlled spill caused by oil diesel, that happened during the springtime of the year 2003, in the Horses Island, located in the estuary of the Patos Lagoon. The environment was monitored for six months, and there were areas with only oil diesel, only oil diesel and chemical surfactant and, finally, areas with oil diesel and biosurfactant. The following physical-chemical parameters were analyzed: granulometry, pH, Eh, COT, nitrogen and aliphatic and aromatic hydrocarbons. The statistics consisted of variance analysis (ANOVA) and Tukey test ($p < 0,05$), related to the analyzed nutrients. The aliphatic and aromatic hydrocarbons derived from oil diesel were determined by GC-MS. The results showed that the use of alternative techniques, mainly with the introduction of non native species, should be meticulously studied before the application, because in the box where the fungus *Aspergillus fumigatus* was added there was an important delay in the recovering of microbial biota, although the degradation final rate was very similar in the three boxes.

Key Words: hydrocarbons, biodegradation, remediation and oil diesel.

Organização do trabalho

O trabalho está disposto em capítulos, com a seguinte ordem: Capítulo I- Aspectos Teóricos, Capítulo II- Material e Métodos, Capítulo III- Resultados e Discussão e Capítulo IV- Conclusões, com o objetivo de facilitar a leitura, interpretação e o entendimento, onde cada capítulo apresenta as seguintes subdivisões:

Capítulo I- Nesse capítulo serão abordados a introdução, objetivos, histórico de casos de derrame de óleo no Brasil, tempo de residência relacionados aos processos de intemperização do petróleo no mar, caracterização dos hidrocarbonetos do petróleo, classificação química e física dos hidrocarbonetos do petróleo, processos de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos, biodegradação da fração saturada e aromática, microorganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, efeito de fatores físicos e químicos na biodegradação, dispersantes químicos.

Capítulo II- Serão demonstrados os materiais e métodos, a montagem do experimento, o tipo de óleo, a produção do biossurfactante, a limpeza dos materiais, a amostragem do sedimento, a análise *in situ*, a análise granulométrica, a análise dos nutrientes, a análise dos hidrocarbonetos e as condições cromatográficas.

Capítulo III- Neste capítulo será feita análise dos resultados e discussões da granulometria, pH e Eh, nutrientes, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.

Capítulo IV- Este capítulo tem como objetivo apresentar as conclusões do trabalho e sugestões para trabalhos posteriores.

Capítulo - I

Aspectos Teóricos

1- Introdução

Os combustíveis fósseis são as principais fontes de obtenção de energia para a civilização atual e o crescente aumento do consumo mundial tem acarretado a sua introdução no ambiente marinho (Marques Jr., 2002). Nesse ambiente, processa-se a maior parte do transporte e o desembarque do petróleo do mundo, atividades essas que aumentam a probabilidade de serem verificados acidentes com tais produtos. Esses acidentes causam diferentes tipos de impacto em vários ecossistemas marinhos mundiais através de eventos crônicos ou críticos de contaminação, daí a necessidade de um estudo constante desse ambiente.

Os acidentes ambientais relacionados com petróleo são eventos considerados comuns em todo mundo. Como exemplo recente cita-se o acidente com o petroleiro Prestige, que afundou na costa da Espanha, em dezembro de 2003, levando grande parte do combustível de seus tanques para o fundo do Atlântico, local que é uma das áreas mais ricas para pesca da Espanha (Martins, 2005). No caso do Brasil, pode-se citar o navio Vicuña de bandeira chilena carregado de metano e óleo, que explodiu em novembro de 2004 no porto de Paranaguá/PR (SEMA, 2005). Este e outros acidentes estão diretamente associados à crescente atividade econômica ligada ao setor de petróleo.

A composição química do petróleo, conforme Freedman (1995) e Marques Jr. (2002), é complexa, variável e extremamente influenciada por condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente de formação. O petróleo natural ocorre como uma mistura de compostos orgânicos, principalmente hidrocarbonetos que são, quantitativamente, os mais importantes constituintes do petróleo, podendo ser divididos em três partes: alifáticos, alicíclicos e aromáticos.

Os óleos crus contêm muitas substâncias tóxicas como benzeno, tolueno, xileno além de outras substâncias de baixo peso molecular (Kennish, 1996). No petróleo também são encontrados ácidos, fenóis, compostos com enxofre (sulfetos, tióis e tiofenóis) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Da série das parafinas, das olefinas até os aromáticos verifica-se que a toxicidade aumenta (Kennish, 1996). Durante um derrame de petróleo, as moléculas de menor peso molecular sofrem, durante as primeiras 24 e 48 horas, um forte processo de evaporação e dissolução. Esse fato produz uma importante mudança

na composição do óleo, reduzindo o impacto na comunidade de organismos e no ambiente aquático.

A Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA) dos Estados Unidos lista vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como compostos poluentes de prioridade ambiental e que devem ser freqüentemente monitorados em efluentes industriais, devido ao fato de serem considerados como carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, além de possuírem efeitos tóxicos aos seres vivos (Keith & Tellierd, 1979; Eilser, 1987; Odum, 1988; Lijinsky, 1991; Kennish, 1992) e terem a capacidade de se bioacumularem nas diferentes cadeias alimentares (Godsy, 1983; Marques Jr., 2002). Por isso existe um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento dos hidrocarbonetos para que haja o desenvolvimento de métodos mais eficientes de remoção dos mesmos do meio ambiente.

Os constituintes do petróleo são moléculas hidrofóbicas, apresentando baixa solubilidade em água, o que contribui para sua persistência no meio ambiente. Os hidrocarbonetos sofrem uma adsorção nas partículas do material em suspensão, o que provoca forte tendência a acumularem-se nos sedimentos (Ehrlich, 1982; Bicego, 1988; Kennish, 1996).

Bicego (1988) afirma que, após o derrame no mar, o petróleo fica sujeito a uma série de processos físicos, químicos e biológicos, acarretando a sua dispersão no meio, e alterações em suas características físicas e químicas, sendo que a degradação pode apresentar-se muito diferente conforme a proximidade da linha da costa.

Estudos realizados pelo UNEP (1991) demonstram que a velocidade de degradação do petróleo depende das características físicas e químicas do óleo, das condições do tempo e do clima. Nos sedimentos aquáticos, os hidrocarbonetos são degradados muito lentamente na ausência de luz e oxigênio. A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados. Os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos e alcenos) são mais rapidamente e facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente cicloalcanos. Segundo Bicego (1988) a degradação do óleo é bem mais lenta no sedimento do que na água, inclusive os compostos mais leves persistem mais tempo no sedimento.

Dentre os ecossistemas marinhos-transacionais, situa-se o estuário da Lagoa dos Patos. Este apresenta características morfológicas, geológicas e hidrofísicas que o diferem de outros estuários. A região estuarina é classificada como um sistema microtidal, pois as marés astronômicas apresentam média de 0,45 m de amplitude em média (Möller, 1996). Esse ambiente é local de desenvolvimento e de captura de espécies de importância econômica, e, além disso, integra um dos maiores complexos lacunares do mundo, o sistema Patos-Mirim.

O estuário da Lagoa dos Patos está inserido na planície costeira do Rio Grande do Sul, que é constituída de uma costa arenosa baixa e uma das mais amplas planícies costeiras do Brasil. Estudos realizados por Calliari (1998), demonstram que o estuário é predominantemente composto por grandes bancos de areia e sua profundidade pode variar entre 1 e 5 m. A maior profundidade observada alcança 18 m no canal que liga a laguna com o Oceano Atlântico. As enseadas associadas às margens do estuário são definidas por um número elevado de bancos e esporões arenosos recurvados, que formam uma feição típica das áreas rasas, com profundidades menores que 1 m.

Nos estuários, em geral, são desenvolvidas importantes atividades do setor da pesca, constituindo-se assim em importante fonte de renda da comunidade. Tal afirmativa é confirmada por pesquisas realizadas em torno da atividade pesqueira na costa do Rio Grande do Sul, onde a pesca é oficialmente classificada como pesca artesanal, costeira e industrial. Os dados obtidos por Reis (1999) indicam que mais de 90% do total capturado pela pesca artesanal no Rio Grande do Sul é originado do estuário da Lagoa dos Patos e costa adjacente.

Na região estuarina encontra-se instalado o Porto da cidade do Rio Grande e duas empresas específicas na área do petróleo, uma no refino – Refinaria de Petróleo Ipiranga S/A e outra no armazenamento e transporte do petróleo – Terminal da Petrobras. Os terminais marítimos da Petrobrás integram-se ao sistema de transporte de petróleo e derivados, quer para suprir as refinarias de óleo cru importado como para escoar parte da produção de derivados das refinarias. Além destas empresas ocorre abastecimento de navios na zona portuária, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de poluição por hidrocarbonetos do petróleo.

Existem ainda outros agentes possíveis de causarem poluição que passam pelo terminal da Petrobras. Griep *et al* (2001) apresenta o terminal como responsável pela importação e exportação de diversos produtos, como óleo diesel, petróleo, estireno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, metanol, hexano, propano (GLP) e amônia. No ano de 1998 verificou-se um montante de 1.531.725,52 toneladas, fator que o torna um ambiente de características múltiplas e facilmente impactáveis, o que significa afirmar que qualquer agente de poluição pode acarretar inúmeras mudanças na estrutura ecológica do local.

Existem estudos científicos acerca da degradação do petróleo em ambientes marinhos, como as pesquisas realizadas por Bicego (1988), Kennish (1992), Ferreira (1995), Zanardi (1996), e Nishigima (1999), contudo não há trabalhos específicos a esse respeito para as condições do estuário da Lagoa dos Patos.

Até a presente data não são verificados estudos envolvendo a degradação do petróleo ou de óleo diesel com vistas a analisar a evolução e a persistência de hidrocarbonetos nos sedimentos do Estuário da Lagoa dos Patos. As pesquisas que podem apresentar afinidades a este estudo tinham como objetivo a verificação dos níveis de contaminação dos hidrocarbonetos alifáticos e dos aromáticos policíclicos nos sedimentos marginais do estuário. Trabalhos de Baisch *et al* (2000), Zamboni (2000), Cordeiro (2003) e Garcia (2004) mostram que há uma importante contaminação nas zonas estuarinas marginais, mas, em geral, os canais de navegação estão livres desse processo.

O presente trabalho tem por objetivo suprir a falta de conhecimento sobre o processo de degradação do petróleo no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos. Através de um derrame induzido onde foram examinados a evolução e os constituintes remanescentes no sedimento como meio de estabelecer de forma mais exata o impacto ambiental.

2- Objetivos

Objetivo Geral:

- Estudar a degradação e o tempo de permanência dos produtos de degradação em um derrame de óleo diesel, em sedimento do Estuário da Lagoa dos Patos.

Objetivos Específicos:

- Verificar a concentração final da fração alifática dos hidrocarbonetos do óleo diesel no sedimento;
- Verificar a concentração final da fração aromática dos hidrocarbonetos do óleo diesel no sedimento;
- Fazer uma comparação no ambiente onde foi utilizado dispersante químico, com ambiente onde foi utilizado biossurfactante e o meio ambiente onde não foi empregada a remediação;
- Gerar dados de controle de possíveis impactos no Estuário da Lagoa dos Patos, a fim de ser utilizado no Programa de Recursos Humanos da ANP para o setor do petróleo e gás.

3- Revisão Bibliográfica

3.1- Histórico de acidentes envolvendo derrame de petróleo e seus derivados

A contaminação de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos, geralmente por perdas ou rompimentos de dutos, ou por acidentes ocorridos no seu transporte, tem um efeito pronunciado sobre as propriedades do ambiente contaminado, com processos de toxicidade sobre os microorganismos e mortandade dos organismos.

Um dos últimos acidentes de grandes proporções ocorrido foi o do petroleiro Prestige, com bandeira de Bahamas. O navio carregava 77 mil toneladas de petróleo e se partiu na costa da Espanha, porém inicialmente vazaram 40 mil toneladas atingindo centenas de quilômetros de costa e matando peixes e aves, havendo o risco de ser uma das piores catástrofes ecológicas já vistas, atingindo a economia do local. As proporções deste acidente foram tão grandes que o óleo atingiu as costas portuguesas e francesas, prejudicando as atividades pesqueiras e turísticas da região (Martins, 2005).

No Brasil um dos primeiros casos de vazamento de petróleo registrado é o ocorrido no Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, em 1955, quando era feito o transbordo de petróleo de navios maiores para menores, pois estes tinham melhores

condições de calado para entrarem no Porto de Santos. Porém, o primeiro grande derrame registrado ocorreu em 1974 (anexo 1), quando o petroleiro *Takimyia Maru* chocou-se contra uma rocha no Canal de São Sebastião, causando vazamento aproximado de 6.000 ton. de petróleo (Poffo, 2000).

Atualmente um dos acidentes que tomou proporções enormes foi da plataforma P-36 na Bacia de Campos em 2001, que culminou em uma lista de desastres. No período que antecedeu o desastre da plataforma P-36, de 1998 a 2001, ocorreram 99 acidentes com 32 mortes e aproximadamente um milhão de litros de óleo foram derramados na Baía de Guanabara-RJ.

Na cidade do Rio Grande-RS o problema com vazamentos de petróleo e seus derivados também acontece, porém em menor escala, tais como:

- **Março de 2000-** Cerca de 18 mil litros de óleo cru vazaram em Tramandaí, no litoral gaúcho, quando eram transferidos de um navio petroleiro para o Terminal Almirante Soares Dutra (Tedut), da Petrobras, na cidade. (<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano> - acesso dia 15/12/2004)
- **Março de 2001-** No Porto de Rio Grande (RS), uma barcaça derramou 430 litros de óleo combustível, contaminando as águas do canal e provocando a morte de peixes. (<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano> - acesso dia 15/12/2004).
- **Junho de 2004-** Especialistas do Laboratório de Oceanografia Geológica emitiram parecer técnico sobre pequeno derrame de óleo OCMAR, da embarcação Guarapuava, ocorrido em maio de 2004, quando em operação de descarga, no terminal da TRANSPETRO – Rio Grande.
- **Setembro de 2004-** Óleo queimado foi derramado no Arroio Carahá, afluente da Lagoa dos Patos. O volume derramado não foi informado. (Jornal Zero Hora, 13 de setembro de 2004).
- **Dezembro de 2004-** Uma mancha de óleo foi detectada no canal de navegação do porto de Rio Grande (RS). A fonte não foi identificada e esta mancha pode ter sido provocada por um vazamento de 1000 L de óleo. (Jornal Agora, 7 de dezembro de 2004).

3.2- Tempo de residência relacionados aos processos de intemperização do petróleo no mar

Quando o petróleo entra em contato com água do mar, vários processos físico-químicos e biológicos são passíveis de ocorrer e a intensidade de cada um deles varia ao longo do tempo. De acordo com Clark (1989) e Marques Jr. (2002), existem alguns processos que ocorrem com o petróleo, tais como: espalhamento, evaporação, dissolução, dispersão, emulsificação, fotoxidação, sedimentação e biodegradação do petróleo.

Todos os processos de intemperização dependem das condições climáticas e do tipo de petróleo. A Figura 1 demonstra esquematicamente cada um dos processos mencionados, o tempo de duração de cada um e sua intensidade.

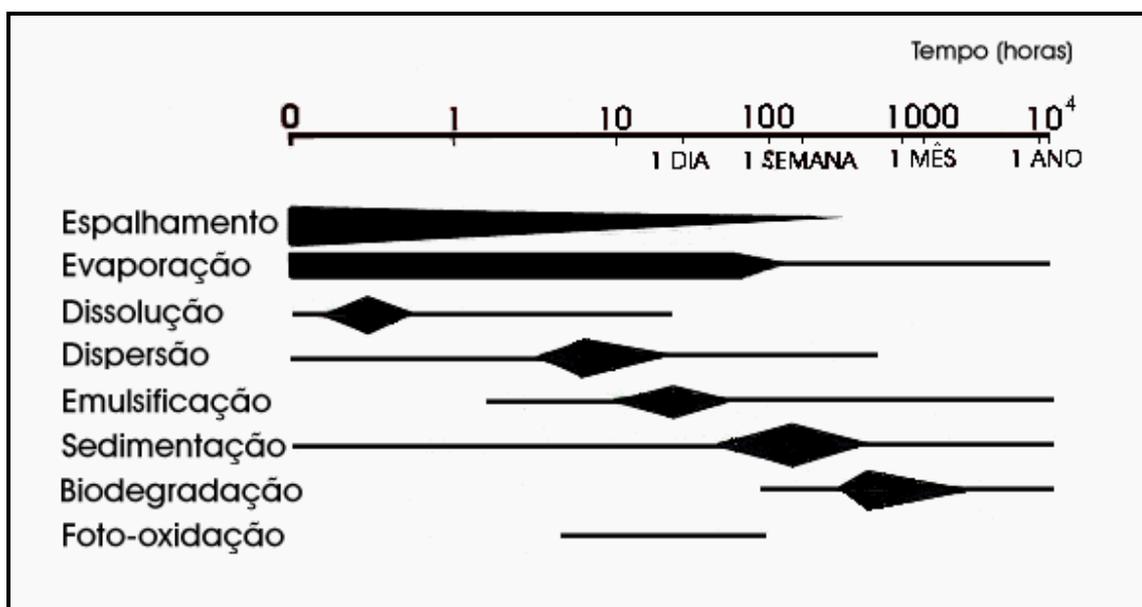


Figura 1- Tempo e fatores que agem na intemperização do óleo (Clark, 1989 adaptado)

O espalhamento é o processo físico que ocorre na interface água-ar e é caracterizado pela formação de um filme superficial. Quanto mais leve for o óleo melhor será seu espalhamento, os fatores que influenciam o espalhamento em derrame de óleo são tensão superficial, peso específico e viscosidade (USEPA, 2001).

A evaporação é a transferência dos hidrocarbonetos da forma líquida para a gasosa, sendo este um dos primeiros processos de remoção que ocorre quando o óleo é derramado. Existem alguns fatores que interferem na velocidade da taxa de evaporação: temperatura da água e do ar, intensidade de radiação solar, viscosidade do óleo e velocidade do vento. A solubilização ou dissolução como nos dois processos anteriores, ocorre com maior intensidade nas primeiras horas após o derramamento e tende a ser mais efetiva para compostos com menor peso molecular, pois são mais solúveis do que as frações mais pesadas.

A emulsificação é caracterizada pela agregação e pelo aumento de peso e volume de partículas, formando o chamado “mousse de chocolate”. A sedimentação do óleo pode ocorrer pela adsorção ao material em suspensão, e com isso induz o aumento da densidade específica, através da evaporação e dissolução. Enquanto que a biodegradação consiste na degradação do petróleo por ação de microrganismos.

Entre os processos citados acima, os mais importantes durante o período inicial de um derrame de petróleo no mar são o espalhamento, a evaporação, a dispersão, a emulsificação e a dissolução. Estes processos juntos são responsáveis por até 50% da taxa de decaimento da concentração inicial de óleo no mar nas primeiras 24 h (ITOPF, 1987; Milanelli, 1994).

Em geral, quanto maior é o número de átomos de carbono do composto presente no petróleo, maior será sua persistência no ambiente, mais lenta será sua evaporação e a sua solubilidade e menor será a sua susceptibilidade à biodegradação (Marques Jr., 2002).

3.3- Caracterização dos hidrocarbonetos do petróleo

O petróleo consiste em uma mistura complexa de milhares de componentes, no estado gasoso, líquido e sólido (Kennish, 1992). Uma definição precisa da composição do petróleo é impossível, uma vez que não existem dois óleos exatamente iguais (Tissot e Welt, 1984).

A palavra petróleo refere-se aos derivados de matéria orgânica, principalmente de origem biológica, que foram produzidos através de processos geológicos e biológicos resultando na produção e acumulação de milhares de diferentes tipos de

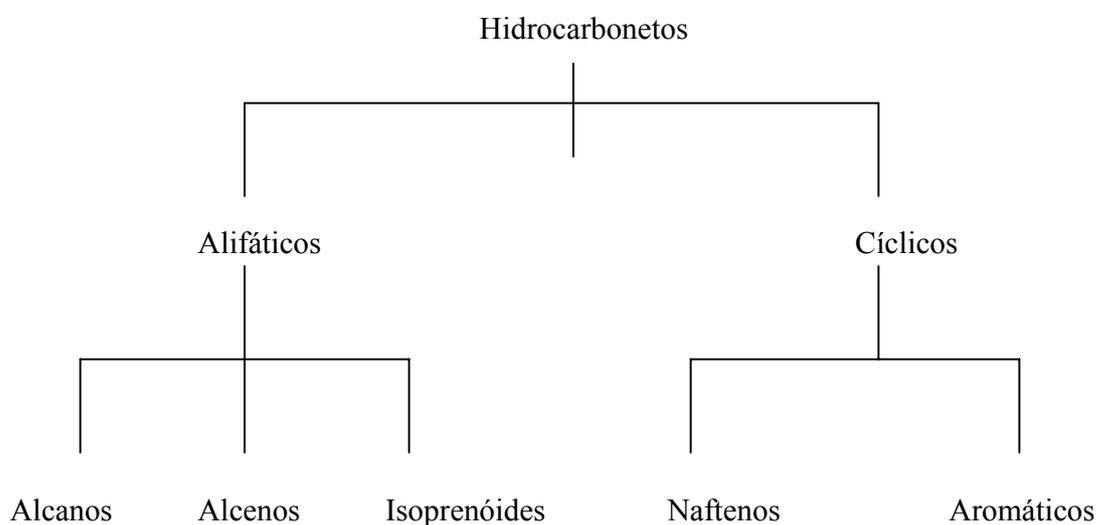
moléculas orgânicas em sedimentos antigos. O óleo cru e o gás natural (metano) juntos são denominados petróleo (UNEP, 1991).

Entre os constituintes do petróleo, os hidrocarbonetos, são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio, estes hidrocarbonetos apresentam características apolares (hidrófobos), ou seja, não apresentam atração pela água (polar). Desse modo, eles têm uma maior tendência de associação às fases sólidas, tais como as partículas em suspensão, os tecidos biológicos e os sedimentos.

Em alguns tipos de óleos, os hidrocarbonetos chegam a atingir até 98 % da composição total (Clark e Brown, 1977; Bicego, 1988). Além dos hidrocarbonetos existem outros componentes em menor quantidade, tais como, enxofre, nitrogênio e oxigênio. Há ainda metais traço como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio.

3.4- Classificação química e física dos hidrocarbonetos do petróleo

As principais classes de hidrocarbonetos constituintes do petróleo são os alifáticos e os cíclicos. Os hidrocarbonetos alifáticos se dividem em: n-alcenos ou parafinas, alcenos ramificados ou isoprenóides e alcenos. Os hidrocarbonetos cíclicos são divididos em ciclo alcenos ou naftenos e aromáticos. Em média, o petróleo apresenta cerca de 30 % de alcenos, 50 % de ciclo alcenos e 15 % de aromáticos (UNEP, 1991).



Hidrocarbonetos alifáticos compreendem cadeias carbônicas com pelo menos duas extremidades, sem nenhum ciclo ou anel.

I- Alcanos são hidrocarbonetos de cadeia aberta e saturada que apresenta somente ligação simples entre os átomos de carbono. O termo parafinas vem do latim *parum* = pequena + *affinis* = afinidade, e significa pouco reativas. O menor dos alcanos é metano (Figura 2). Algumas das propriedades físicas dos alcanos é que a temperatura ambiente (25 °C) até 4 átomos de carbono em cadeia linear estão na forma de gases, o n-alcanos de C₅ até C₁₇ são líquidos e os n-alcanos de com mais de 18 átomos de carbono são sólidos.

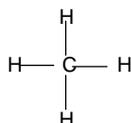


Figura 2- Fórmula estrutural plana do metano

II- Alcenos são hidrocarbonetos de cadeia aberta que apresenta uma ligação dupla entre os átomos de carbono. Os alcenos não estão presentes no petróleo bruto, mas são encontrados nos produtos refinados do petróleo. O alceno mais simples é o etileno ou eteno (Figura 3).

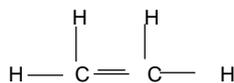


Figura 3- Fórmula estrutural plana do eteno

III- Isoprenóides são hidrocarbonetos parafínicos que apresentam ramificação em um ou mais átomos de carbono. Esse grupo apresenta uma grande importância nos estudos geoquímicos, tais como o isobutano e o fitano (Figura 4) e na produção da gasolina.

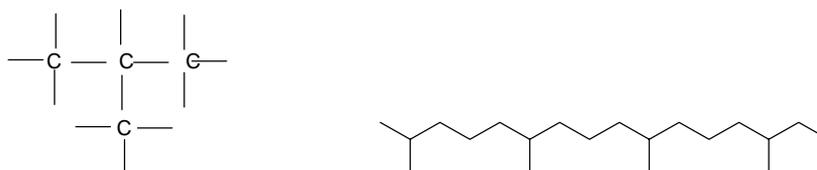


Figura 4- Fórmulas estruturais planas, respectivamente, do metil-propano e do fitano

Hidrocarbonetos cíclicos compreendem cadeias carbônicas fechadas.

I- Naftenos são hidrocarbonetos de cadeia fechada e saturada, são geralmente estáveis e não são solúveis em água, um exemplo é o ciclo hexano (Figura 5).



Figura 5- Fórmula estrutural plana do ciclo hexano

II- Aromáticos são hidrocarbonetos de cadeia fechada que apresentam na sua estrutura básico um anel com seis átomos de carbono com ligações duplas alternadas entre eles, esta unidade básica é chamada de benzeno (Figura 6).

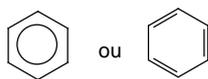
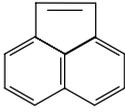
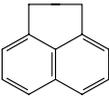
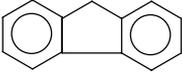
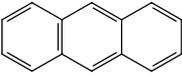
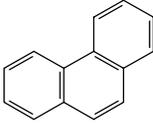
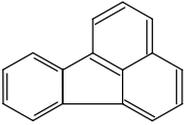
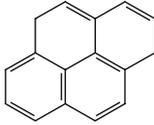
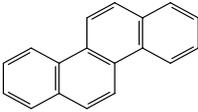
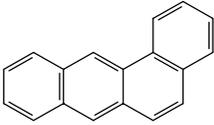
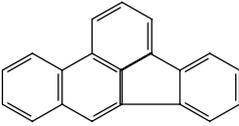
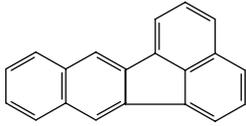
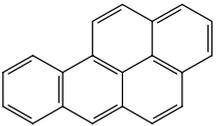
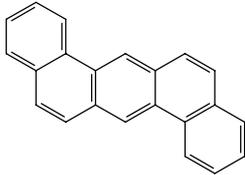
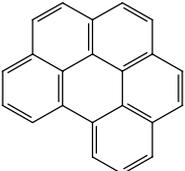
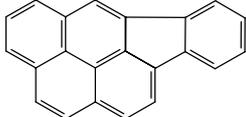


Figura 6- Fórmula estrutural do benzeno

Os hidrocarbonetos que possuem dois ou mais anéis são denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), estes hidrocarbonetos são considerados os mais tóxicos componentes do petróleo e estão associados a efeitos carcinogênicos (Tabela 1). Muitos dos HPAs de baixo peso molecular são solúveis em água, aumentando o risco de contaminação.

Tabela 1 – Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados como poluentes de prioridade ambiental pela EPA (Agência de Proteção Ambiental) norte americana (Sims *et al*, 1988).

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		tóxico	Acenaftileno		mutagênico
Acenafteno		mutagênico	Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico	Fenantreno		tóxico e mutagênico
Fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Pireno		carcinogênico e mutagênico
Criseno		carcinogênico e mutagênico	Benzo(a)antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo(b)fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Benzo(k)fluoranteno		carcinogênico e mutagênico
benzo(a)pireno		carcinogênico e mutagênico	Dibenzo(a,h)antraceno		carcinogênico e mutagênico
benzo(g,h,i)perileno		carcinogênico	Indeno		carcinogênico

3.5- Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas que apresentam uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, quando obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes, quando produzidos por microrganismos (Cassidy & Hudak, 2001; CETESB, 2003).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos aeróbicos a partir de uma fonte de carbono. Uma variedade de microrganismos produz potentes agentes de superfície ativa, os biossurfactantes, os quais variam nas propriedades químicas e no tamanho molecular.

A capacidade do biossurfactante emulsificar misturas de hidrocarboneto/água tem sido muito bem documentada. Esta propriedade é demonstrada pelo aumento significativo de degradação de hidrocarbonetos e por isso é utilizado na biorremediação de solos e mananciais contaminados (Lobato, 2000; Crapez *et al*, 2002). De acordo com Cameotra & Bollag (2003) os biossurfactantes podem ser utilizados “*in situ*” para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos e desta maneira, facilitam o acesso dos microrganismos naturalmente presentes no ambiente para que ocorra a degradação dos compostos hidrofóbicos.

Segundo Ascon-Cabrera & Lebeault (1995), citado por Martins (2005), o crescimento de microrganismos em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas, primeiramente os microrganismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido a hidrofobicidade das células, em seguida as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraíndo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. Quando as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, a tensão interfacial disponível é reduzida para o crescimento microbiano. Quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os microrganismos colonizam outras gotas.

3.5.1 - Processos de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos

A biodegradação do petróleo envolve todos os fenômenos de quebra de seus componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares. A biodegradação completa dos hidrocarbonetos resulta como membros finais o dióxido de carbono e a água. A biodegradação do petróleo por populações naturais de microorganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza. Existem algumas revisões que tratam da degradação de hidrocarbonetos por microorganismos que incluem os fatores, as vias metabólicas, os principais tipos de microorganismos e os efeitos da contaminação em comunidades microbianas (Atlas, 1977, 1981, 1984; Colwell & Walker 1977; Leahy & Colwell, 1990; Baird, 2002).

Baird (2002) definiu a biorremediação como “o uso de microorganismos vivos para degradar ou eliminar resíduos ambientais”. A capacidade de certos microorganismos serem capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentada por Zobell em 1946. Também verificou que estes organismos estão amplamente difundidos na natureza e que a natureza do óleo e as condições ambientais eram altamente importantes no seu comportamento.

A utilização dos hidrocarbonetos pelas bactérias constitui um processo em que esses compostos são paulatinamente oxidados por reações padronizadas, catalisados por enzimas (Rodrigues, 1984).

Os microorganismos necessitam de condições ambientais de crescimento. Por sua vez, a velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de, pelo menos, quatro fatores principais (Rodrigues, 1984, Baird, 2002).

I- Umidade, para facilitar as reações;

II- Oxigênio, para rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo, sob condições anaeróbicas, a biodegradação é mais lenta e normalmente efetuada por bactérias sulfato-redutoras;

III- Contato óleo-água, devido à relativa insolubilidade do óleo na água, tal contato controla a velocidade de oxidação e da degradação;

IV- Presença de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos, etc) para o desenvolvimento microbiano.

Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, os fungos e as leveduras (Cerniglia *et al*, 1977; Oudot *et al*, 1987; Macgillivray & Shiaris, 1993), as cianobactérias, as algas e mesmo os protozoários apresentam capacidade de degradação (Cerniglia *et al*, 1979).

Como a degradação de hidrocarbonetos para CO₂ envolve uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, são aeróbios. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO₂ na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns podem ser incorporados como biomassa (Bertrand *et al*, 1983; Dumenil *et al*, 1988), porém os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original. Portanto existe a preocupação que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (Wang *et al*, 1990).

3.5.2- Biodegradação da fração saturada

Os n-alcenos são considerados os mais facilmente degradáveis e já foi comprovada a biodegradação de até C₄₄ (Haines & Alexander, 1974). A biodegradação dos n-alcenos procede normalmente por um ataque monoterminal: há formação de um álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico (Mackenna & Kallio, 1964; Van Eyk & Bartels, 1968), conforme mostrado na Figura 7. O ácido carboxílico é degradado via β-oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e a formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO₂. Alguns ácidos graxos tóxicos, podem se acumular durante o processo de biodegradação (Atlas & Bartha, 1973)

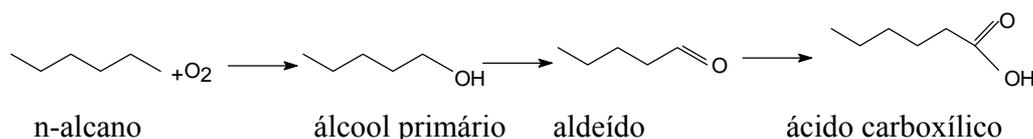


Figura 7- Biodegradação de um n-alceno

Os alcanos ramificados sobrem β-oxidação, como via degradativa mais comum, com formação de ácidos dicarboxílicos (Fall *et al*, 1979). Os grupos metil aumentam a resistência dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano. O ciclo alceno é particularmente resistente a biodegradação (Chosson *et al*, 1991), porém há estudos

mostrando que hidrocarbonetos cíclicos, até seis anéis condensados, podem ser degradados (Walker *et al*, 1975).

3.5.3- Biodegradação da fração aromática

Os compostos aromáticos de até três anéis são degradados mais facilmente. Tipicamente a degradação bacteriana envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de um diol, com subsequente clivagem e formação de um diácido. Os compostos aromáticos mais leves estão sujeitos à evaporação e à degradação microbiana no estado dissolvido. O ataque enzimático pode ser no substituinte alquil ou diretamente no anel (Gibson, 1971; Rosato, 1997). Há linhagens de microrganismos capazes de degradar compostos com cinco ou mais anéis aromáticos. Geralmente a oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos se processa produzindo principalmente fenóis, conforme o descrito na Figura 8.

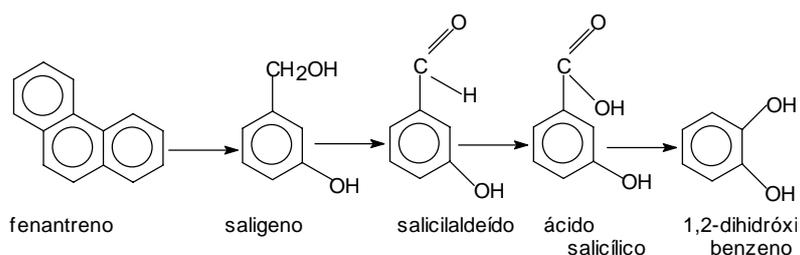


Figura 8- Biodegradação do fenantreno

3.5.4- Microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é formada por diversos gêneros microbianos, mas os principais são as bactérias e os fungos. Eles são encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no solo. Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática para degradar todos os hidrocarbonetos encontrados no petróleo.

São conhecidos 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos, que fazem a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente marinho (Floodgate, 1984), enquanto que nos solos são registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos (Bossert & Bartha, 1984; Rosato, 1997). Os fungos parecem ser mais importantes na biodegradação de hidrocarbonetos presentes em solos (Jones & Eddington, 1968; Rosato, 1997). Em geral, as

bactérias e leveduras apresentam capacidade decrescente de degradação de acordo com o aumento da cadeia carbônica ao passo que os fungos não exibem degradação preferencial de tamanho (Walker *et al*, 1975).

3.5.5- Efeito de fatores físicos e químicos na biodegradação

As taxas de biodegradação do óleo são influenciadas principalmente pela temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH e níveis de oxigênio (Kennish, 1996). De acordo com Kennish, 1997, os alcanos de baixo peso molecular degradam-se rapidamente (em até uma semana), enquanto que os hidrocarbonetos de alto peso molecular (alifáticos e aromáticos) sofrem lenta degradação (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxas de biodegradação de algumas espécies de HPAs (USEPA, 2000)

Espécies	Número de anéis	Meia Vida (dias)
Naftaleno	2	14 – 320
Antraceno	3	~ 130
Fluoreno	3	37
Benzo(a)antraceno	4	1100
Pireno	4	238
Criseno	4	510
Benzo(a)pireno	5	> 1400

I- Temperatura – a temperatura influencia a biodegradação pelo efeito na natureza física e química do petróleo e também pela alteração na população microbiana. A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de temperatura relativamente grande, de 0^o a 70^oC (Sorkhoh *et al*, 1993). De modo geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos alcanos de cadeia curta é reduzido, o que leva a um processo de biodegradação mais lento. A atividade enzimática apresenta um melhor metabolismo para os hidrocarbonetos a uma temperatura máxima de 30-40^oC.

II- Nutrientes – o petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos, que podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de microorganismos. Porém, para que se processe a biodegradação há necessidade de outros nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, os quais são requeridos em maior quantidade. Há também a necessidade de micronutrientes tais como enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes e eles podem ser adicionados para estimular a biodegradação.

III- Outro fator a ser considerado no solo é a variação do pH com valores de 2,5 a 11 para diferentes tipos de solos. A maioria das bactérias e fungos apresentam uma melhor taxa de desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação com a correção do pH do solo (Verstraete *et al*, 1976; Bosset & Bartha, 1984; Rosato, 1997).

3.6- Dispersantes Químicos

Os dispersantes são formulações químicas de natureza orgânica, destinadas a reduzir a tensão superficial entre o óleo e a água, auxiliando a dispersão do óleo em gotículas no meio aquoso. São constituídos por ingredientes ativos, denominados surfactantes, cuja molécula é composta por uma cadeia orgânica, basicamente apolar, com afinidade por óleos e graxas (oleofílica) e uma extremidade de forte polaridade, com afinidade pela água (hidrofílica). Além dos surfactantes, os dispersantes também são constituídos por solventes da parte ativa que permitem a sua difusão no óleo (CETESB, 2003). No Brasil existe uma regulamentação para o uso dos dispersantes químicos que é a resolução do CONAMA nº 269 de 14 de setembro de 2000. Os dispersantes são, potencialmente, aplicáveis em situações de derrames de óleo, visando à proteção de recursos naturais e sócio-econômicos sensíveis como os ecossistemas costeiros e marinhos. Sua aplicabilidade, entretanto, deve ser criteriosamente estabelecida e aceita somente se resultar em menor prejuízo ambiental, quando comparado ao efeito causado por um derrame sem qualquer tratamento, ou empregado como opção alternativa ou, ainda, adicional à contenção e recolhimento mecânico no caso de ineficácia desses procedimentos de resposta. A eficiência do dispersante, entre outras considerações, está relacionada aos processos de intemperização do óleo no mar. Óleos intemperizados tornam-se mais viscosos e podem também sofrer emulsificação, o que diminui a eficiência desses agentes químicos. Dessa forma, caso seja pertinente à utilização do dispersante e considerando o cenário do derrame, sua aplicação, tanto quanto possível, deve ser realizada durante as operações iniciais do atendimento, criteriosa e preferencialmente nas primeiras 24 horas. Quando um dispersante é aplicado sobre uma mancha, as gotículas de óleo presentes são circundadas pelas substâncias surfactantes, estabilizando a dispersão (Figura 9), o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água. O dispersante reduz a tensão superficial entre a água e o óleo, auxiliando a formação de gotículas menores (Figura 9), as quais tendem tanto a se movimentar na coluna d'água, como permanecer em suspensão na

superfície, acelerando o processo natural de degradação e de dispersão, favorecendo desta forma a biodegradação.

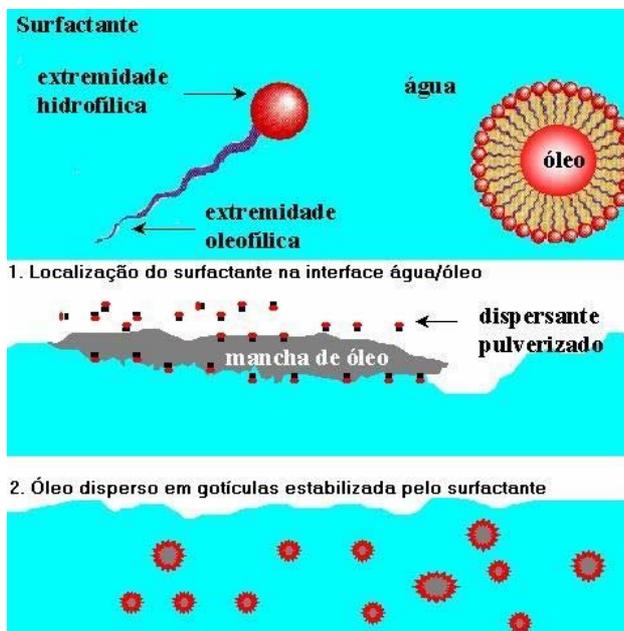


Figura 9 - Representação da ação do dispersante sobre uma mancha de óleo (IPIECA, 1993).

Os dispersantes, quando aplicados apropriadamente, podem ajudar a transferir para a coluna d'água um grande volume de óleo que estava na superfície, obtendo-se resultados com maior rapidez do que os métodos mecânicos de remoção. Os dispersantes, em geral, têm pouco efeito sobre óleos viscosos, pois há uma tendência do óleo se espalhar na água antes que os solventes e agentes surfactantes, componentes dos dispersantes, possam penetrar na mancha. A maioria dos produtos atualmente disponíveis possui efeito reduzido se aplicados quando o processo de intemperização já tiver sido iniciado e se a mancha estiver sob o aspecto de emulsão viscosa (“mousse de chocolate”).

Capítulo – II

Material e Métodos

4- Material e Métodos

4.1- O experimento e sítio de estudo

Para a realização desse estudo foi realizada uma simulação de derrame de óleo diesel, em um sítio localizado na Ilha dos Cavalos (Figura 10), a qual integra o Estuário da Lagoa dos Patos. Esse sítio foi escolhido devido ser uma região protegida de efeitos externos e segura para a execução de um derrame controlado de óleo diesel. Além disso, o sítio apresenta-se como um segmento ambiental representativo de toda a região estuarina da Lagoa dos Patos. Essa região possui vegetação do tipo Marisma que, de acordo com a classificação para diferentes ambientes costeiros, apresenta o maior índice de sensibilidade a derramamento de óleo e portanto estes ambientes são áreas de prioridade máxima de proteção (Gundlach & Hayes, 1987).

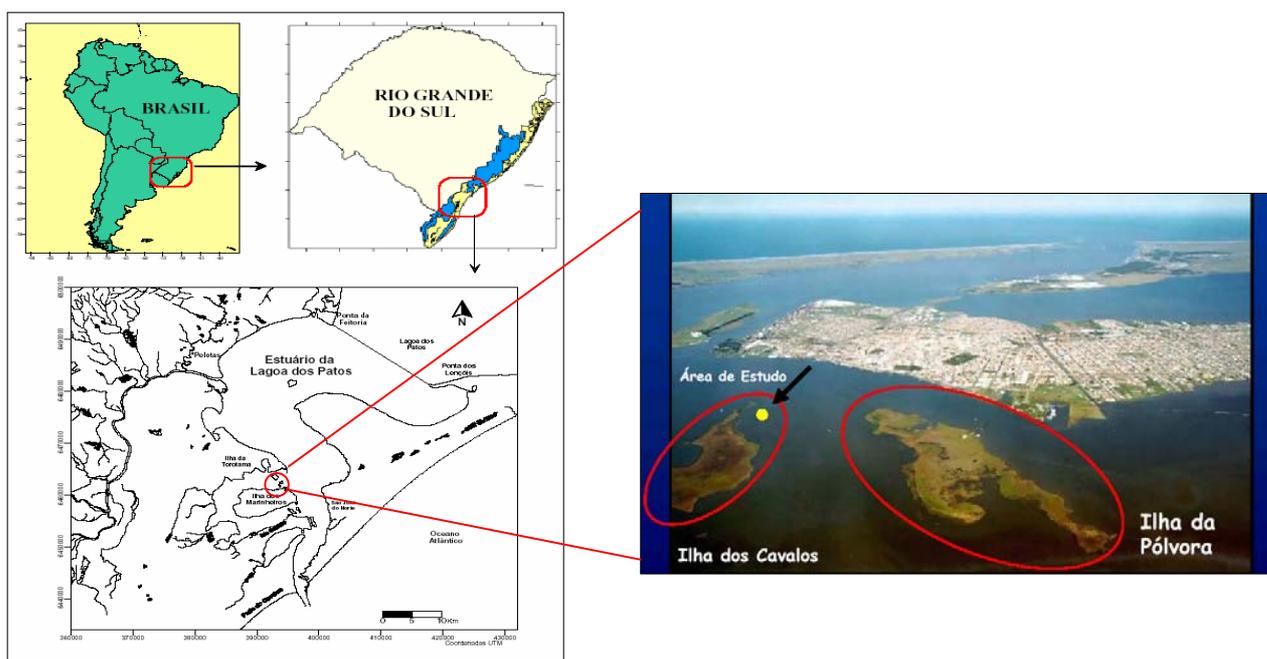


Figura 10- Mapa de localização do estuário da Lagoa dos Patos e localização da Ilha dos Cavalos

Foram construídas quatro caixas de um metro quadrado cada, de lâminas de aço inox de 60 centímetros de altura, sendo que 20 centímetros foram enterrados (Figuras 11 e 12). Logo após, foi efetuado um derrame de óleo diesel em cada uma das três caixas.

Em uma delas foi colocado um biossurfactante produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, em outra caixa foi adicionado um dispersante químico da marca X, enquanto a outra foi mantida apenas com o óleo para ser utilizada como controle.

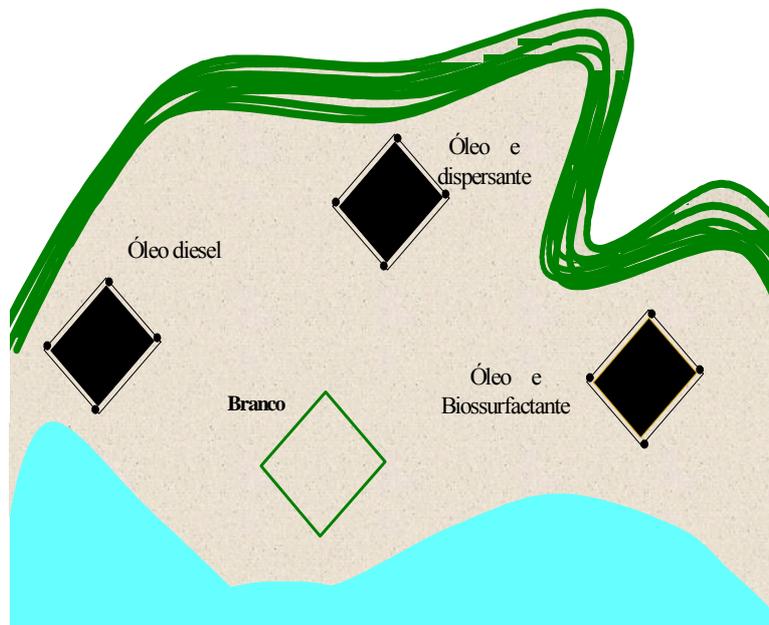


Figura 11- Esquema do experimento.



Figura 12- Local das caixas no ambiente em estudo

4.2- Tipo de óleo usado no experimento

Para este experimento, foram utilizados 4 litros de óleo diesel interior B (1 litro para cada caixa). O produto foi fornecido pela Refinaria de Petróleo Ipiranga S.A. (anexo 2) e apresentava as seguintes características básicas:

Massa específica a 20 °C, Kg/m³: 825,4

Enxofre (%): 0,036

Água e sedimentos: traços

Aspecto: límpido e isento de impurezas

Cinzas (%): 0,0020

De acordo com a USEPA (2001) este óleo é classificado como classe A, caracterizado por ser altamente fluido composto predominantemente de hidrocarbonetos de baixo peso molecular, que se espalham pela superfície da água. Este óleo é o mais utilizado como óleo combustível e é transportado por tráfego rodoviário (caminhões), ferroviário e hidroviário (menor escala).

4.3- Produção do biossurfactante pelo *Aspergillus fumigatus*

4.3.1- Fermentação em Estado Sólido

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 1000 mL, utilizando o microrganismo *Aspergillus fumigatus*. O meio fermentativo foi composto por casca e farelo de arroz desengordurado, que foram cedidos pela IRGOVEL – Indústria Riograndense de Óleos Vegetais. O farelo foi moído e peneirado, de onde foram recolhidas as partículas menores que 500 µm e maiores que 420 µm, Tyler 32 e 35, respectivamente. Além da casca e do farelo de arroz, também fizeram parte do meio fermentativo uma solução de nutrientes composta por MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, KH₂PO₄, extrato de levedura e peptona, como fonte de carbono também foi utilizado 1% de óleo diesel, fornecido pela Refinaria de Petróleo Ipiranga. A fermentação foi realizada por um período de 144 horas. As condições físico-químicas utilizadas nas fermentações foram, umidade de 50%, temperatura de 30 °C, pH 4,5 e concentração inicial de esporos de 4 x 10⁶ esporos/ g de meio.

4.4- Limpeza dos materiais e preparação dos reagentes

A vidraria utilizada foi previamente lavada com detergente especial (n-extran alcalino da Merck[®]), água destilada e a cetona P. A. e com n-hexano imediatamente antes do uso.

Para a montagem da coluna cromatográfica para realizar o “cleun up”, os reagentes inorgânicos, tais como sulfato de sódio (Na₂SO₄) e sílica (SiO₂), foram previamente calcinados em mufla a 400°C, por 6 horas, para a eliminação de resíduos orgânicos que pudessem interferir na realização dos testes.

Utilizou-se fragmentos de cobre metálico para eliminar o excesso de enxofre das amostras. O cobre foi limpo e ativado com uma solução de ácido clorídrico 3 N, posteriormente lavada com água destilada, álcool 99,6% e n-hexano, sendo armazenados até o momento da sua utilização imersos em n-hexano (Lima, 2004).

Foram realizados brancos de amostras para se verificar a pureza dos solventes orgânicos (diclorometano e n-hexano) e reagentes inorgânicos (Na₂SO₄, cobre ativado e sílica), bem como a limpeza da vidraria.

4.5- Amostragem de sedimento

O derrame do óleo diesel foi monitorado durante um período de seis meses. As amostras foram coletadas em intervalos crescentes de tempo: 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias, 120 dias, 150 dias e 180 dias após o início do experimento em 08 de outubro de 2003. As coletas para as análises microbiológicas foram avaliadas por um período de 90 dias, com datas de coletas 1 dia, 2 dias, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias, 60 dias e 90 dias após o início do experimento.

Na amostragem dos sedimentos foi coletada, sempre de forma aleatória, a parte superior da estrutura sedimentar (2-3 cm), a qual foi imediatamente acondicionada em recipientes específicos (vidro para os hidrocarbonetos e em saco plásticos para os nutrientes) e congeladas, conforme método descrito em Zanardi (1996).

4.6- Análise *in situ*

Durante as coletas foram feitas medidas de pH e Eh (potencial redox) no segmento superior do sedimento (\pm 2-3 cm). Para realizar as medidas do pH foi utilizado um eletrodo combinado de vidro tipo baioneta com um pHmetro digital marca Oakton[®]

(modelo pH6/00702-75, Acorn Series) e com leituras expressas em escala $\pm 0,01$. O potencial redox (Eh) eletrodo combinado de platina com leituras expressas em escala de ± 1 mV, previamente calibrado com padrões de pH 4 e 7.

4.7- Análise granulométrica e porosidade

A classificação granulométrica do sedimento foi efetuada através dos métodos tradicionais de peneiramento da fração grosseira e pipetagem da fração fina ($< 0,063$ mm) segundo procedimento descrito em Suguio (1973). Para as análises granulométricas as amostras foram inicialmente lavadas, para retirada dos sais, secas em estufa a 60° C e quarteadas. Os resultados obtidos da classificação granulométrica foram classificados em cascalho, areia, silte e argila através do *software SISGRAN*[®]. A porosidade foi feita no laboratório de sedimentologia da FURG, seguindo o método descrito por Hardisty (1990).

4.8- Contagem de bactérias e fungos

As bactérias foram inoculadas em profundidade, em placas de petri com Agar Plate Count, nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em duplicata. Estas foram incubadas por 48 h e então realizada a contagem nas placas que continham entre 20 e 250 colônias. Os cálculos da contagem das bactérias foram realizadas segundo ABNT (1997).

Os fungos inoculados por espalhamento em superfície, em placas de petri com Agar DRBC, nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em duplicata. Estes foram incubados entre 96 e 120 h e a contagem foi realizada a partir das 48 h nas placas que continham entre 10 e 100 colônias. Os cálculos da contagem dos fungos realizados segundo a ABNT (1997).

4.9- Análise dos nutrientes

Para a análise dos nutrientes: carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total, depois de realizada a coleta, o sedimento foi seco a uma temperatura 80° C, quarteado e macerado com o uso de um pistilo e graal de ágata.

4.9.1- Carbono orgânico total (COT)

O carbono orgânico total dos sedimentos foi analisado de acordo com o método de Strickland & Parsons (1972) e modificado por Gaudette *et al.* (1974).

Pesa-se 0,1 g de sedimento e adiciona-se ácido fosfórico e a solução é aquecida em chapa por 30 min, depois é adicionada uma solução oxidante (dicromato de potássio e ácido sulfúrico). Sendo novamente aquecida por mais 60 min. Após resfriar a solução é diluída com 50 mL de água destilada, adiciona-se o indicador (ferroína) e a solução é titulada com sulfato ferroso amoniacal. A quantidade de Cr não reduzida pela matéria orgânica é medida pela titulação. A padronização da solução titulante é feita com glicose e o carbono orgânico é dosado como carbono de glicose (C₆H₁₂O₆).

Para saber a precisão do método, as análises foram feitas em triplicata e encontrou-se uma precisão média de valores para as análises de COT. Os resultados são apresentados na forma de mg.kg⁻¹ ou % de carbono orgânico por peso seco da amostra de sedimento.

4.9.2- Nitrogênio total

Para a determinação do nitrogênio total foi usado o método Micro-Kjeldhal, segundo os procedimentos descritos em Bremner (1965). O conceito básico do método é o da digestão da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico e um catalisador, a fim de converter todo o nitrogênio orgânico a sulfato de amônio em solução. Alcalinizando-se a mistura, toda a amônia pode ser destilada com vapor d'água e o destilado alcalino que se obtém, é recebido por uma solução de ácido bórico, o qual pode ser titulado por ácido sulfúrico diluído. Os resultados são apresentados na forma de mg.kg⁻¹ ou % de nitrogênio total por peso seco da amostra de sedimento.

4.9.3- Fósforo total

Para o fósforo total as amostras de sedimento foram calcinadas a uma temperatura de 500 °C por 1 h e posteriormente digeridas com solução diluída de ácido clorídrico, segundo Ruttenberg (1992). A solução fica em constante agitação à temperatura ambiente. Depois de 16 horas de agitação são transferidos 5 mL para uma proveta e adicionados ácido ascórbico e molibdato de amônio. A determinação da concentração é

feita por colorimetria com a formação do complexo de fosfo-molibdato, com sua leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 885 nm, usando água como branco.

A precisão do método de P-total foi calculada através da reprodutibilidade, sendo as amostras feitas em triplicatas. Os resultados são apresentados na forma de mg.kg^{-1} ou % de fósforo total por peso seco da amostra de sedimento.

4.10- Análise dos hidrocarbonetos

As análises dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foram feitas no laboratório de geoquímica da Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) e no laboratório de química analítica ambiental e oleoquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e secas à temperatura máxima de 40 °C em placas de Petri, previamente lavadas. Uma parte da amostra foi separada e analisada a granulometria.

Os procedimentos utilizados nas análises dos hidrocarbonetos alifáticos e HPAs, neste trabalho, seguiram as recomendações do *Reference methods for pollution studies, n° 20: determinations of petroleum hydrocarbons in sediment* (UNEP, 1991).

Para a extração as amostras foram desagregadas em graal de ágata. Para realizar a extração foi utilizado 25 g de sedimento que foi levado a um extrator soxhlet e procedeu-se a extração com uma mistura de solventes n-hexano e diclorometano, ambos da marca *Malinkrodt*[®] - grau pesticida, por 8 horas. No balão foi adicionado pedaços de cobre metálico ativado até não se verificar mais oxidação do mesmo.

O extrato foi então concentrado em evaporador rotativo a vácuo até aproximadamente 2 mL. Para a separação dos hidrocarbonetos alifáticos (F1) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (F2) foi usado uma coluna cromatográfica que foi feita em coluna de vidro, a qual foi preenchida com lã de vidro, 2 g de sulfato de sódio, 3,2 g de sílica desativada (ativação foi feita com água, 5% do peso da sílica) e no topo mais 2 g de sulfato de sódio, com a finalidade de filtrar e reter a umidade do extrato.

Feita a separação dos extratos, cada fração foi novamente concentrada no evaporador rotativo a vácuo até 1 mL e o solvente foi seco, lentamente, em gás nitrogênio

(N₂). Junto com as extrações foi feita uma análise em branco dos reagentes para verificar a pureza dos solventes orgânicos e reagentes inorgânicos, assim como a limpeza da vidraria.

A determinação dos hidrocarbonetos alifáticos dos sedimentos foi efetuada por cromatografia gasosa (ionização de chama) em um equipamento com coluna OV-5 (60m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura inicial foi de 40 °C, com uma isoterma de 5 minutos, com aumento de 6 °C/min até 280 °C, permanecendo isotérmica por 25 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 280 °C. O volume injetado foi de 1 µL, com split de 1:32 e fluxo de 1 mL/min de gás hélio. A energia do detector foi de 1,5 keV. O limite de detecção do método foi estabelecido em 0,50 ng.g⁻¹ por composto.

A determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dos sedimentos foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa modelo QP5050A, marca Shimadzu[®], com coluna OV-5 (60m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura inicial foi de 120 °C, com aumento de 10 °C/min até 260 °C, em seguida com aumento de 3 °C/min até 280 °C, permanecendo isotérmica por 10 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 280 °C. O volume injetado foi de 1 µL, com split de 1:32 e fluxo de 1 mL/min de gás hélio. A energia do detector foi de 1,5 a 2 keV. O limite de detecção do método foi estabelecido em 0,50 ng.g⁻¹ por composto.

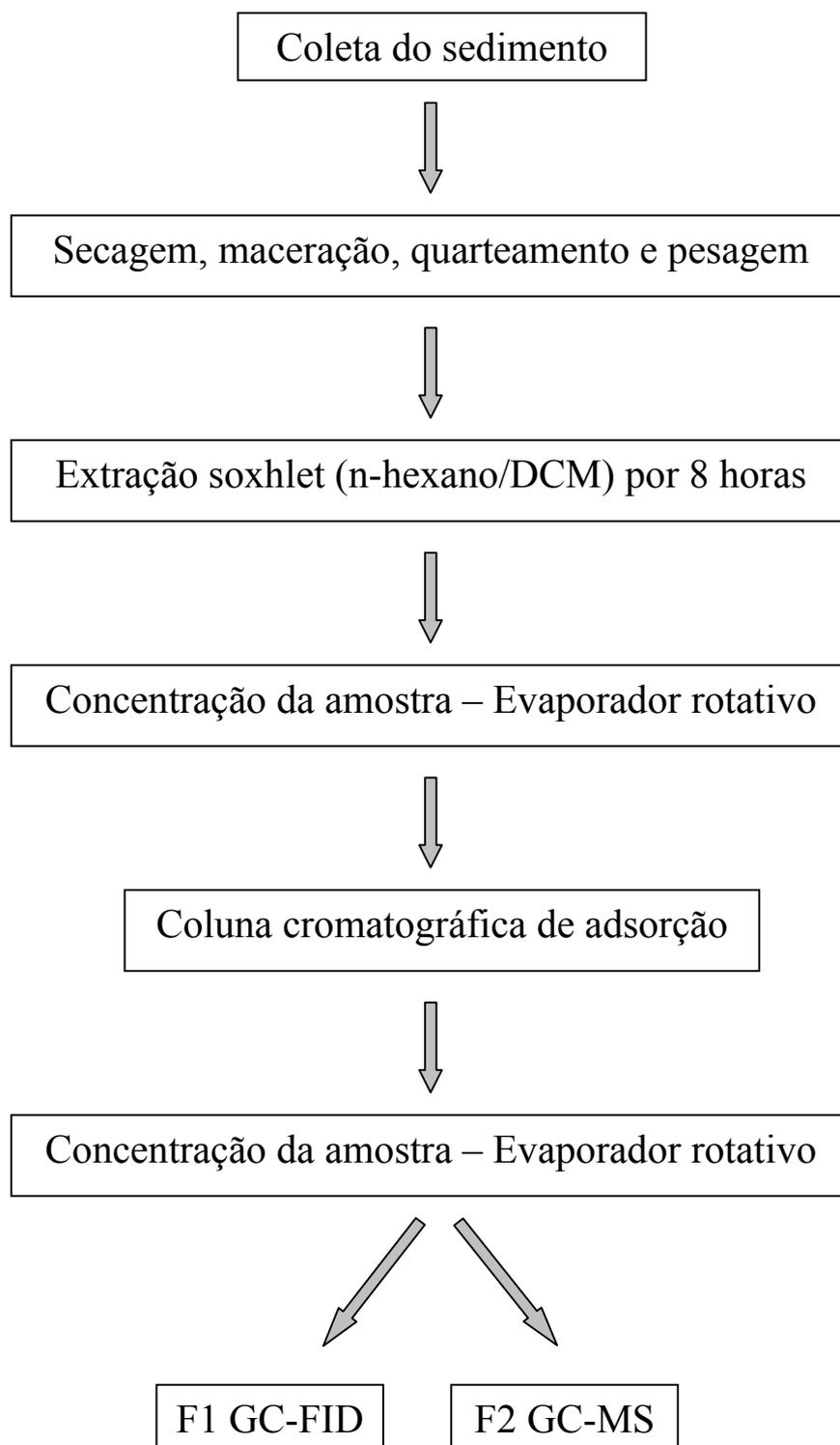
Na identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada através de injeção de padrões e comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos compostos padrões ou por comparação com os espectros da biblioteca de dados do equipamento. Os hidrocarbonetos alifáticos analisados foram de C₇ a C₃₄, ou seja, desde o hidrocarboneto com 7 átomos de carbono até hidrocarbonetos com 34 átomos de carbono.

A identificação dos hidrocarbonetos aromáticos foi realizada através de injeção de padrões e comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos compostos padrões ou por comparação com os espectros da biblioteca de dados do equipamento. A quantificação foi feita pela técnica de padronização interna, usando uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos deuterados. Os extratos foram diluídos em 300 a 5000 µL de diclorometano p.a. que continha padrão interno cromatográfico (bifenila) a 10 mg.L⁻¹. A quantificação foi realizada por cálculos de comparação de áreas de picos do analito com picos da bifenila e de padrões autênticos (bifenila marca Aldrich[®] e mistura dos 16 PAHs marca Sulpeco[®]). Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs)

investigados foram as 16 espécies classificadas como poluentes prioritários segundo a USEPA (Environmental Protection Agency of United States): Acenafteno, Acenaftleno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluorantreno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno (1,2,3-cd) pireno, Benzo(k) fluorantreno, Criseno, Dibenzo (a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno, Pireno.

Os resultados dos hidrocarbonetos alifáticos e dos HPAs foram expressos em μg do composto por kg de sedimento ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou ppb).

4.10.1- Esquema das análises dos hidrocarbonetos



4.11- Tratamento dos dados

Os parâmetros estatísticos foram calculados através de softwares (Excel[®], Statistica[®], usando ANOVA e teste Tukey), de acordo com os procedimentos convencionais.

Capítulo - III

Resultados e Discussão

5- Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir do experimento realizado, o que inclui a análise da granulometria e porosidade do sedimento, dos parâmetros físico-químicos: pH, Eh, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total, número de microrganismos, assim como dos hidrocarbonetos alifáticos e dos hidrocarbonetos aromáticos.

5.1- Análise granulométrica

A análise dos resultados da granulometria são apresentados na forma de valores médios de areia, silte e argila para cada caixa do experimento, sendo apresentados na Tabela 3 no tempo zero.

Tabela 3- Composição média (%) do solo acondicionado em cada uma das caixas usadas neste trabalho

Caixas	Areia	silte	argila	Total
Dispersante	72,50	15,94	11,56	100
Óleo	66,67	17,69	15,64	100
Biossurfactante	62,74	21,82	15,44	100

Com base nos dados apresentados na Tabela 3 efetuando-se a classificação granulometria dos sedimentos com emprego do diagrama textural de Shepard (1954), conforme mostrado na Figura 13. Observa-se que as granulometrias das três caixas apresentam características muito semelhantes com uma predominância da fácies areia siltica nas três caixas. Como as três caixas apresentam o mesmo tipo de granulometria considera-se que esse fator não produza, para fins desse trabalho, diferenças notáveis em relação a taxa de degradação dos hidrocarbonetos entre as diferentes caixas do experimento.

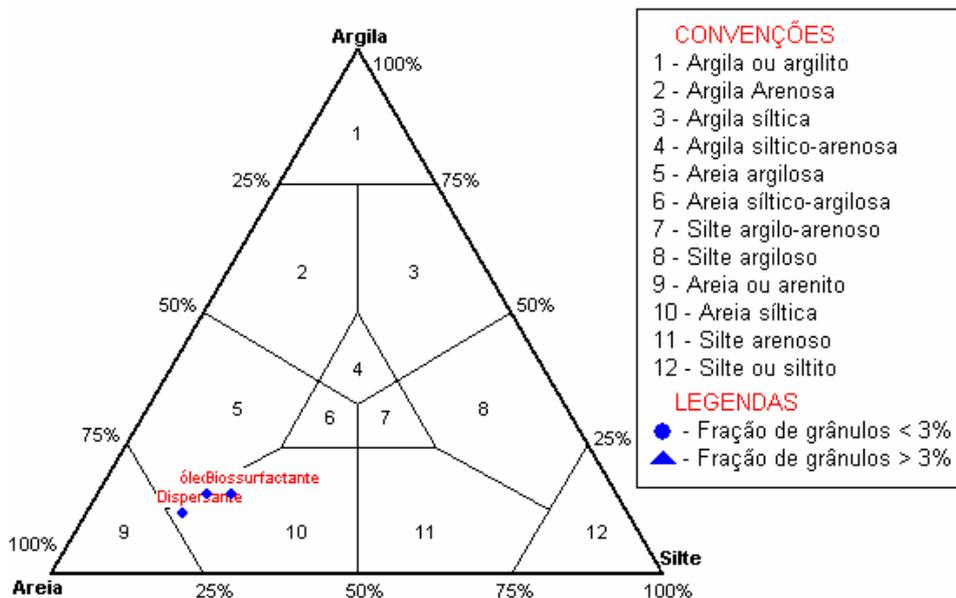


Figura 13 - Diagrama triangular de classificação granulométrica (Shepard, 1954) dos valores médios do sedimento da caixa do óleo, dispersante e biossurfactante.

Os solos de natureza arenosa são incorrentes, brandos e não são plásticos nem adesivos, enquanto que os solos argilosos são adesivos, plásticos e firmes. Os solos arenosos são pouco compressíveis, mas a maior porosidade dos solos argilosos torna-os mais susceptíveis à compressão. A estrutura do solo descreve o arranjo tridimensional de suas partículas, usualmente unidas em agregados. Os solos argilosos e orgânicos bem agregados e ricos em matéria orgânica apresentam maior porosidade e menor densidade aparente.

A porosidade representa a proporção de espaços vazios presente nos sedimentos, e a porosidade de sedimentos de praia estão na faixa de 0,36 a 0,40 (Hardisty, 1990). A porosidade deve ser levada em conta em questões que envolvam a infiltração e a compactação (Cabral, 2000). Estudos de predição de migração de óleo em solos arenosos salientam que a permeabilidade depende principalmente de propriedades geométricas do espaço do poro do solo (Kessler & Rubin, 1987).

A determinação da porosidade do solo das três caixas, ao final do experimento, apontou os valores de 0,46 para a caixa com óleo diesel, 0,43 para a caixa com dispersante químico e 0,88 para a caixa com o biossurfactante, enquanto a caixa branco apresentou porosidade 0,45. Os maiores valores de porosidade encontrados para a

caixa do biossurfactante, demonstram que o microrganismo do biossurfactante influenciou na estrutura do solo, aumentando seus poros e conseqüentemente diminuindo a densidade do solo e isso promoveu um comportamento diferente em relação à migração do óleo que porventura não tenha sido degradado.

5.2- Potencial hidrogeniônico (pH) e potencial redox (Eh)

Os dados relativos ao pH e potencial redox (Eh) são parâmetros muito importantes para o monitoramento dos sistemas marinhos, pois fornecem dados sobre as variações globais das condições ambientais geoquímicas e sobre a tendência da degradação dos componentes dos hidrocarbonetos do óleo.

Os valores das médias aritméticas de pH e do Eh dos sedimentos das três caixas (óleo, óleo + biossurfactante e óleo + dispersante) e no sedimento “branco”, juntamente com os desvios-padrão, valores mínimos e máximos são apresentados na Tabela 4 e 5.

Os resultados mostram que os sedimentos apresentam características ácidas, acentuando-se ao final do experimento. Esse fato foi verificado com mais intensidade para as caixas com dispersante químico e somente com óleo diesel. De acordo com Dibble & Bartha, 1979 a biodegradação ocorre com maior eficiência na faixa de pH 7,5 a 7,8. Delaune (1981) e Hambrick (1980) verificaram que o pH afeta a degradação, principalmente dos HPAs. As taxas de biodegradação de HPAs diminuíram quando o pH original (8,0) foi alterado para 5,0; 6,5; 9,0.

A manutenção do pH dos sedimentos com caráter ácido, verificado durante todo o período do experimento, provavelmente tenha sido um fator de grande influência no pouco desenvolvimento das bactérias e na proliferação do fungo inoculado na caixa do biossurfactante, onde os fungos apresentam seu melhor desenvolvimento em faixas ácidas de pH. Verstraete *et al* (1976) recomenda uma correção do pH do solo, que poderia ocasionar o dobro da taxa de biodegradação.

Tabela 4– Resultado do pH durante o experimento por 180 dias

dias \ pH	Branco	Óleo	Dispersante	Biossurfactante
1 ^o	5,5	5,6	5,4	5,3
2 ^o	5,4	5,6	5,3	5,3
3 ^o	5,5	5,7	5,3	5,4
4 ^o	5,3	5,9	5,2	5,4
15 ^o	5,3	4,9	4,8	5,2
30 ^o	5,2	5,4	5,2	5,3
60 ^o	5,3	5,5	5,3	5,2
90 ^o	5,3	5,5	5,2	5,3
150 ^o	5,1	5,0	4,9	5,3
180 ^o	5,1	3,4	3,4	4,0
Mínimo	5,1	3,4	3,4	4,0
Máximo	5,5	5,9	5,4	5,4

O potencial de oxidação-redução (potencial redox) dos solos mede o seu estado de oxidação. Nos solos bem arejados os microrganismos oxidam a matéria orgânica. Os parâmetros estatísticos de Eh apresentados na Tabela 5 mostram que os sedimentos apresentam condições fortemente oxidantes. Isto é um fator que influencia a taxa de degradação do óleo diesel, pois quanto mais oxidante o sedimento mais rápido é a sua degradação do óleo.

Por exemplo, cerca de 85 mil toneladas de solo contaminado com gasolina, petróleo e graxa proveniente de uma planta de combustível de Toronto foram descontaminadas envolvendo o solo em plástico e em seguida bombeando ar, água e fertilizante, com o objetivo de promover a multiplicação da população de bactérias aeróbicas e conseqüentemente eliminar os hidrocarbonetos, este processo durou apenas três meses (Baird, 2002).

Tabela 5– Resultados Eh (potencial redox) durante o experimento por 180 dias

Eh \ Dias	Branco	Óleo	Dispersante	Biossurfactante
1º	74	68	77	74
2º	73	65	78	75
3º	73	65	79	75
4º	75	44	86	75
15º	76	103	110	77
30º	71	67	84	80
60º	77	88	89	77
90º	80	85	91	81
150º	121	108	116	90
180º	120	199	199	167
Mínimo	71	44	77	74
Máximo	121	199	199	167

5.3- Monitoramento microbiológico

O acompanhamento microbiológico foi desenvolvido pelo laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG num período de 90 dias, com o objetivo de observar o impacto do derrame sobre a microbiota e sua eventual contribuição na degradação dos hidrocarbonetos. O procedimento foi realizado neste intervalo de tempo porque ao final deste período foi atingida a estabilização da microbiota do ambiente estudado.

Os dados quantitativos mostram como ocorreu a distribuição dos fungos (bolores e leveduras) e bactérias durante o experimento, porém muitas vezes foram utilizados dados qualitativos para uma melhor caracterização da situação da microbiota nativa do sedimento. Em alguns casos a contagem de fungos permanecia constante, porém apenas uma determinada espécie predominava. A Tabela 6 apresenta os resultados quantitativos das contagens de fungos e bactérias durante os 90 dias de coleta, em cada um dos experimentos.

Tabela 6- Contagem de fungos e bactérias em cada um dos ensaios

Experimento	Microrganismo (ufc/g)	1 dia	28 dias	90 dias
Branco	Bolores	$2,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
	Leveduras	$1,3 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$
	Bactérias	$5,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$8,4 \times 10^4$
Diesel	Fungos	$6,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$
	Bactérias	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
Biossurfactante	Fungos	$4,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
	Bactérias	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
Dispersante	Bolores	$2,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
	Leveduras	$6,6 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$
	Bactérias	$4,2 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$

5.3.1- Experimento com óleo diesel

Observa-se que a quantidade de bactérias foi afetada nos primeiros 30 dias de experimento, provavelmente este impacto foi ocasionado pela toxicidade que o óleo diesel representada a estes microrganismos Martins (2005).

Avaliando os dados somente de forma quantitativa observa-se que o óleo diesel não teve um impacto grande sobre a microbiota fúngica, porém ao fazer uma análise qualitativa, observou-se que uma determinada espécie de fungo filamentosos branco predominou durante os primeiros 30 dias do experimento, período que o solo esteve mais impactado com o derrame. Após este tempo, o solo começou a regenerar e a microbiota passou a se assemelhar a existente na caixa controle

5.3.2- Experimento com o biossurfactante

Neste experimento foi utilizado o farelo fúngico juntamente com o biossurfactante. Durante a contagem observou-se o domínio quase que total do *Aspergillus fumigatus* sobre outros fungos, os demais fungos da microbiota local foram inibidos pela grande concentração deste microrganismo. Mesmo depois de 90 dias, a concentração de *A. fumigatus* continuou expressiva, demonstrando que esta cepa é resistente a hidrocarbonetos e às oscilações das condições ambientais (Martins, 2005).

5.3.3- Experimento com o dispersante químico

Esse experimento mostrou que os bolores foram inibidos pelo óleo diesel e o dispersante químico apenas do período inicial até 30 dias. Após este período a microbiota natural começou a se regenerar e ultrapassou a contagem da caixa controle. Segundo Providenti *et al* (1993) os derivados do petróleo são deficientes em nitrogênio e fósforo e desta forma prejudicam o crescimento de microrganismos.

5.4- Análise dos nutrientes- COT, nitrogênio total e fósforo total

Os solos possuem naturalmente uma grande quantidade de microorganismos: bactérias, fungos, protozoários entre outros. Estes microorganismos precisam de uma fonte de carbono para o crescimento celular, assim como de uma fonte de energia além de nitrogênio e fósforo para a manutenção das funções metabólicas necessárias para o crescimento.

A análise dos nutrientes mostra-se extremamente relevante porque determina se existe a necessidade de suprir a sua falta e, caso deficientes, a correção dos níveis possibilita a criação de ambiente ideal à biodegradação.

Deve-se ressaltar a importância inicial do ambiente onde ocorre o desenvolvimento dos microrganismos, em virtude das forças que atuam na dinâmica da população e a influência destas sobre o ambiente dependerem das propriedades químicas e físicas do solo.

Embora o óleo diesel seja uma fonte de carbono para os microrganismos, não fornece outros nutrientes como nitrogênio e fósforo, que também são necessários. A falta destes nutrientes determina que a taxa de degradação biológica pode ser severamente afetada (NAS, 1985).

5.4.1-Carbono orgânico total

O carbono orgânico constitui o elemento fundamental da matéria orgânica dos solos uma vez que é composta por cerca de 60 % desse elemento, enquanto os demais elementos perfazem o restante. O atributo matéria orgânica nas análises de solo, na verdade é o resultado de uma análise de carbono orgânico multiplicada por aproximadamente 1,72, ou seja, o carbono orgânico e a matéria orgânica são, para a maioria dos casos considerados termos de mesmo significado.

Quando uma molécula do óleo chega ao solo, ela pode sofrer os processos de degradação e sorção, e os resultados destes dois processos podem ser: a absorção da molécula pelas plantas, a lixiviação da molécula para camadas subsuperficiais do solo, podendo atingir os cursos de água subterrâneos.

Inicialmente os solos contaminados no experimento apresentaram concentração de matéria orgânica mais alta, em relação ao solo não contaminado (Tabela 7). As amostras com os mais altos níveis de carbono orgânico foram aquelas que apresentaram os maiores teores dos hidrocarbonetos alifáticos em estudo.

A adição de óleo diesel ao ambiente em estudo, acarretou claramente um aumento no teor de carbono (Tabela 7), conforme comparação com os resultados dos tratamentos com o ensaio em branco. Os teores de carbono obtidos da caixa que continha o óleo diesel apresentaram quedas significativas nos dois primeiros dias e depois de 30 dias do início do experimento.

A diminuição da taxa de carbono é atribuída a perda por evaporação que se constitui em um dos processos de intemperização mais importantes na redução do volume do óleo derramado durante as primeiras 24-48 horas. Esse processo é responsável por cerca de 75 a 100% da remoção de muitos componentes leves, como por exemplo, a fração gasolina e a querosene. A radiação solar, quanto maior a incidência, maior é o aumento do processo evaporativo, pois aumenta a temperatura ambiente (CETESB, 2003).

Durante o período do experimento as precipitações pluviométricas apresentaram-se muito abaixo dos níveis normais (anexo 5), o que contribuiu para o aumento da temperatura ambiente e, por conseqüência, a elevação da taxa de evaporação e na diminuição do carbono no experimento com óleo.

Tabela 7- Resultados de carbono orgânico total, em porcentagem, para cada experimento

Tratamentos	Dias	p (<0,05)	Teor de Carbono (%)
Óleo	0		3,08 ±0,07
Óleo	1	0,0179	1,60 ±0,09
Óleo	2	0,2912	2,00 ±0,10
Óleo	3	0,9902	3,74 ±0,10
Óleo	15	0,9990	2,76 ±0,01
Óleo	30	0,0192	1,92 ±0,10
Óleo	60	0,0125	1,88 ±0,04
Óleo	90	0,0311	1,80 ±0,10
Óleo	120	0,0002	1,48 ±0,03
Óleo	150	0,0527	2,00 ±0,01
Óleo	180	0,8646	2,40 ±0,04
Dispersante	0	1,0000	3,18 ±0,10
Dispersante	1	1,0000	3,02 ±0,10
Dispersante	2	1,0000	3,10 ±0,08
Dispersante	3	0,9999	3,22 ±0,03
Dispersante	15	0,1785	2,90 ±0,08
Dispersante	30	0,0125	2,18 ±0,05
Dispersante	60	0,0864	1,90 ±0,01
Dispersante	90	0,0024	2,08 ±0,04
Dispersante	120	0,0001	1,74 ±0,003
Dispersante	150	0,0291	1,68 ±0,003
Dispersante	180		1,96 ±0,003
Biossurfactante	0		3,20 ±0,10
Biossurfactante	1	0,1879	2,00 ±0,02
Biossurfactante	2	0,9952	2,50 ±0,02
Biossurfactante	3	0,9996	2,60 ±0,02
Biossurfactante	15	1,0000	2,80 ±0,003
Biossurfactante	30	0,9211	2,20 ±0,09
Biossurfactante	60	0,1156	2,00 ±0,03
Biossurfactante	90	0,0766	2,80 ±0,03
Biossurfactante	120	0,7311	2,20 ±0,03
Biossurfactante	150	0,0030	1,60 ±0,003
Biossurfactante	180	1,0000	2,60 ±0,07
Branco	0		2,32
Branco	15		1,76
Branco	30		1,84
Branco	60		1,94
Branco	90		1,90

Em relação ao experimento realizado na caixa que continha o óleo diesel com o dispersante, o carbono apresentou queda significativa somente a partir do primeiro mês. Verificou-se no ambiente com presença do dispersante, que este afetou de forma significativa o desenvolvimento dos fungos, formando-se no local grande quantidade de leveduras, que influenciaram no teor de carbono orgânico inicial e no processo de biodegradação (Martins *et al*, 2004).

No que refere ao carbono do experimento realizado na caixa com o biossurfactante, verificou-se que não houve queda significativa ao longo do tempo do experimento, somente no 5º mês, ou seja, 150 dias após o início das coletas. O biossurfactante foi produzido em escala de laboratório pelo fungo *Aspergillus fumigatus* e foi introduzido na caixa. Na tentativa de criar um meio ideal para que este microrganismo aumentasse a produção do biossurfactante, foi colocado um substrato (casca de arroz) e isto não permitiu a diminuição do teor de carbono em comparação com os outros experimentos.

Comparando os três experimentos entre si, verifica-se que o teor de carbono orgânico do experimento onde só foi adicionado óleo diesel, foi significativamente menor que os demais, nos três primeiros dias iniciais de coleta. Esse fato mostra uma influência da adição do dispersante e do biossurfactante nas taxas de carbono orgânico no experimento, provavelmente pela sorção das moléculas do solo a estes compostos adicionados. No decorrer do experimento as diferenças entre os tratamentos não são significativas.

5.4.2- Nitrogênio total

O solo é uma estrutura complexa formada por elementos sólidos (argila, areia, fragmentos de rocha, restos orgânicos e entre outros) líquidos (água) e gasosos (nitrogênio, oxigênio e outros).

Sob condições favoráveis de temperatura e nutrientes, a biodegradação pode recuperar o solo contaminado por derrames de petróleo. Os nutrientes nitrogênio e fósforo são necessários para o bom desenvolvimento dos microrganismos do solo, e seus teores devem ser suficientes para que possam desempenhar sua função na recuperação de áreas degradadas.

Os resultados de nitrogênio orgânico total da caixa com óleo e da caixa com dispersante químico apresentaram um aumento significativo nos três primeiros dias do experimento (Tabela 8). Porém depois de 30 dias do experimento a micro biota começou a

se regenerar, com isso contribuiu para o consumo de nitrogênio, conforme Martins *et al*, 2004.

O nitrogênio da caixa do biossurfactante apresentou queda significativa no 1º dia do experimento e depois de 150 dias. Mas no restante do experimento não apresentou diferença significativa. Observa-se que a partir do 15º dia houve um crescimento muito grande do fungo *Aspergillus fumigatus*, ocasionando uma inibição no crescimento de outros fungos e bactérias neste local. Depois de três meses, a flora bacteriana ainda não estava restabelecida, pois o fungo *Aspergillus fumigatus* ainda predominava.

Tabela 8- Resultados de nitrogênio total, em porcentagem, para cada experimento.

Tratamentos	dias	p (<0,05)	Teor de Nitrogênio (%)
Óleo	0		0,10 ±0,007
Óleo	1	0,3038	0,16 ±0,001
Óleo	2	0,0002	0,21 ±0,000
Óleo	3	0,0001	0,23 ±0,002
Óleo	15	0,7863	0,14 ±0,070
Óleo	30	1,0000	0,12 ±0,000
Óleo	60	1,0000	0,10 ±0,030
Óleo	90	1,0000	0,11 ±0,005
Óleo	120	0,9999	0,08 ±0,004
Óleo	150	0,9690	0,13 ±0,003
Óleo	180	0,8359	0,19 ±0,000
Dispersante	0		0,14 ±0,002
Dispersante	1	0,0322	0,21 ±0,001
Dispersante	2	1,0000	0,12 ±0,000
Dispersante	3	0,0277	0,21 ±0,010
Dispersante	15	0,9999	0,12 ±0,001
Dispersante	30	0,9999	0,12 ±0,001
Dispersante	60	0,9634	0,11 ±0,003
Dispersante	90	0,1936	0,09 ±0,005
Dispersante	120	0,1168	0,08 ±0,001
Dispersante	150	1,0000	0,13 ±0,005
Dispersante	180	1,0000	0,14 ±0,000
Biossurfactante	0		0,19 ±0,001
Biossurfactante	1	0,0031	0,11 ±0,002
Biossurfactante	2	1,0000	0,18 ±0,001
Biossurfactante	3	1,0000	0,18 ±0,000
Biossurfactante	15	0,9962	0,17 ±0,003
Biossurfactante	30	0,1247	0,13 ±0,001
Biossurfactante	60	0,3898	0,14 ±0,008
Biossurfactante	90	0,9983	0,22 ±0,002
Biossurfactante	120	0,9782	0,16 ±0,002
Biossurfactante	150	0,0160	0,12 ±0,002
Biossurfactante	180	1,0000	0,21 ±0,002
Branco	0		0,23
Branco	15		0,16
Branco	30		0,19
Branco	60		0,15
Branco	90		0,17

5.4.3- Fósforo total

Como os microrganismos requerem nitrogênio e fósforo para incorporar na biomassa, o aproveitamento destes nutrientes do solo com derrame é um fator crítico para sua possível degradação. Quando necessário é possível a aceleração deste processo pela adição de uréia, fosfatos, fertilizantes do tipo NPK. Portanto, é por isso importante o conhecimento desta necessidade no meio degradado.

Em relação ao ensaio em branco os teores de fósforo total no experimento da caixa do óleo tiveram variações significativas, diminuindo inicialmente para depois aumentar e manter-se sempre com teores menores do que os do solo sem derrame (Tabela 9). O fósforo total do experimento da caixa do dispersante químico teve um aumento significativo no 1º dia, mantendo-se semelhante ao ensaio em branco, durante o experimento, com médias de 0,28 e 0,31, respectivamente.

Já a média do teor de fósforo total na caixa com biossurfactante foi maior do que na caixa do branco. Esse fato pode ser explicado, visto que tanto o biossurfactante, quando o substrato adicionado apresenta fósforo na sua formulação. Comparando os três experimentos, verifica-se que os ambientes analisados tiveram comportamento diferente entre si. O maior teor de fósforo total verifica-se na caixa com biossurfactante e o menor na caixa com óleo diesel.

Tabela 9- Resultados de fósforo total, em porcentagem, para cada experimento.

Tratamentos	dias	P (<0,050)	Teor de Fósforo (%)
Óleo	0		0,11 ±0,00
Óleo	1	0,0025	0,21 ±0,01
Óleo	2	0,0001	0,34 ±0,05
Óleo	3	0,0001	0,27 ±0,01
Óleo	15	0,0013	0,21 ±0,01
Óleo	30	0,0813	0,19 ±0,01
Óleo	60	0,3650	0,17 ±0,003
Óleo	90	0,0001	0,24 ±0,005
Óleo	120	1,0000	0,12 ±0,005
Óleo	150	0,1787	0,18 ±0,001
Óleo	180	0,0001	0,26 ±0,01
Dispersante	0		0,27 ±0,01
Dispersante	1	1,0000	0,33 ±0,05
Dispersante	2	0,0037	0,36 ±0,01
Dispersante	3	0,9978	0,23 ±0,01
Dispersante	15	1,0000	0,26 ±0,001
Dispersante	30	0,9728	0,31 ±0,002
Dispersante	60	1,0000	0,26 ±0,002
Dispersante	90	0,9881	0,31 ±0,005
Dispersante	120	0,9999	0,25 ±0,001
Dispersante	150	1,0000	0,25 ±0,003
Dispersante	180	0,9776	0,31 ±0,005
Biossurfactante	0		0,44 ±0,01
Biossurfactante	1	0,0001	0,31 ±0,02
Biossurfactante	2	0,2784	0,37 ±0,02
Biossurfactante	3	1,0000	0,43 ±0,005
Biossurfactante	15	0,0575	0,35±0,002
Biossurfactante	30	0,0002	0,31±0,002
Biossurfactante	60	0,1600	0,36 ±0,005
Biossurfactante	90	0,2209	0,35 ±0,01
Biossurfactante	120	0,1661	0,32 ±0,03
Biossurfactante	150	0,0001	0,30 ±0,02
Biossurfactante	180	0,1541	0,36 ±0,01
Branco	0		0,36
Branco	15		0,26
Branco	30		0,25
Branco	60		0,34
Branco	90		0,35

O estudo da variação da concentração dos nutrientes no experimento desse trabalho permitiu verificar alguns aspectos que serão sintetizados a seguir.

O derrame de óleo diesel no local estudado, produziu um aumento no teor de carbono orgânico, com menores teores para o experimento em que tinha apenas óleo. Em relação ao nitrogênio houve uma diminuição para os três experimentos, já para o fósforo houve uma diminuição para o experimento na caixa com óleo diesel e na caixa com dispersante químico. No ambiente onde foi adicionado o biossurfactante, o teor de fósforo aumentou, devido à sua suplementação através de biossurfactante + substrato (farelo de arroz).

5.5- Análise dos resultados de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos e os hidrocarbonetos aromáticos tem sido motivo de importantes estudos ambientais em todo mundo. No Brasil os estudos de natureza ambiental dos hidrocarbonetos estão concentrados especialmente na região sudeste do país (Weber & Bicego, 1987; Bicego, 1988; Zamboni, 1993; Reynier *et al.*, 1993; Milanelli, 1994; Zanardi, 1996; Lopes *et al.*, 1997; Badaró-Pedroso, 1999; Mariuzzo, 1999; Lourenço, 2003), ou algumas pesquisas no estado do Paraná (Nicodem *et al.*, 1997; Nicodem, 1998; Nicodem, 2001; Guedes *et al.*, 2003).

Porém, nos últimos anos, a FURG tem desenvolvido trabalhos na área ambiental a respeito dos hidrocarbonetos alifáticos e dos HPAs na região sul do Rio Grande do Sul, tais como, Zamboni, 2000; Baisch *et al.*, 2000; Lima, 2003; Cordeiro, 2003; Garcia, 2004; Bento *et al.*, 2004.

Estes trabalhos mostram grande importância, pois apresentam o background do ambiente e os comparam com outros lugares do mundo. Este estudo está na Tabela 10, que indica o local pesquisado, o ano da coleta dos sedimentos, a concentração mínima e máxima de HPAs totais com o número de HPAs utilizados no somatório entre parênteses e a fonte bibliográfica dos dados (Mora & Sheikholeslami, 2002, Fillmann, 2001).

Tabela 10 : Comparação dos dados mundiais de HPAs totais expressos em ng/g de peso seco

Área	Ano	Concentrações mín - máx (ng.g⁻¹ de peso seco)	Referências
França, Mar Mediterrâneo	1996	36 - 6900 (18 HPAs)	Baumart <i>et al.</i> , 1998
Espanha, Mar Mediterrâneo	1996	1.2 - 8400 (18 HPAs)	Baumart <i>et al.</i> , 1998
Baía de Guanabara, Rio de Janeiro	1995	1570 - 18440 (23 HPAs)	Lima, 1997
North-West Coast, Mar Mediterrâneo	1991	86.5 - 48090 (14 HPAs)	Benlahcen <i>et al.</i> , 1997
North Western, Golfo	1991-93	< 20 - 4740 (13 HPAs)	Readman <i>et al.</i> , 1996
Baía San Quintin, México	1992	N.D - < 50 (44 HPAs)	Galindo <i>et al.</i> , 1996
Porto de Xiamen, China	1993	70 - 33000 (9 HPAs)	Hong <i>et al.</i> , 1995
Victoria Harbour, Hong Kong	1992	350 - 3450 (9 HPAs)	Hong <i>et al.</i> , 1995
Mar Báltico	1993	9.5 - 1871 (15 HPAs)	Witt, 1995
Baía Saratosa, Florida, USA	-	17 - 26771 (11 HPAs)	Sherblom <i>et al.</i> , 1995
Western Coast, Austrália	1991	1.0 - 3200 (11 HPAs)	Burt and Ebell, 1995
Costa da Itália, Mar Adriático	1990	27 - 527 (9 HPAs)	Guzzella and DePaolis, 1994
Rio Reno, France, Mar Mediterrâneo	1985-86	1070 - 6330 (15 HPAs)	Bouloubassi and Saliot, 1993
Lago Burley Griffin, Australia	1989	80 - 538 (8 HPAs)	Leeming and Maher, 1992
Plataforma Continental, Tabasco, Mexico	1989	454 - 3120 (15 HPAs)	Botello <i>et al.</i> , 1991
Rio Danúbio	1992	< 10 - 3700 (4 HPAs)	Equipe Cousteau, 1993
Coastline, Mar Negro, Ucrânia	1995	7.2 - 126 (17 HPAs)	Readman <i>et al.</i> , 1999
Danube Coastline, Mar Negro, Ucrânia	1995	30.3 - 604 (17 HPAs)	Readman <i>et al.</i> , 1999
Golfo de Trieste, Italia	1996	30 - 600 (22 HPAs)	Notar <i>et al.</i> , 2001
Mar Negro	1988	12 - 2400 (28 HPAs)	Wakeham, 1996
Mar Branco, Russia	1994	13 - 208 (27 HPAs)	Savinov <i>et al.</i> , 2000
Mar Caspio, Azerbaijão	2000	320 - 3109 (37 HPAs)	Mora & Sheikholeslami 2002
Mar Caspio, Russia	2000	1339 - 7714 (37 HPAs)	Mora & Sheikholeslami 2002
Mar Caspio, Irã	2001	72 - 954 (37 HPAs)	Mora & Sheikholeslami 2002
Mar Caspio, Kazakhstan	2001	35 - 681 (37 HPAs)	Mora & Sheikholeslami 2002
Estuário da Laguna dos Patos, Brasil	1998-00	50 - 11720 (23 HPAs)	Zamboni, 2000
Estuário da Laguna dos Patos, Brasil	1999-00	49 - 72 (15 HPAs)	Baisch, 2000
Estuário da Laguna dos Patos, Brasil	2001-02	ND - 631 (16 HPAs)	Cordeiro, 2003
Estuário da Lagoa dos Patos, Brasil	2003	ND - 10451 (16 HPAs)	Garcia, 2004
Presente trabalho		Concentrações µg.Kg⁻¹	
Estuário da Laguna dos Patos, Brasil	2005	422,39 (16 HPAs)	Caixa com óleo diesel
Estuário da Laguna dos Patos, Brasil	2005	489,76 (16 HPAs)	Caixa com dispersante
Estuário da Lagoa dos Patos, Brasil	2005	1224,76 (16 HPAs)	Caixa com biossurfactante

Analisando os resultados da concentração do Σ 16 HPAs depois de 180 dias da simulação do derrame, pode-se observar que nas caixas com óleo diesel e com dispersante químico a concentração final mostrou-se baixa frente aos outros ambientes.

No que se refere à caixa do biossurfactante, a concentração final do Σ 16 HPAs encontrada após 180 dias é maior do que os valores apresentados, por exemplo, por Baisch *et al* (2000) e Cordeiro (2003) para sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos.

5.5.1- Análise dos cromatogramas

A análise dos cromatogramas obtidos permitiu realizar a análise das diferentes mudanças ocorridas nos cromatogramas ao longo do tempo. Assim, este item destina-se a comparar os cromatogramas ao longo do tempo verificando qualitativamente os hidrocarbonetos alifáticos e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

5.5.1.1- Evolução da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos

A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos ao longo do tempo foi realizada de forma individualizada, observando a evolução dos cromatogramas em cada uma das caixas utilizadas no experimento.

a) Caixa do óleo diesel

Os cromatogramas do 1º dia do experimento (Figura 14) demonstram que ocorreu alta concentração dos hidrocarbonetos alifáticos com picos bem resolvidos, não sendo ainda verificada a formação de UCM - mistura complexa não resolvida. A ocorrência da mistura complexa não resolvida é fator indicativo da existência efetiva da degradação, fato este que não ocorreu na primeira coleta feita logo depois da simulação do derrame.

Além disso, neste primeiro momento foi possível observar a presença de hidrocarbonetos de cadeia longa ($> C_{25}$) e número de carbonos ímpares, atribuídos a compostos que se originam de plantas terrestres, tais como, C_{27} , C_{29} e C_{31} (Volkman *et al*, 1992; Medeiros, 2000). Esses compostos já faziam parte do ambiente natural em que foram colocadas às caixas. A presença destes hidrocarbonetos é observada nas três caixas durante todo o período do experimento.

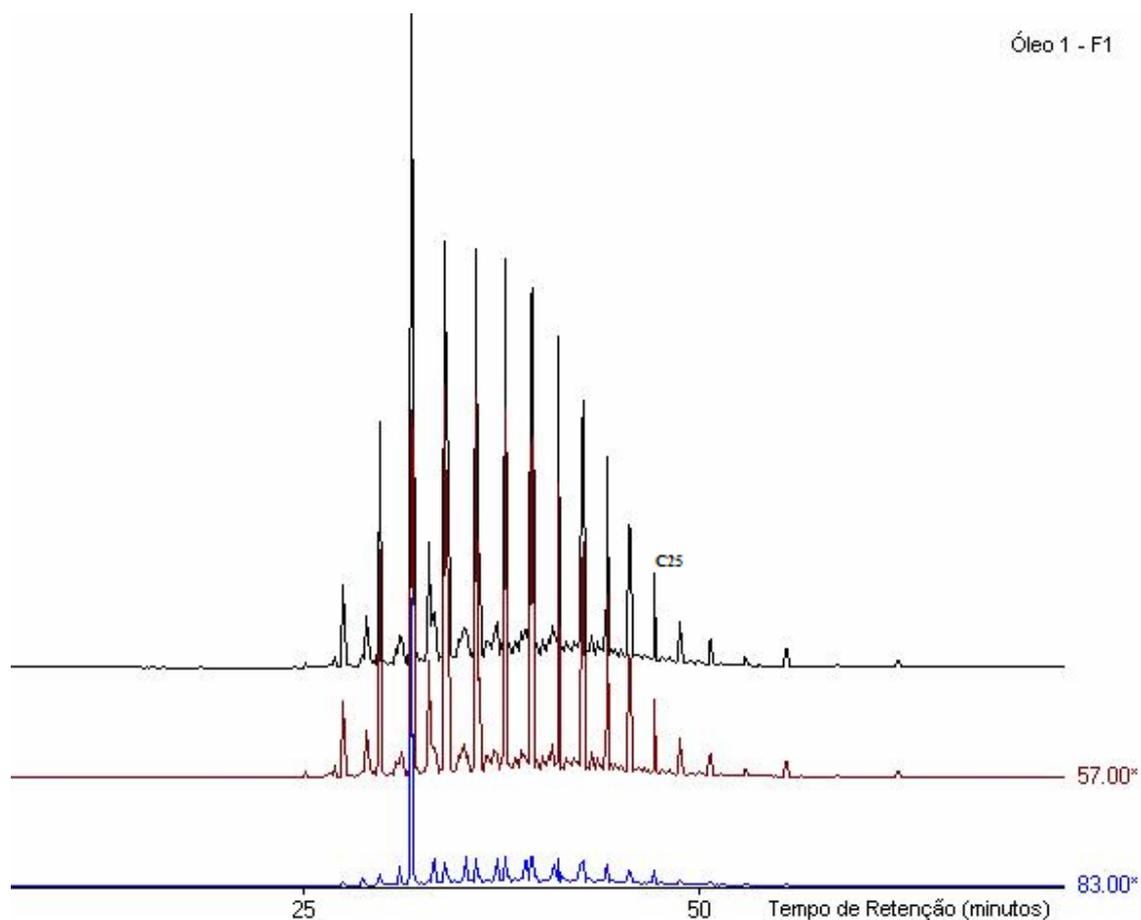


Figura 14 - Cromatograma do óleo diesel do 1º dia do experimento

Quando se observa o cromatograma após 30 dias do experimento já existe a formação de UCM, mostrando um nítido início da degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e conseqüentemente a formação de metabólicos conforme Figura 15.

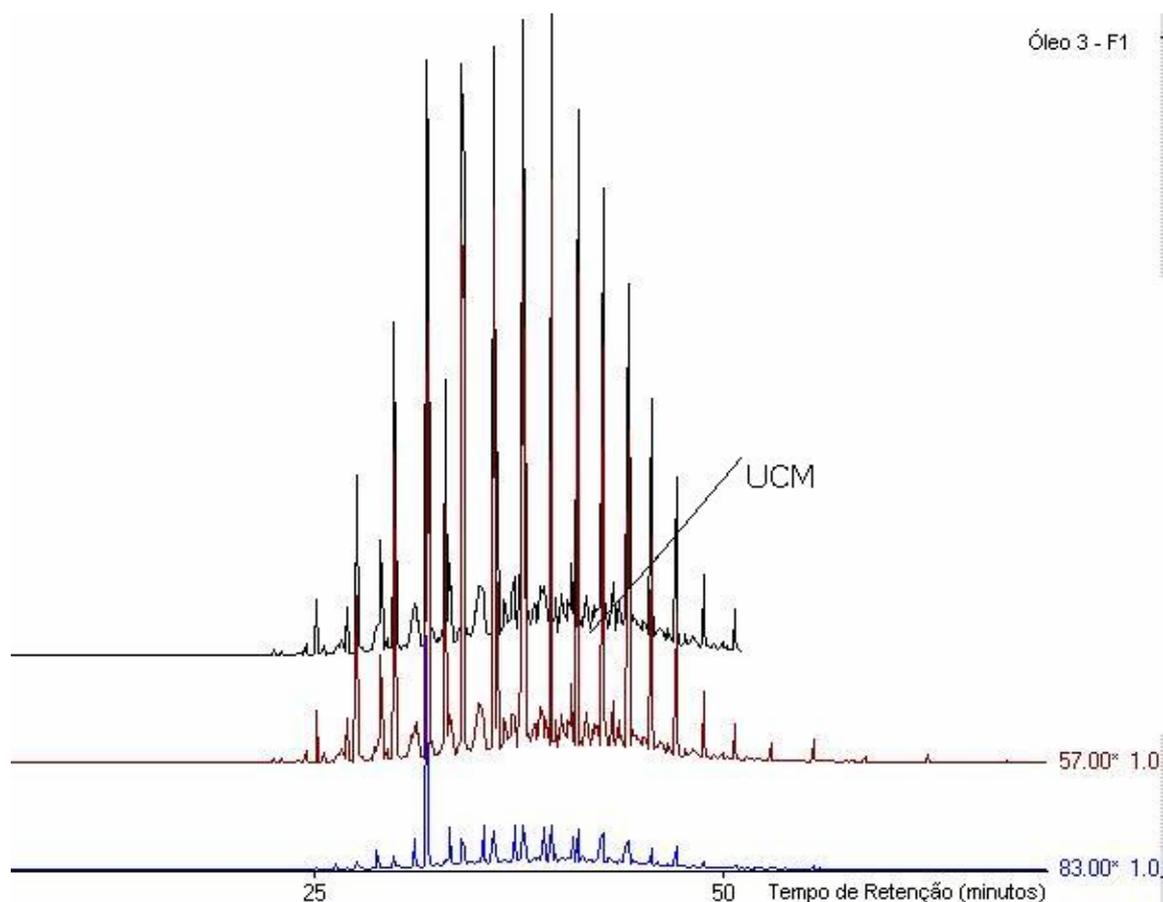


Figura 15- Cromatograma da caixa do óleo diesel após 30 dias do experimento.

O cromatograma do óleo diesel 180 dias após o início do experimento, mostra uma quase total degradação dos hidrocarbonetos alifáticos (C_{13} ao C_{24}), porém os n-alcenos com cadeias maiores que C_{25} permanecem com concentração praticamente constante desde o início do experimento (Figura 16). Ainda apresenta uma pequena UCM.

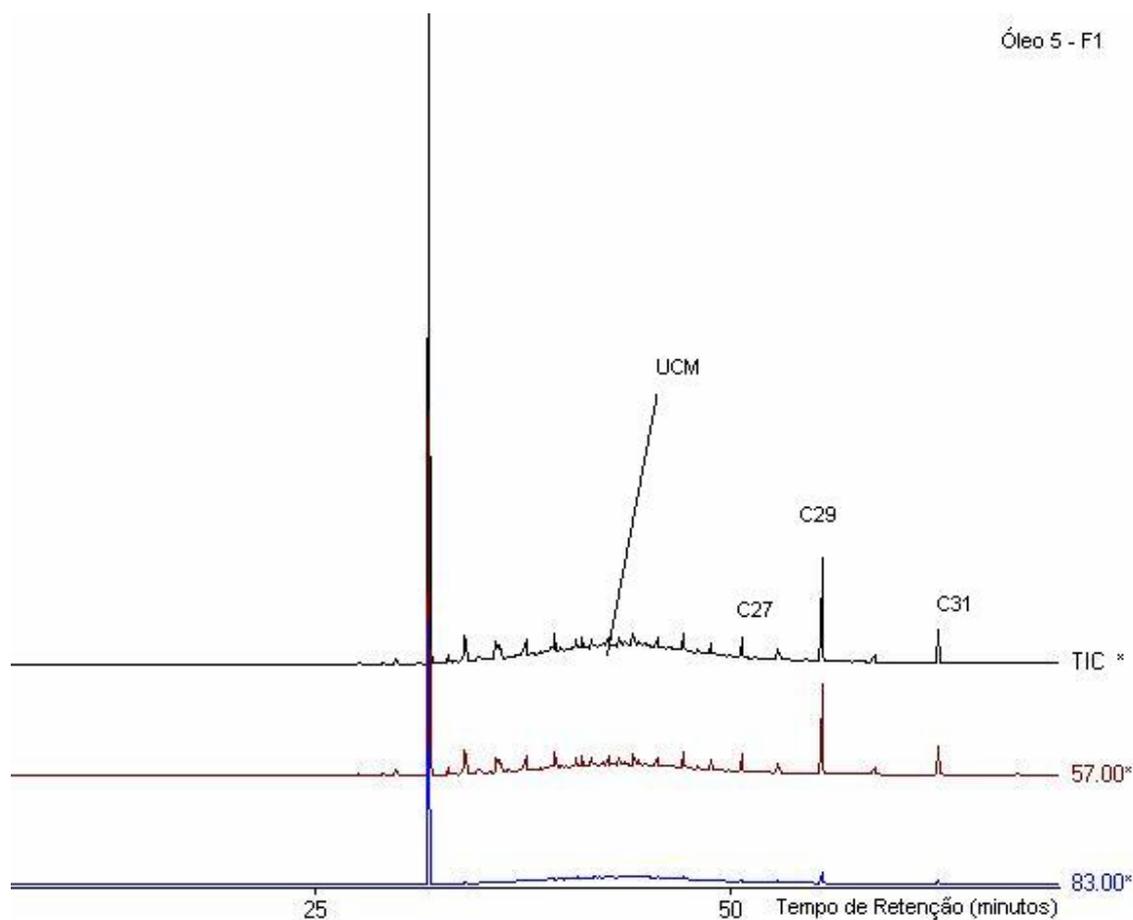


Figura 16- Cromatograma do óleo diesel após 180 dias do experimento.

b) Caixa do dispersante

Observando os cromatogramas do 1º dia e do 30º dia do experimento, conforme a Figura 17, nota-se que a concentração dos hidrocarbonetos praticamente permanece a mesma, apenas com uma pequena formação de UCM no 30º dia. Durante este período do experimento, foi observado que o número de bactérias e fungos diminuiu drasticamente, conforme resultados confirmados pelo estudo realizado no mesmo ambiente por Martins *et al* (2004). A diminuição foi ocasionada pelas conseqüências do derrame do óleo e do dispersante, uma vez que as bactérias e fungos são suscetíveis à ocorrência de graves danos pela presença de tais compostos orgânicos. Este dado é ainda confirmado por outros trabalhos, que mostram que o número de bactérias sofre uma redução, pois a maioria dos microrganismos é sensível ao derrame de óleo (Odu, 1972; El-Nawawy, 1992; Amund *et al*, 1993; Ijah & Antai, 2003)

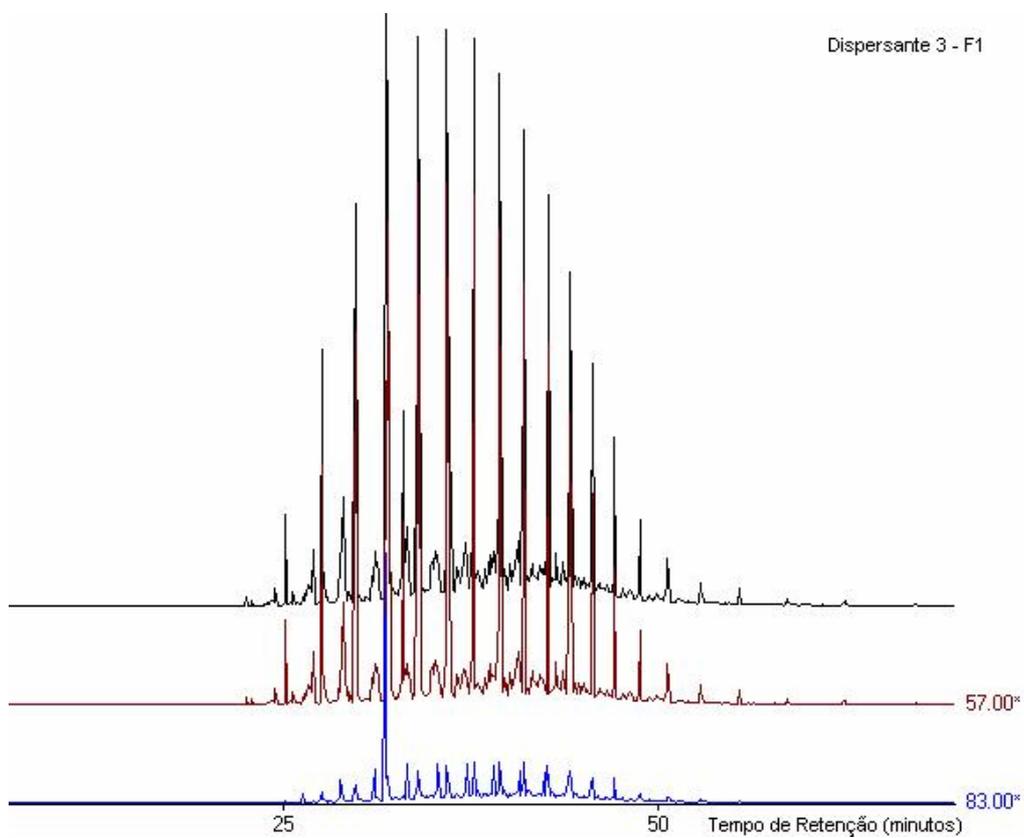
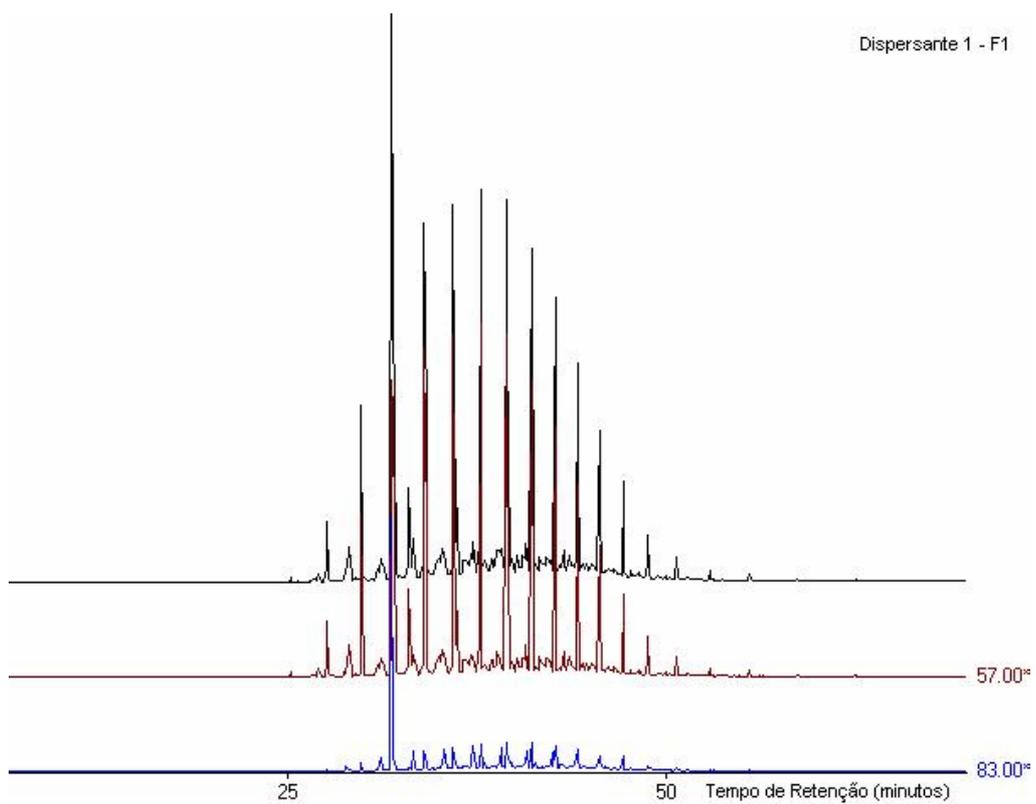


Figura 17- Cromatograma do dispersante do 1º dia e do 30º dia do experimento

O cromatograma do dispersante obtido a 180 dias do início do experimento, permite verificar uma quase total degradação dos hidrocarbonetos alifáticos (Figura 18), apresentando uma grande UCM. De acordo com Martins *et al*, 2004, flora microbiana do local da caixa do dispersante se restabeleceu três meses após o início do experimento.

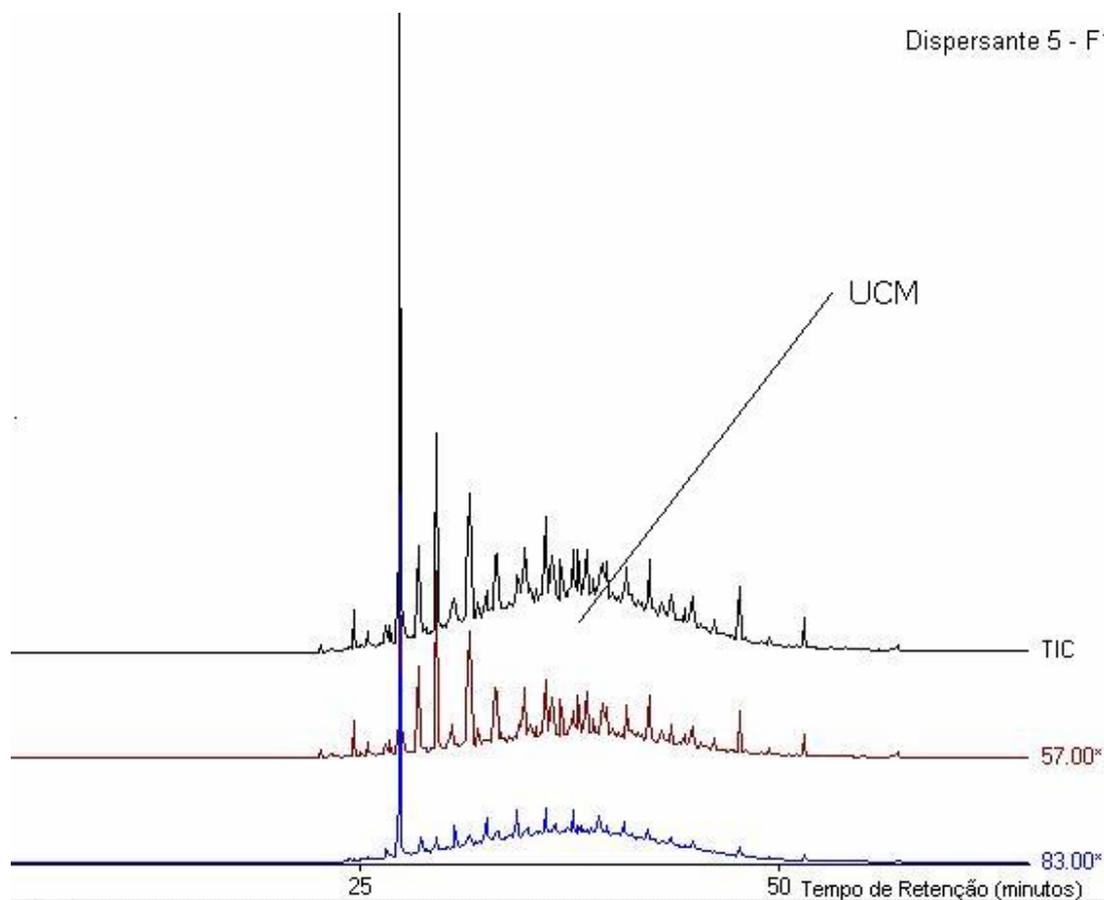


Figura 18- Cromatograma do dispersante após 180 dias do experimento

c) Caixa do biossurfactante

Observando os cromatogramas do primeiro dia do experimento (Figura 19) é possível constatar a alta concentração dos hidrocarbonetos alifáticos com picos bem resolvidos.

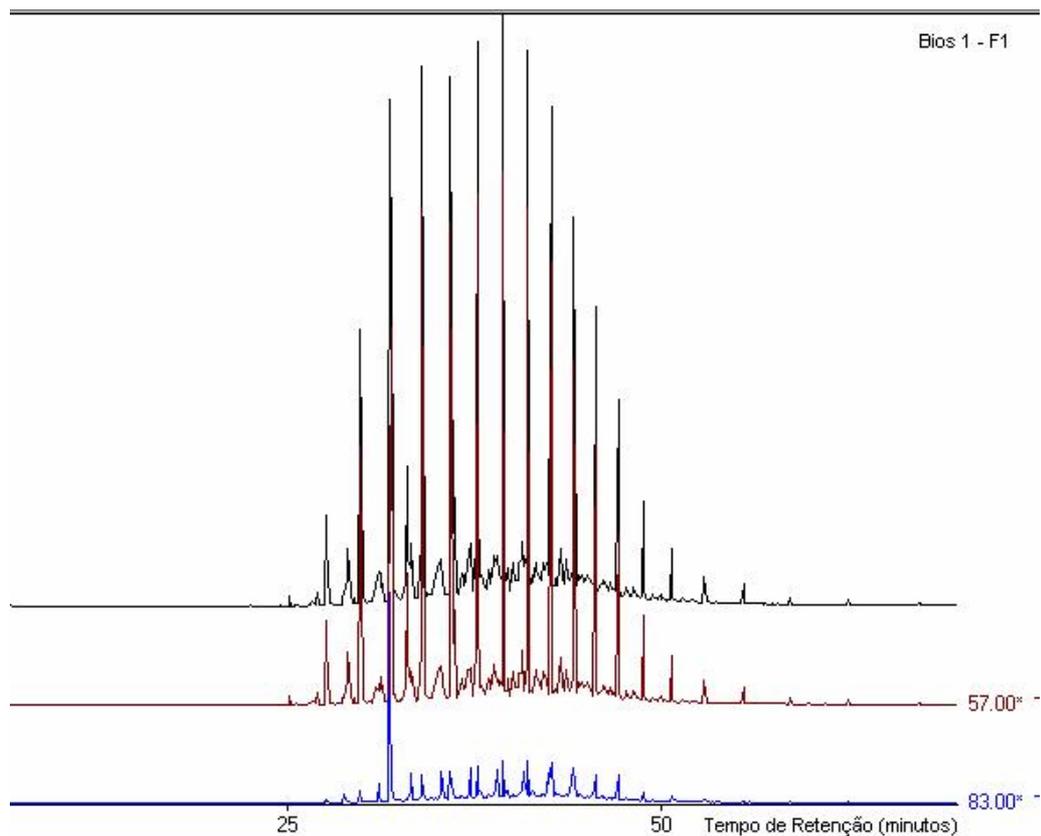


Figura 19- Cromatograma do biossurfactante do primeiro dia do experimento

Quando se observa o cromatograma após 90 dias do início do experimento há quase degradação total dos hidrocarbonetos alifáticos (Figura 20), enquanto o cromatograma obtido após 180 dias, apresenta formação de UCM e uma menor concentração dos hidrocarbonetos alifáticos, conforme Figura 21.

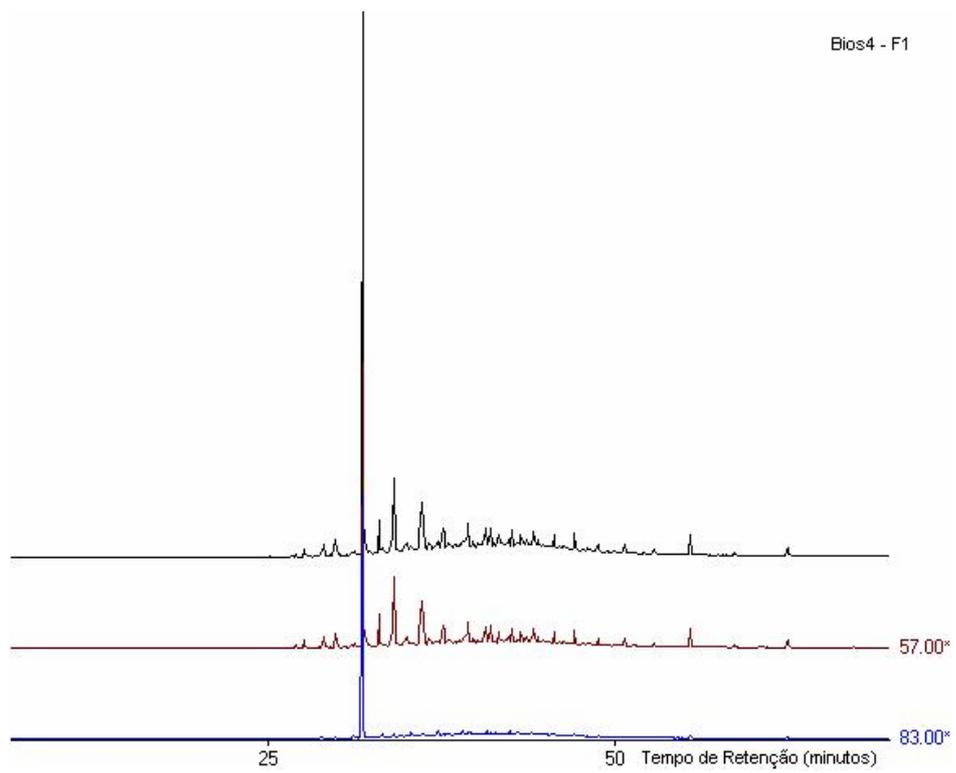


Figura 20- Cromatograma da caixa do biossurfactante após 90 dias do experimento.

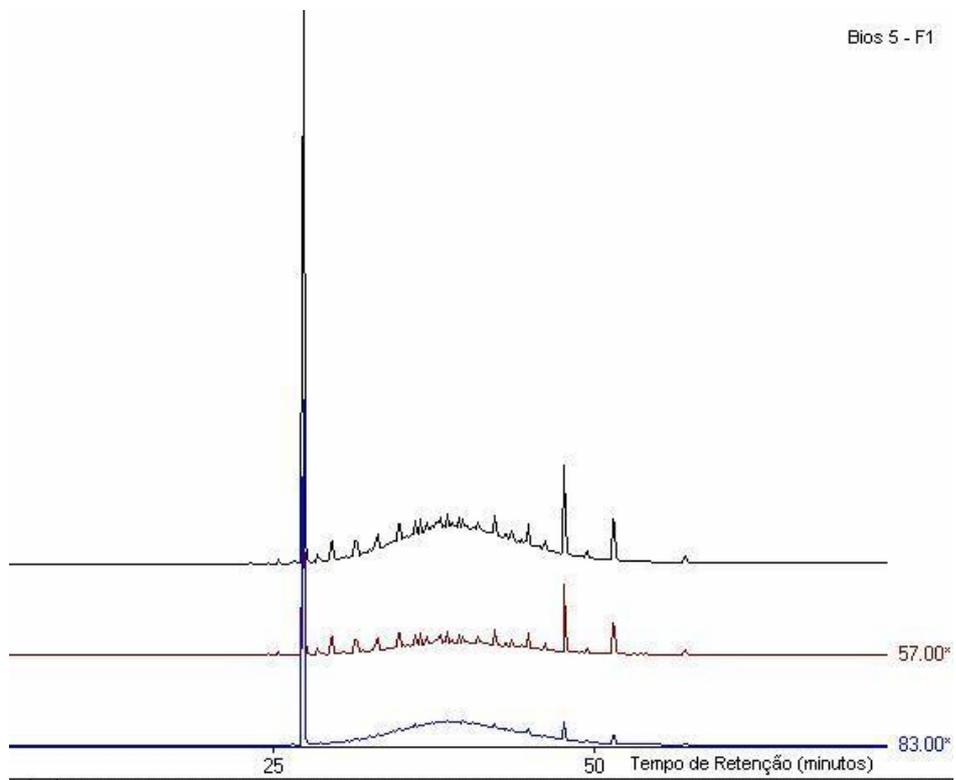


Figura 21- Cromatograma do óleo diesel após 180 dias do experimento.

5.5.1.2- Evolução da concentração dos HPAs

A identificação dos hidrocarbonetos aromáticos, da mesma forma que os hidrocarbonetos alifáticos, foi realizada individualmente em cada uma das caixas utilizadas no experimento.

a) Caixa do óleo diesel

Observando o cromatograma do 15º dia é visível a degradação dos HPAs pela formação da UCM no decorrer do período (Figura 22). Nesta caixa foi verificada a melhor taxa de degradação depois de 180 dias de experimento, mostrando que o ambiente onde não foi adicionado nenhum produto químico ou biológico os resultados foram satisfatório para o Σ 16 HPAs. Depois de 180 dias, vê-se que a formação da UCM é grande (Figura 23) e houve uma queda de mais de 75 % da concentração inicial.

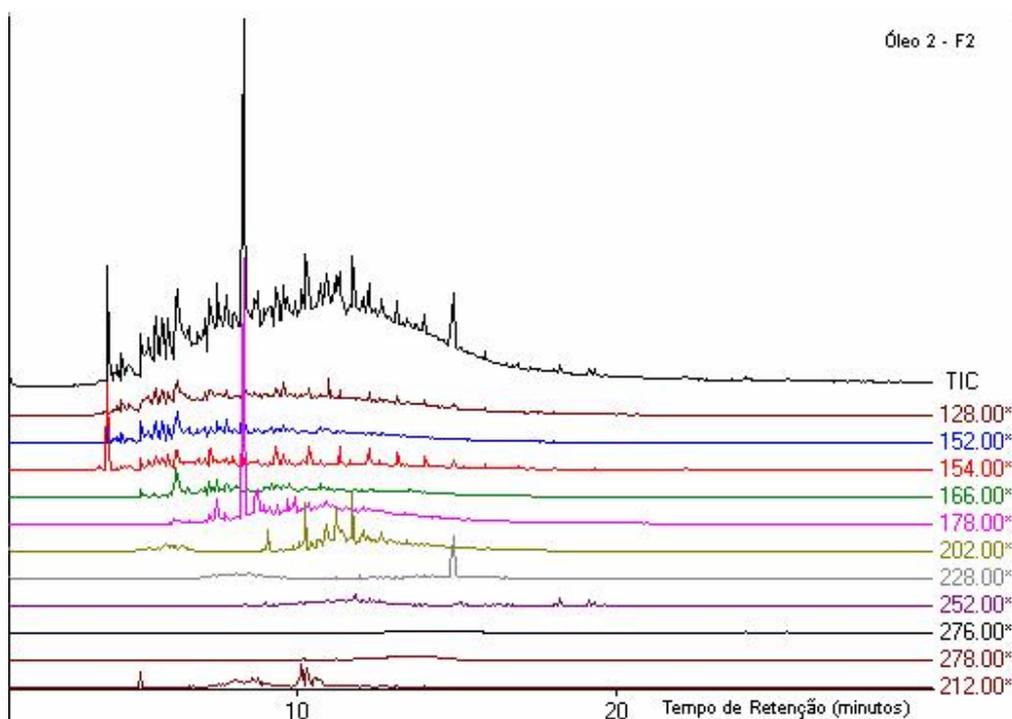


Figura 22- Cromatograma do óleo diesel do 15º dia após o início do experimento

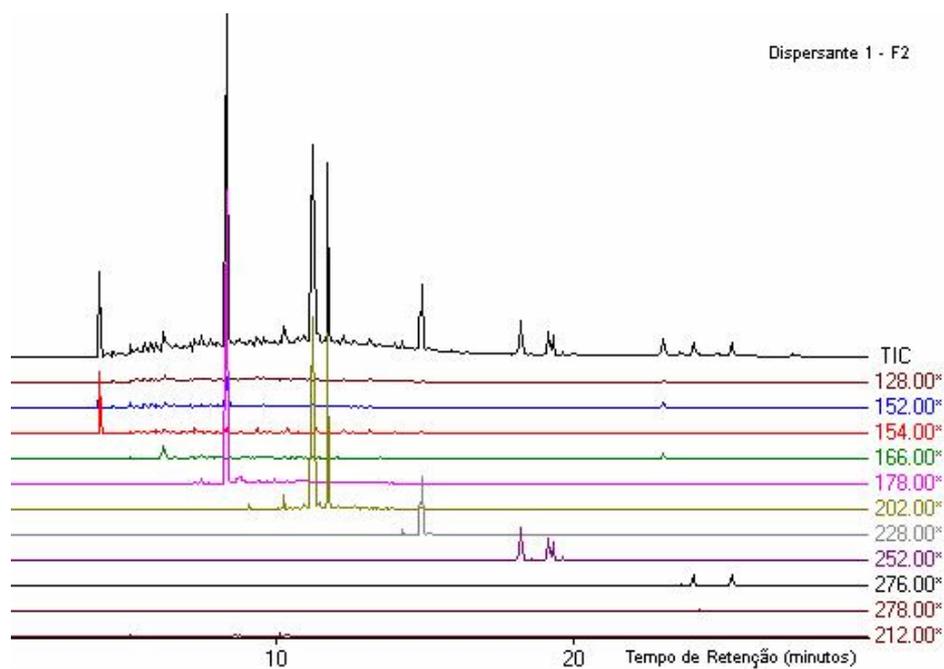


Figura 24- Cromatograma do dispersante do 1º dia do experimento

O cromatograma do dispersante para o 30º dia apresenta uma concentração menor que a inicial e formação de UCM que caracteriza a ocorrência de degradação. No 180º dia, a formação da UCM é maior, mostrando a ocorrência de vários metabólicos não identificados na mistura complexa não resolvida (Figura 25).

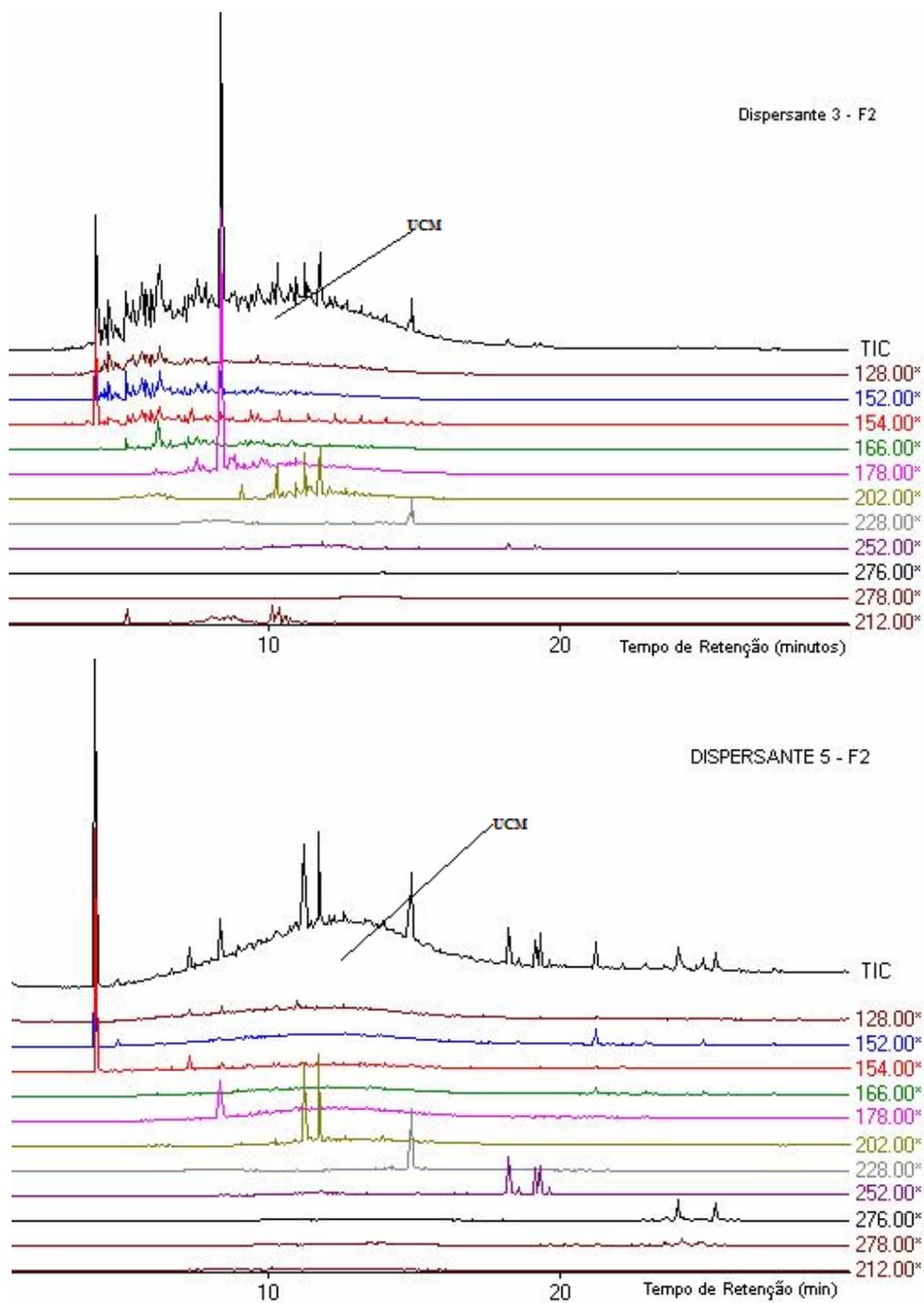


Figura 25- Cromatograma da ação do dispersante após 30 e 180 dias do início do experimento

c) Caixa do biossurfactante

Os cromatogramas do 1º e 15º dia do experimento (Figura 26), mostram uma alta concentração dos HPAs nos dois cromatogramas, com picos bem resolvidos.

Nesta caixa houve uma queda de apenas 2,8% da concentração inicial Σ 16 HPAs, tendo apresentado uma pequena formação de UCM 15 dias após o início do experimento.

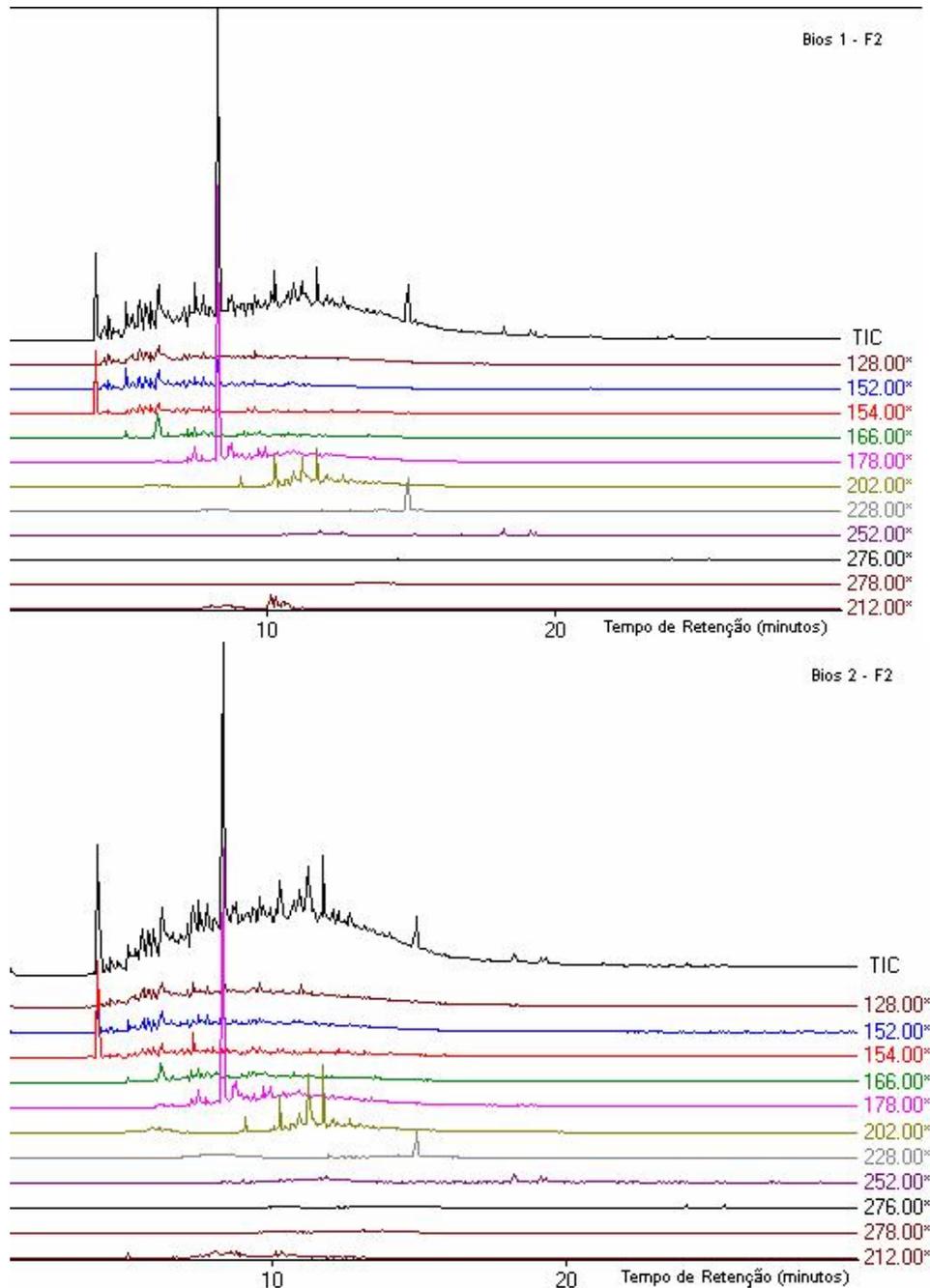


Figura 26- Cromatograma do biosurfactante do 1º e do 15º dia do experimento

Quando se observa o cromatograma após 90 dias do experimento, a concentração dos Σ HPAs é praticamente a mesma, porém há um aumento da UCM. Já o cromatograma

de 180 dias (Figura 27) a formação da UCM aumenta um pouco, porém a concentração do Σ HPAs diminui pouco.

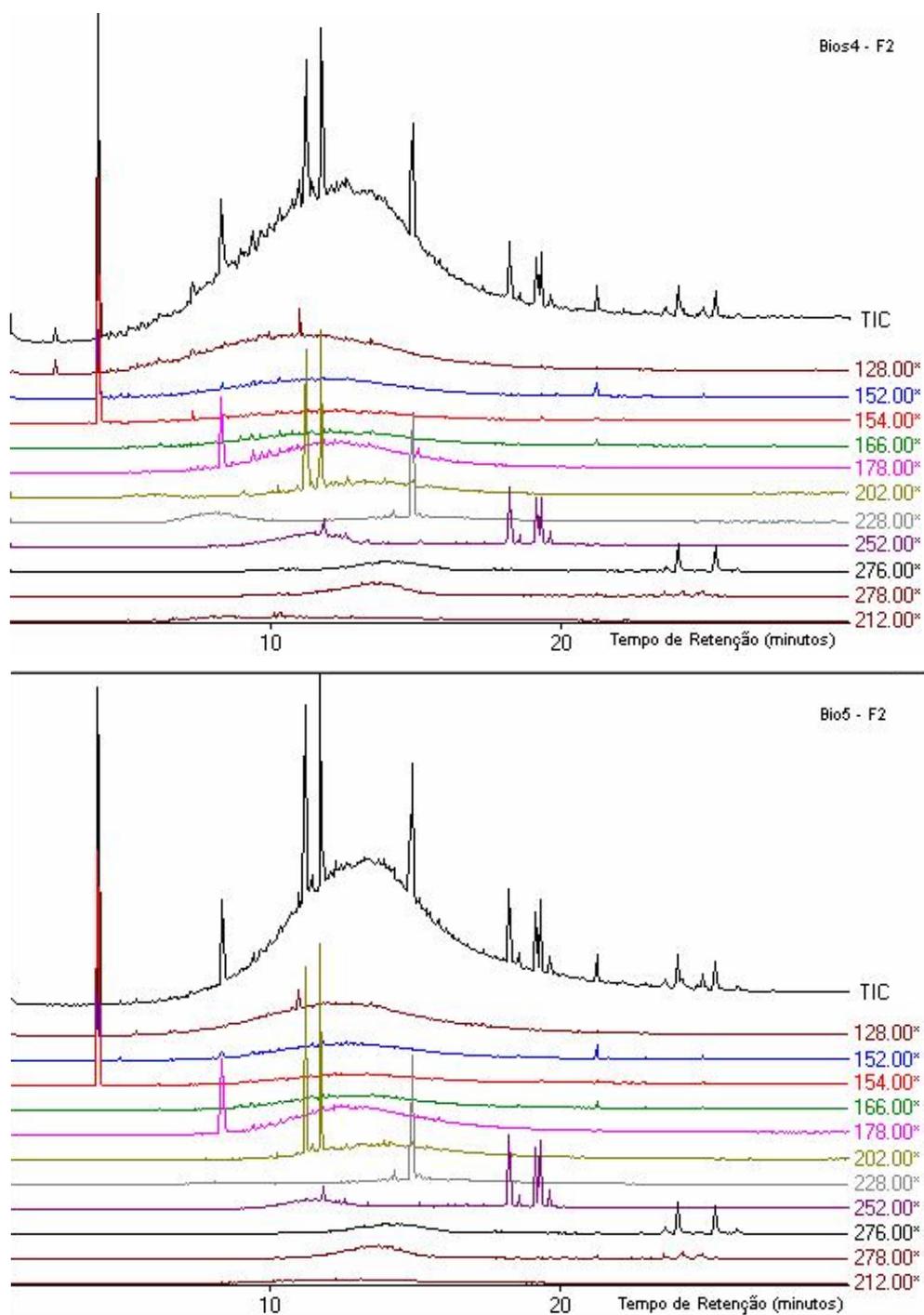


Figura 27 - Cromatograma da caixa do biossurfactante após 90 e 180 dias após o início do experimento.

5.5.2- Discussão dos resultados obtidos por meio dos cromatogramas – análise das concentrações

Os resultados obtidos por meio dos cromatogramas apresentam valores específicos referentes às concentrações dos hidrocarbonetos alifáticos e dos hidrocarbonetos aromáticos. Tais valores foram alvo de análise com o fim de verificar o decaimento da concentração inicial até a concentração final dos hidrocarbonetos.

5.5.2.1- Hidrocarbonetos Alifáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos (n-alcenos) podem ser utilizados como “marcadores ou traçadores geoquímicos”. A noção deste marcador compreende não somente um critério de especificidade, mas também uma estrutura molecular estável que sofra pouca ou nenhuma alteração em uma determinada escala de tempo (Hostettler *et al*, 1999).

As principais fontes naturais de n-alcenos são de plantas terrestres, fitoplâncton, zooplâncton e as bactérias (Medeiros, 2000). Os aportes naturais de origem continental são constituídos, na maioria, por n-alcenos derivados de ceras cuticulares de plantas vasculares, que apresentam cadeias longas com número de carbonos ímpares (C_{23} a C_{25}), predominando os compostos C_{27} , C_{29} ou C_{31} , conforme as características da vegetação local (Eglinton & Hamilton, 1967; Medeiros, 2000).

Os n-alcenos com cadeias moleculares ímpares também predominam na biota marinha, com destaque para os compostos entre C_{15} e C_{21} . Os n-alcenos de origem fóssil apresentam uma composição variada conforme sua fonte específica: petróleo bruto e derivados do petróleo, podendo apresentar cadeia carbônica de 1 a 40 átomos de carbono, sem a predominância de cadeias carbônicas ímpares ou pares (Simoneit, 1993). Os produtos derivados do petróleo caracterizam-se pela presença de n-alcenos dentro de uma faixa mais restrita de peso molecular, em decorrência dos processos de refino (Tabela 11), onde faz uma comparação das diferentes origens dos n-alcenos.

Tabela 11- Comparação da fonte de n-alcenos ao meio ambiente. Fonte adaptada (Bishop, 1983 e Medeiros 2000).

Organismo	Cadeia Carbônica	Composto Dominante
Bactérias fotossintéticas	C ₁₄ a C ₂₉	C ₁₇ , C ₂₆
Bactérias não fotossintéticas	C ₁₅ a C ₂₉	C ₁₇ -C ₁₉ , C ₂₅
Cianobactérias	C ₁₄ a C ₁₉	C ₁₇
Fitoplâncton	C ₁₃ a C ₂₁	C ₁₇
Zooplâncton	C ₁₈ a C ₃₄	C ₁₈ , C ₂₄
Plantas vasculares	C ₁₅ a C ₃₇	C ₂₇ , C ₂₉ , C ₃₁
Derivados do petróleo	Temperatura de destilação °C	Cadeia carbônica predominante
Gasolina	40 a 150	C ₄ a C ₁₀
Nafta	150 a 200	C ₁₀ a C ₁₂
Diesel	250 a 300	C ₁₆ a C ₂₀
Óleo lubrificante	300 a 400	C ₂₀ a C ₂₆

A predominância de cadeias carbônicas ímpares sobre as pares nos n-alcenos pode ser determinada através de índices específicos, como o CPI (Índice Preferencial de Carbono), calculado através da seguinte equação (Aboul-Kassim & Simoneit, 1996):

$$CPI = \frac{1}{2}[(C_{25}+C_{27}+C_{29}+C_{31}+C_{33}/C_{24}+C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32}) + (C_{25}+C_{27}+C_{29}+C_{31}+C_{33}/C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32}+C_{34})]$$

Se os valores encontrados ficarem entre 4 e 7 refletem uma presença dominante de n-alcenos biogênicos, isto é, sua origem é continental ou marinha. Quando os valores giram em torno de 1 indicam a presença de n-alcenos de contaminação petrogênica (Bouloubassi, 1990).

Para a realização do experimento foi utilizado um derivado do petróleo, óleo diesel, onde foram analisados os n-alcenos de C₇ a C₃₄. Na discussão dos resultados, é dado maior enfoque a C₁₃ a C₂₇, pois de acordo com a UNEP, 1991, o intemperismo natural provoca modificações progressivas na composição original do óleo, destacando-se a volatilização dos n-alcenos de baixo peso molecular (< C₁₄).

Na análise dos hidrocarbonetos alifáticos ficou muito evidente a ocorrência de degradação nas três caixas. Um dos principais fatores físicos que influenciaram este processo foi a temperatura, cuja elevação determina o aumento da taxa de evaporação das cadeias carbônicas mais leves, conforme CETESB, 2003 e Kennish, 1997. Estima-se que

durante as primeiras 24-48 horas, 50 a 60% do volume derramado pode ser perdido pela evaporação (CETESB, 2003). De acordo com Lee, 1980; ITOPI, 1987, a evaporação é responsável por uma redução de 75% dos componentes mais leves presentes na fração gasolina e querosene.

Os n-alcenos C_7 a C_{11} , praticamente não foram detectados durante todo o experimento, pois o produto usado foi óleo diesel, cuja cadeia carbônica predominante é C_{16} a C_{20} (Bishop, 1983).

Depois de 180 dias do início do experimento, a concentração dos hidrocarbonetos alifáticos nas caixas do óleo diesel, do dispersante e do biossurfactante, ficaram, respectivamente, 14,37 $\mu\text{g/g}$, 54,79 $\mu\text{g/g}$ e 6,25 $\mu\text{g/g}$, o valor encontrado na caixa do dispersante ficou acima do considerado normal para um ambiente estuarino, pois geralmente as concentrações de hidrocarbonetos nos sedimentos costeiros podem variar de 5 a 10 $\mu\text{g/g}$, sem que isto represente contaminação (Snedaker *et al*, 1995, Volkman *et al*, 1992 e UNEP, 1991). Nos sedimentos de sistemas aquáticos submetidos a significativos aportes de n-alcenos de plantas terrestres, esses valores podem ser duas ou três vezes maiores que os citados (Volkman *et al*, 1992).

Comparando os resultados das três caixas depois de 180 dias do experimento (tabela 10), observa-se que os valores estão inferiores aos encontrados por Zamboni (2000), por exemplo, na Coroa do Boi no estuário da Lagoa dos Patos (129,57 $\mu\text{g/g}$).

Dessa forma, após o transcurso do tempo total do experimento, pode-se concluir que o impacto ambiental causado pelo derrame simulado de um litro de óleo diesel por m^2 não causou graves conseqüências à biota microbiana no que refere aos hidrocarbonetos alifáticos. Isto porque, em comparação com resultados de amostras extraídas de outros locais (Tabela 12), a concentração dos n-alcenos foi consideravelmente inferior, demonstrando que em alguns ambientes subsistem altas concentrações de hidrocarbonetos alifáticos independentemente de ter havido qualquer acidente ambiental envolvendo derivados do petróleo.

Os valores encontrados no presente experimento (anexo 3) se aproximam das concentrações existentes em ambientes não impactados, demonstrando que em casos de acidentes com mesmas proporções, a recuperação do ambiente se processa naturalmente e se completa em pelo menos 180 dias nas condições do estuário da Lagoa dos Patos.

Tabela 12- Concentrações de n-alcenos totais em sedimentos. Fonte: adaptado de Taniguchi, 2001

Local	Intervalo Encontrado	Referência
Exterior		
	Concentração ug/g	
Mar de Beaufort	0,74 a 5,1	Steinhauer e Boehm, 1992
Baía do Almirantado, Antártica	0,27 a 2,89	Bícego, 1996
Brasil		
Baía da Guanabara, RJ	1,495 a 11,425	Freixa, 1995
São Sebastião, SP	0,049 a 4,766	Medeiros, 2000
Salvador, BA ao Cabo S. Tomé, RJ	4,96 a 42,23	Pessoa Neto, 2000
Santos, SP	0,096 a 14,559	Medeiros, 2000
Sepetiba a Paraty, RJ	< 0,07	Taniguchi, 2001
Rio Grande, RS		
Estuário da Lagoa dos Patos, RS	0,667 a 129,57	Zamboni, 2000
Presente Trabalho		
	Concentração ug/g	
Caixa óleo	14,37	Presente trabalho
Caixa dispersante	54,79	Presente trabalho
Caixa biossurfactante	6,25	Presente trabalho

Na caixa do óleo diesel e na caixa do biossurfactante, a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos $\sum C_{13}-C_{27}$ após 180 dias do experimento apresentou um decréscimo de 94 % e 98 %, respectivamente, da concentração inicial.

Na caixa referente ao óleo diesel, a concentração inicial era de 233,81 ug/g, sendo ao final do período encontrado o valor de 14,37 ug/g, o que demonstra a redução de aproximadamente 94 %. Um percentual próximo foi constatado na caixa do biossurfactante, uma vez que a concentração inicial encontrada foi de 457,59 ug/g e a final de 6,25 ug/g, sendo de aproximadamente 98 %.

No que refere à caixa do dispersante, o percentual de redução não foi tão intenso, apresentando uma redução de aproximadamente 78 %, pois a concentração inicial de 250,95 ug/g depois de 180 dias passou para 54,79 ug/g. Os resultados demonstraram que quanto maior o número de carbonos na cadeia dos n-alcenos, menor foi a sua redução, podendo ser mencionado o exemplo do C_{25} que apresentou redução de apenas 48,2% da concentração inicial.

Um dado bastante relevante foi observado na caixa do biossurfactante que, nos primeiros 15 dias, apresentou um decréscimo de aproximadamente 77 % da concentração inicial de n-alcenos. Esse fato mostra o alto desempenho desta substância na redução da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos em reduzido espaço de tempo. Segundo Cameotra & Bollag (2003), os biossurfactantes são utilizados *in situ* para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos e, agindo desta maneira, facilitam o acesso dos microrganismos presentes no ambiente para que acelerem a degradação dos hidrocarbonetos.

O mesmo, porém, não foi verificado nos 30 dias iniciais do experimento realizado na caixa do óleo diesel, pois nesta etapa inicial o decréscimo não foi tão intenso, apresentando uma diminuição de apenas 27,44 % da concentração inicial. Ao final do tempo total, a taxa de degradação dos n-alcenos foi aproximada em ambas as caixas, sendo semelhantes às concentrações finais em relação ao biossurfactante e ao óleo diesel.

Assim, após os 180 dias as taxas de degradação do biossurfactante e do óleo foram praticamente iguais enquanto a concentração de n-alcenos no dispersante manteve-se em patamar mais elevado.

A diferença verificada no período inicial do experimento do biossurfactante em relação ao óleo diesel, assim como no que refere ao resultado final do dispersante em comparação ao biossurfactante pode ser explicada pelo fato de que tanto o óleo, inicialmente, e o dispersante, durante todo o processo, afetaram de forma bastante prejudicial os fungos e bactérias responsáveis pela biodegradação. Contrariamente o biossurfactante inseriu no ambiente fungo que produziu a substância responsável justamente pela quebra das cadeias carbônicas dos n-alcenos provocando maior facilidade da sua absorção pelos microrganismos ou mesmo da evaporação.

O comportamento diferente entre o óleo e o dispersante pode ser atribuído ao fato de que a biodegradação foi restabelecida na caixa do óleo diesel, enquanto que na caixa do dispersante os fungos e bactérias não alcançaram recuperação eficiente, com isso diminuiu a atividade microbiana e a biodegradação mantendo os valores de n-alcenos elevados.

5.5.2.2- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

A análise dos resultados das concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos será feita em duas etapas, a primeira envolve a análise individual dos HPAs ao longo do tempo, dando ênfase a três grupos de HPAs, de acordo com o número de anéis, onde no primeiro grupo estão HPAs com 2 ou 3 anéis aromáticos, o segundo grupo HPAs com 4 e 5 anéis aromáticos e no terceiro grupo HPAs com 6 anéis aromáticos. E a segunda etapa aborda a análise do somatório dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Σ HPAs) ao longo do tempo.

Análise individual dos HPAs

Nesta fase são apresentadas as análises de alguns dos 16 HPAs encontrados nas amostras coletadas durante o experimento. Na Tabela 13 são apresentados os principais resultados dos HPAs obtidos no presente estudo, sendo possível observar os valores referentes às concentrações iniciais e finais. Os dados completos dos HPAs são apresentados em anexo (Anexo 4).

Tabela 13- Mostra a concentração inicial e final, expressa em ug/kg, dos HPAs.

Amostra	Caixa Início	Óleo Final	Caixa Início	Dispersante Final	Caixa início	Biossurfactante Final
Naftaleno	0,77	0,53	<LD	<LD	0,56	<LD
Acenaftileno	<LD	<LD	4,17	2,80	<LD	1,42
Acenafteno	<LD	<LD	<LD	1,77	<LD	<LD
fluoreno	74,34	<LD	57,93	48,34	116,83	1,04
fenantreno	323,06	33,45	438,04	15,18	502,28	45,82
antraceno	<LD	13,67	56,19	82,65	94,86	14,99
fluoranteno	66,72	<LD	377,70	95,45	156,75	224,51
pireno	98,12	<LD	584,47	44,51	<LD	251,49
benzo(a)antraceno	11,79	91,01	94,79	88,11	116,98	133,26
criseno	44,68	169,12	177,34	37,43	184,54	237,42
benzo(b)fluoranteno	11,59	21,22	109,21	23,24	76,43	127,43
benzo(k)fluoranteno	6,59	15,41	66,16	35,38	7,04	<LD
benzo(a)pireno	6,73	36,45	69,08	33,82	25,07	68,98
dibenzo(a,h)antraceno	3,76	15,77	72,65	6,94	17,41	56,52
benzo(ghi)perileno	<LD	1,93	7,31	24,57	3,03	11,10
indeno(1,2,3cd)pireno	1,26	23,83	66,59	2,48	16,48	53,24
16 Σ HPAs	649,41	422,39	2181,63	542,67	1318,26	1227,22

Dentro do primeiro grupo de HPAs com 2 ou 3 anéis um dos que foi alvo de exame é o naftaleno que apresenta dois anéis aromáticos. Este HPA apresenta menor ponto de ebulição, atingindo o estado gasoso somente a 218 °C, conforme Morrison & Boyd (2000). Além disso, encontra-se mais sujeito a sofrer efeitos de processos físico-químicos, tais como a temperatura (evaporação) e a foto-oxidação, do que de processos biológicos. Diante de tais características, era esperado que ao final do experimento não houvesse concentração relevante de naftaleno, pois o tempo de meia vida deste composto em condições desfavoráveis à degradação é de cerca de 129 dias (Herbes e Schwall, 1978; IPCS, 1998). Destaca-se também que o naftaleno está associado à contaminação por petróleo não intemperizado, ou seja, a derrames recentes e raramente detectável em sedimentos livre de contaminação (Robertson, 1998; Dahle *et al*, 2003), o que explica a sua presença na fase inicial do experimento. Na etapa final do estudo, as caixas do dispersante e do biossurfactante apresentaram concentração mínima não detectável (ND).

Outro HPA investigado dentro do primeiro grupo foi o fenantreno que possui três anéis aromáticos, apresentando ponto de ebulição de 340 °C. Tal característica determina o tempo de meia vida em período superior ao do naftaleno, podendo permanecer presente no ambiente de 16 a 126 dias em condições desfavoráveis, de acordo com Kanaly & Harayama, 2000. Na caixa do óleo diesel, a concentração inicial de fenantreno foi de 323,06 µg/Kg e após 180 dias sua concentração atingiu 33,45 µg/Kg, apresentando uma redução de 89,6%. Porém os melhores resultados foram verificados nas caixas do dispersante e do biossurfactante, onde ocorreu uma redução, respectivamente, 96,5% e 90,8% depois de 180 dias do experimento.

Assim os resultados finais obtidos no ambiente que não sofreu qualquer interferência de outros compostos para acelerar a biodegradação mostraram-se bastante próximos àqueles alcançados na caixa do biossurfactante, o que demonstra que o fenantreno não depende de fatores diversos daqueles existentes no meio para a sua degradação. A comparação entre as caixas do óleo diesel e do biossurfactante permite visualizar a proximidade das concentrações finais, conforme Gráfico 1.

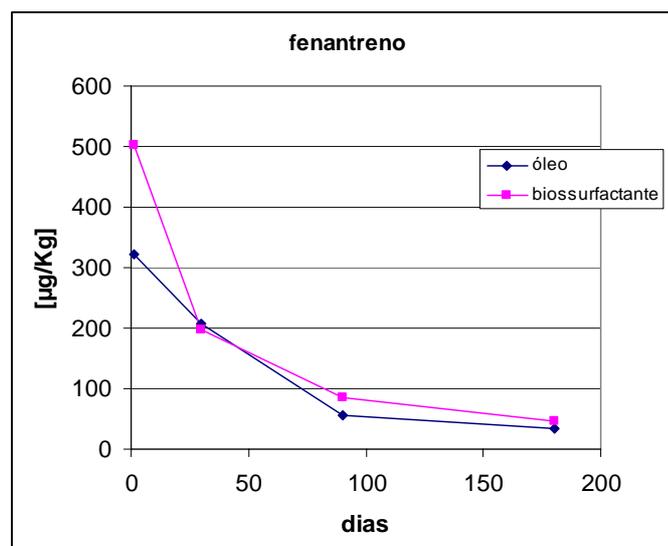


Gráfico 1- Comparação da concentração final do fenantreno nas caixas com óleo e o biossurfactante.

Dentro do segundo grupo de HPAs com 4 ou 5 anéis aromáticos o benzo(a)pireno (BaP) é uma espécie de HPA que merece atenção especial. Esse HPA apresenta cinco anéis aromáticos, e se constitui em um dos HPAs mais estudados devido a sua elevada toxicidade e do seu estreito contato com o homem já que ocorre em alimentos. A meia vida deste HPA nos sedimentos varia entre 0,3 e 58 anos (Herbes e Schwall, 1978; Nielsen & Christensen, 1994). Há outros autores que afirmam que a degradação do BaP pode variar de 229 a mais de 1400 dias (Kanaly e Harayama, 2000). Muito embora exista divergência acerca deste dado, há consenso no que refere a outras características deste composto que é cancerígeno, genotóxico, teratogênico e embriotóxico.

Na caixa do dispersante foi verificado o resultado mais significativo no que se refere à degradação do benzo(a)pireno. Comparando-se os dados relativos ao tempo total do experimento, constata-se que houve um decréscimo de 51,04% entre a concentração inicial (69,08 µg/Kg) e final (33,82 µg/Kg). Considerando que este composto apresenta cadeia carbônica com grande número de anéis e alto peso molecular, é possível concluir pela eficácia do dispersante na degradação desta espécie de composto.

Dentro do terceiro grupo onde estão os HPAs com seis anéis aromáticos, sendo os mais difíceis de serem degradados, está o Indeno [1,2,3-cd] pireno, para este HPA foi verificado que o dispersante químico mostrou-se mais eficaz em relação ao

biossurfactante. Tal fato é confirmado porque na caixa do dispersante, o Indeno, no primeiro dia, apresentava uma concentração de 66,59 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e no último dia atingiu 2,48 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

A eficácia do dispersante na degradação dos compostos aromáticos com grande número de anéis e que apresentam maior dificuldade no que refere ao processo de degradação, é demonstrada no Gráfico 2.

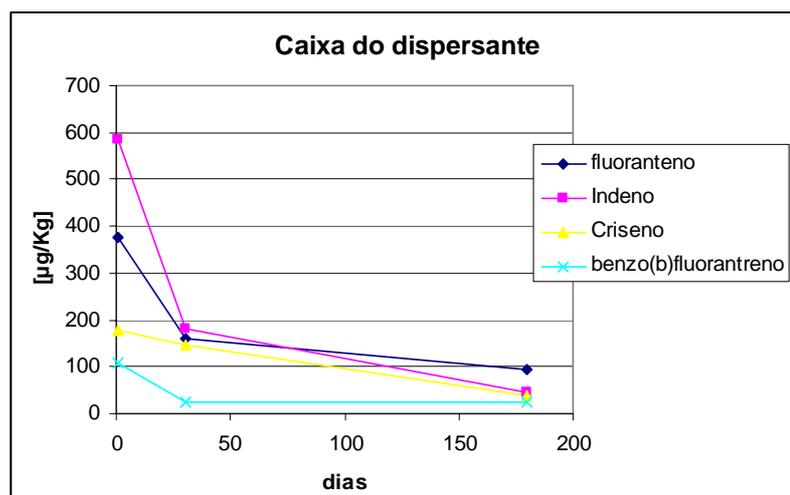


Gráfico 2- Comparação da taxa de degradação HPAs > 4 anéis

Análise do somatório dos HPAs (Σ HPAs)

Nesta fase é discutida a soma dos 16 HPAs encontrados em cada caixa do experimento, sendo comparados os resultados obtidos no início e no final do processo de degradação.

Na caixa do óleo diesel o Σ HPAs durante o período de 180 dias do experimento, apresentou um decréscimo da concentração inicial de 35 %. No experimento referente à caixa do dispersante, o percentual de diminuição foi de 75 %. Em relação ao Σ HPAs nestas duas caixas, houve diferença na taxa de decaimento da concentração inicial até a final, porém o menor percentual de decaimento do Σ HPAs foi na caixa do biossurfactante.

A caixa do biossurfactante foi a que apresentou a menor percentual de decaimento durante o experimento, sendo verificado um decréscimo de apenas 7 % da

concentração inicial do Σ HPAs. A comparação entre as três caixas do experimento é apresentada no Gráfico 3.

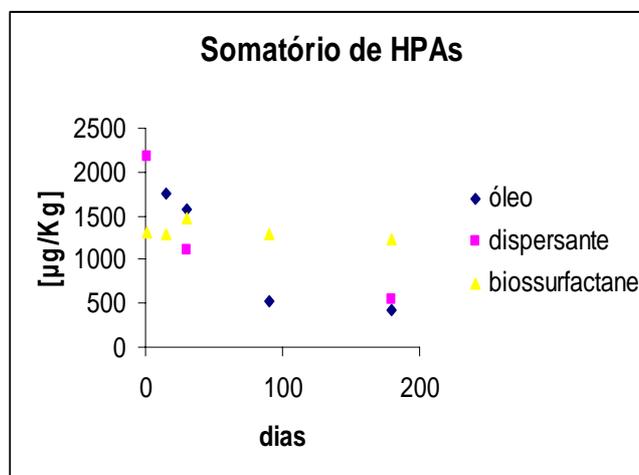


Gráfico 3- Comparação da taxa de degradação durante 180 dias

Até o 30^o dia, não foi verificada uma degradação efetiva nas caixas do óleo e do dispersante porque a adição de tais compostos ocasionou diminuição na microbiota, o que dificultou o processo de biodegradação. Após o período dos trinta dias iniciais, houve a recuperação da microbiota, conforme confirmou Martins *et al* (2004). Esse fator foi determinante para o decréscimo da concentração do Σ HPAs. Analisando a concentração do Σ HPAs depois de 30 dias na caixa do óleo diesel e do dispersante químico, no final do estudo, houve uma diminuição em média de 75,5 %.

O mesmo não aconteceu no experimento com a caixa do biossurfactante, pois as espécies de fungos e bactérias que predominaram nesta caixa, demonstraram não serem capazes de degradar HPAs de alto peso molecular (> 4 anéis). A degradação de compostos contendo até três anéis aromáticos é relativamente rápida e amplamente descrita na literatura (Barbieri, 1997). Microrganismos capazes de utilizar compostos aromáticos de alto peso molecular, tais como benzo(a)antraceno, fluoranteno e pireno, já foram isolados e caracterizados (Mahaffey *et al*, 1988; Heitkamp *et al*, 1988; Boldrin *et al* 1993).

Os resultados mostram que houve uma degradação mais efetiva das frações aromáticas com o menor número de anéis (até três anéis), conforme o Gráfico 4. A redução foi aproximadamente de 99 % para o fluoreno, 91 % para o fenantreno e 84 % para o antraceno depois de 180 dias do experimento.

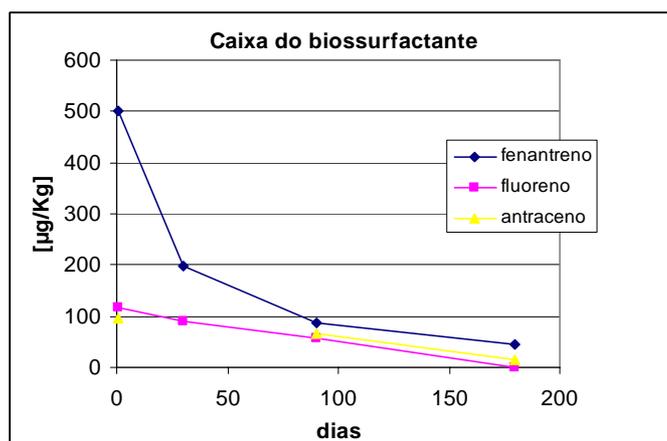


Gráfico 4- Comparação da taxa de degradação HPAs com 3 anéis aromáticos

Diante dos resultados obtidos ao final do experimento, foi possível verificar a eficácia específica do biossurfactante para a degradação dos HPAs de baixo peso molecular e do dispersante para os de alto peso molecular, o que demonstra a possibilidade do uso de técnicas de remediação para auxiliar a depuração do meio ambiente.

Porém as técnicas alternativas devem ser bem estudadas antes de aplicá-las, pois ao mesmo tempo em que apresentam resultados eficazes na degradação dos hidrocarbonetos também podem representar grave risco de prejuízo aos outros organismos, devido à possibilidade de produção de metabólicos mais tóxicos que os próprios contaminantes.

Os resultados mostraram que deve haver maior preocupação principalmente com a introdução de espécies não nativas, pois na caixa onde houve adição do fungo *Aspergillus fumigatus* a biota microbiana demorou a se recuperar, demonstrando que o sistema do biossurfactante deve ser adequado às condições físicas e químicas da área afetada pelo contaminante.

Capítulo - IV

Conclusões

6- Conclusões

A partir dos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, pode-se elaborar as conclusões que seguem.

I- As três caixas do experimento possuíam o mesmo tipo de sedimento (areia síltica) não constituindo fator relevante para justificar a maior ou menor concentração de hidrocarbonetos nas diferentes caixas ou diferente processos de fixação física dos hidrocarbonetos nos sedimentos;

II- O sedimento analisado apresentou caráter levemente ácido nas três caixas do experimento, sendo um fator que provavelmente influenciou na diminuição da taxa de biodegradação;

III- O potencial redox encontrado no sedimento das três caixas mostrou-se oxidante, favorecendo a degradação;

IV- O derrame de óleo diesel produziu um aumento no teor de carbono orgânico, com menores teores para o ambiente em que só tinha óleo diesel;

V- Houve diminuição no teor de nitrogênio para os 3 ambientes e de fósforo para a caixa com óleo diesel e para a caixa com dispersante químico;

VI- O biossurfactante aumentou o teor de fósforo devido à sua suplementação através de biossurfactante mais substrato;

VII- Houve degradação nas três caixas no que se refere aos hidrocarbonetos alifáticos, porém a degradação não foi igual para todas as caixas;

VIII- O decréscimo da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos ($\Sigma C_{13}-C_{27}$) na caixa do óleo diesel e do biossurfactante depois de 180 dias de experimento foi, respectivamente, de 94% e 98%, porém a caixa do dispersante químico o percentual de redução foi de 78%, nesta caixa foi observado que quanto maior o número de carbonos menor era sua degradação;

IX- Até o 30^o dia, não foi verificada efetiva degradação nas caixas do óleo e do dispersante porque a adição de tais compostos ocasionou diminuição na microbiota, o que dificultou o processo de biodegradação. Somente após o período dos trinta dias iniciais, houve a recuperação da microbiota, sendo este um fator determinante para o decréscimo da concentração do Σ HPAs;

X- Nos primeiros 15 dias a caixa do biossurfactante apresentou um decréscimo de aproximadamente 76 % da concentração inicial de n-alcenos, mostrando o alto desempenho desta substância na redução da concentração dos hidrocarbonetos alifáticos em reduzido tempo;

XI- Na caixa do dispersante houve uma queda de 75 % Σ HPAs ao longo do experimento, porém na caixa do biossurfactante o decréscimo foi aproximadamente de 7%;

XII- Nas condições em que foi implementado o experimento, não foi conveniente nem o uso de dispersante, nem o uso de biossurfactante, pois eles não se diferenciaram significativamente, de modo que justificassem seu uso para um derrame nas condições efetuadas;

7- Recomendações

- I- Para a realização de um novo experimento, poderá ser feita a simulação de derrame mediante o uso do petróleo e seus outros derivados;
- II- A simulação poderá ainda ser feita em vários tipos de sedimentos, sendo efetuadas coletas de testemunho em paralelo para verificar a penetração vertical do petróleo;
- III- Fazer a correção do pH para avaliar se há melhor rendimento na taxa de degradação por parte dos microrganismos;
- IV- Fazer, em paralelo à simulação do derrame, um acompanhamento em laboratório da degradação dos hidrocarbonetos e dos produtos que são obtidos do óleo diesel e/ou do petróleo;
- V- Estudar os metabólicos dos HPAs formados da degradação microbiana, visto que eles podem ser mais tóxicos que os aqueles encontrados no óleo diesel;

8- Bibliografia

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 1997. **Microrganismos viáveis, aeróbios e anaeróbios em alimentos: contagem padrão em placas**. Rio de Janeiro-RJ.

ABOUL-KASSIM, T. A. T. & SIMONEIT, B. R. T. 1996. **Lipid geochemistry of superficial sediments from the coastal environment of Egypt. I. Aliphatic hydrocarbons – characterization and sources**. Marine Chemical, V. 54, p. 135-158.

AMUND, O. O.; AKANGBOU, T. S. 1993. **Microbial degradation of four Nigerian crude oils in an estuarine microcosm**. Letters in Applied Microbiology. V. 16. p. 118-121.

ASCON-CABRERA, M. A.; LEBEAULT, J. M. 1995. **Interfacial área effects of a biphasic aqueous-organic system on kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms**. New York. Applied Microbiology and Biotechnology, V. 43, p. 1136-1141.

ATLAS, R. M. 1977. **Stimulated petroleum biodegradation**. Critical Review in Microbiology, V. 5, p. 371-386.

ATLAS, R. M. 1981. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective**. Microbiological Reviews, V 45, p. 180-209.

ATLAS, R. M. 1984. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. 1973. **Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum**. Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology & Serology, V. 39, p. 257-271.

BADARÓ-PEDROSO, C. 1999. **Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade de água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas**. Tese de doutorado, Universidade de São Carlos-SP, 237.

BAIRD, C. 2002. **Química Ambiental**. Ed. Bookman. São Paulo-SP. p. 662.

BAISCH, P.; ZAMBONI, A. J.; CORDEIRO, L. H. & ROCHA, A. C. 2000. **Níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos**, Rio Grande, RS. Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí - SC. 302-304p.

BARBIERI, S. M. 1997. **Biodegradação de Compostos Aromáticos**. In: Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. p. 211-242.

BENTO, D. M.; BAISCH, P.; MACHADO, M. I.; COSTA, J. A.; MARTINS, V. 2004. **A Influência da Remediação em ambiente impactado com óleo diesel**. Anais da *Rio Oil & Gas Expo and Conference 2004*. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP. Rio de Janeiro-RJ. IBP748_04.

BERTRAND, J.C.; RAMBELOARISOA, J.F.; RONTANI, G.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. 1983. **Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture**. *Biotechnology Letters*, V.5, p. 567-572.

BÍCEGO, M. C. 1988. **Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho**. Ed Resenha Tributária. São Paulo. 156p

BISHOP, P. L. 1983. **Marine Pollution and its control**. McGraw-Hill Book Company. p. 387.

BOLDRIN, B.; THIEM, A.; FRITZSCHE, C. 1993. **Degradation of phenantrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium sp.*** *Applied Environment Microbiology*, 59, p. 1927-1930.

BOSSERT, I.; BARTHA, R. 1984. **The fate of petroleum in soil ecosystems**. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York. p. 435–473.

BOULOUBASSI, I. 1990. **Aspects de la biogéochimie des hydrocarbures non aromatiques et aromatiques dans la colonne d'eau et les sédiments du milieu côtier: cas du delta du Rhône**. Thèse de Doctorat, Université Paris 6, France. p. 344.

BREMNER, J. M. 1965. **Total Nitrogen**. *Agronomy*, Vol. 9, p. 1149-1178.

CABRAL, J.; KOIDE, S.; SIMÕES, S. 2000. **Recursos Hídrico Subterrâneos**. Hidrologia aplicada à gestão de pequenas bacias hidrográficas. J. B. D. Piava, Paiva, E.M.C.D.. Santa Maria, RS.

CALLIARI, L. J. 1998. **Características geológicas**. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C. & CASTELLO, J. P. eds. *Os ecossistemas costeiro e marítimo do extremo sul do Brasil*. Rio Grande, Ecocientia, Cap. 4, p. 13-18.

CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J. M. 2003. **Biosurfactant Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, V. 30, p. 111-126.

CASSIDY, D. P.; HUDAK, A. J. 2001. **Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry**. *Journal of Hazardous Materials*. V. 84, p. 253-264.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. 1999. **Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil.** The Science of the Total Environment, V. 227, p. 237-247.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. 1979. **Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6.** Biochemical & Biophysical Research Communication, V. 88, p. 50-58.

CERNIGLIA, G. E.; GIBSON, D. T. 1977. **Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*.** Applied & Environmental Microbiology, V. 34, p. 363-370.

CETESB. 2003. **Derrames de óleo no mar: aspectos preventivos e corretivos.** São Paulo-SP. p 299.

CHOSSON, P.; LANAU, C; CONNAN, J.; DESSERT, D. 1991. **Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions.** Nature, London, V. 351, p. 640-642.

CLARK, R. B. 1989. **Marine Pollution.** Chapter 3 Oil Pollution. Oxford University Press, Oxford, p. 33-64.

CLARK Jr., R. C. & BROWN, D. W. 1977. **Petroleum properties and analyses in biotic and abiotic systems.** In: Malis, D. C., ed. Effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine environments in organisms. Nature and fate of petroleum, Academic Press, V.1, p. 1-89.

COLWELL, R. R.; WALKER, J. D. 1977. **Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment.** Critical Reviews in Microbiology, V. 5, p. 423-445.

CORDEIRO, L. H. C. 2003. **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos.** Dissertação de Mestrado. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande. p. 111.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. 2002. **Biorremediação para derrames de petróleo.** Ciência Hoje. V. 30, p. 129.

DAHLE, S.; SAVINOV, V. M.; GENNADIJ G. M.; EVENSET, A.; NAES, K. 2003. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay.** The Science of the Total Environment, 306, p. 57-71.

DELAUNE, R.D.; PATRICK, W.H; CASSELMAN, M.E. 1981. **Effect of sediment pH and redox conditions on degradation of benzo(a)pyrene.** Mar. Pollut. Bull., V. 12. p. 251-253.

- DIBBLE, J.T. Bartha R. 1979. **Efect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge**. Applied & Environmental Microbiology, V. 31, p. 544-550.
- DUMENIL, G.; MATTEL, G.; SERGENT, M. BERTRAND, J. C.; LAGET, M; PHANTAN-LUU, R. 1988. **Application of a Doehiert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture**. Applied Microbiology & Biotechnology, V. 27, p. 405-409.
- EGLINTON, G & HAMILTON, R. J. 1967. **Leaf epicuticular waxes**. Science, V. 156, p. 1322-1334.
- EHLRIGH, G. G.; GOERLITZ, D. F.; GODSY, E. M.; HULT, M. F. 1982. **Degradation of phenolic contaminants in ground water by anaerobic bacteria**. Ground Water. St. Louis Park, V. 20, n. 6, p. 703-710.
- EISLER, R. 1987. **Polycyclic aromatic hydrocarbons hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. U. S. Fish Wildl. Serv. Biol.
- EL-NAWAWY, A. S.; EL-BAGOURI, I.H.; ABDAL, M.; KHALAFAWI, M.S. 1992. **Biodegradation of oily sludge in Kuwait soil**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, V. 8, p. 618-620.
- FALL, R. R.; BROWN, J. L.; SHAEFFER, T. L. 1979. **Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis***. Applied & Environmental Microbiology, V. 38, p 715-722.
- FERREIRA, H. O. 1995. **Aporte de hidrocarbonetos de petróleo para a Baía de Guanabara - RJ**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, p. 88.
- FILLMANN, G. 2001. **Appraisal and Validation of Rapid, Integrated chemical and biological assays of environmental Quality. Doctor thesis in philosophy**. Plymouth Environmental Research Centre, Faculty of Science. P.170.
- FLOODGATE, G. 1984. **The of petroleum in marine ecosystems**. In: Atlas, R. M. ed. Petroleum Microbiology. New York, Macmillan. p. 355-398.
- FREEDMAN, B. 1995. **Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses**. 2 nd ed. San Diego, California.
- GARCIA, M. R. D. 2004. **Contribuição de efluentes urbano-industriais na contaminação por HPAs dos sedimentos estuarinos da Lagoa dos Patos (Rio Grande,RS)**. Dissertação de Mestrado. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande. p. 101.

GAUDETTE, H., MULLER, G. & STOFFERS, P. 1974. **An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments.** *Journal of Sedimentary Petrology*, V. 44(1), p. 249-253.

GIBSON, D. T. 1971. **The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons.** *Critical Reviews in Microbiology*, V. 1, p. 199-223.

GODSY, E. M.; GOERLITZ, D. F.; EHRLICH, G. G. 1983. **Methanogenesis of phenolic compounds by a bacterial consortium from a contaminated aquifer in St. Louis Park, Minnesota.** *Bulletin of Environmental Contaminations and Toxicology*, V. 30, p. 261-268.

GRIEP, G. H.; CALLIARI, L. J. & KRUG, L. C. 2001. **Programa de recursos humanos da ANP para o setor petróleo e gás PRH-ANP/MME/MCT na FURG.** Anais do XIV Semana Nacional de Oceanografia, Rio Grande - RS: Ed. Centro Acadêmico Livre de Oceanologia, CD-ROM.

GUEDES, C.; LOBO, I.; FACCIONE, M.; LEWIS, R.; PINTO, J. MAZZOCHIM, L.; CAL, I.; TAROZO, R. 2003. **Fotodegradação de diesel e monitoramento do solo e águas superficiais atingidos pelo óleo na região de Morretes-PR.** Anais da *Rio Oil & Gas Expo and Conference 2004*. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP. Rio de Janeiro-RJ.

GUNDLACH, E. R. & HAYES, M. O. 1978. **Vulnerability of Coastal Environments to Oil Spill Impacts.** University of South Carolina.

HAINES, J. R.; ALEXANDER, M. 1974. **Microbial degradation of high-molecular weight alkanes.** *Applied Microbiology*, V. 28, p. 1084-1085.

HAMBRICK, G. A.; DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H. 1980. **Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation.** *ApH. Environ. Microbiol*, V. 54, p. 2549-2555.

HARDISTY, J. 1990. **Beaches Form & Process.** Londres, Unwin Hyman Ltd.

HEITKAMP, M. A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C. E. 1988. **Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of pyrene degradation bacterium.** *Applied Environment Microbiology*, 54, p. 2549-2555.

HERBES, S. E.; SCHWALL, L. R. 1978. **Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum contaminated sediments.** *Appl. Environ. Micr.*, V. 35, p. 306-316.

HOSTETTLER, F. D.; PEREIRA W. E.; KVENVOLDEN, K. A.; GEEN, A. V.; LUOMA, S. N.; FULLER, C. C. & ANIMA, R. 1999. **A record of hydrocarbon input to San Francisco Bay as traced by biomarker profiles in surface sediment and sediment cores.** *Marine Chemical*, V. 64, p. 115-127.

IJAH, U. J. J.; ANTAI, S. P. 2003. **Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period**. International Biodeterioration & Biodegradation, V. 51, p. 93-99.

IPCS, 1998. **Selected non-heterocyclic polycyclic hydrocarbons**. International Programme on Chemical Safety. Geneva, p. 586.

IPIECA, 1993. **Dispersants and their role in Oil Spill Response**. IPIECA Report Series. London, UK, V. 5, p. 24.

ITOPF, 1987. **Response Marine Oil Spill**. Whiterby & The International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF). London, UK, p. 150.

JONES, J. G.; EDDINGTON, M. A. 1968. **An ecological survey of hydrocarbon oxidizing microorganisms**. Journal of General Microbiology, V. 52, p. 381-390.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. 2000. **Biodegradation of High-molecular-weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria**. Journal of Bacteriology, V. 182, p. 2059-2067.

KEITH, L. H.; TELLIARD, W. A. 1979. **Priority pollutants I: A perspective view**. Environmental Science and Technology, V.13, p. 416-423.

KENNISH, M.J. 1992. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. CRC Press, Inc. Florida, p. 133-181.

KENNISH, M.J. 1996. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. P. 524.

KENNISH, M.J. 1997. **Pollution impacts on marine biotic communities**. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. p. 310.

KESSLER, A. & RUBIN, H. 1987. **Relationships between water infiltration and oil spill migration in sandy soils**. Journal of Hidrology, v. 91, p. 187-204.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. 1990. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment**. Microbiological Reviews, V. 54, p. 305-315.

LJINSKY, W. 1991. **Formation and Occurrence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Associated with Food**. Mutatonal Research, V. 259, p. 251-261.

LIMA, G. T. N. P. 2004. **Estudo dos hidrocarbonetos e metais pesados no sistema lagunar e estuarino de Tramandaí-RS**. Dissertação de Mestrado. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande. p. 162.

LOBATO, A. K. C. L. 2000. **Estudo cinético da síntese de biosurfactantes**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de tecnologia. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Natal-RN.

LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; PRÓSPERI, V. A. ZANARDI, E. & TRUZZI, A. C. 1997. **Costal monitoring program of São Sebastião Channel: assessing the effects of "TEBAR V" oil spill on rocky shore populations**. Marine Pollution Bulletin, 34, p. 923-927.

LOURENÇO, R. A. 2003. **Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos – hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, esteróis e alquenonas**. Dissertação de mestrado. USP, São Paulo-SP, p. 101.

MacGILLIVRAY, A. R.; SHIARIS, M. P. 1993. **Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments**. Applied & Environmental Microbiology, V. 59, p. 1613-1668.

MAHAFFEY, W. R.; GIBSON, D. T.; CERNIGLIA, C. E. 1988. **Bacterial oxidation of Chemical Carcinogens: Formation of Polycyclic Aromatic Acids from Benz[a]anthracene**. Applied and Environmental Microbiology, V. 54, n. 10, p. 2415-2423.

MARIUZZO, D. M. 1999. **Estudos da biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por linhagens de microrganismos nativos isolados de sítios ambientais aquáticos contaminados do estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. p. 153.

MARQUES JR. A. N.; MORAES, R. B. C. & MAURAT C. M. 2002. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro. P: 311-334, IN: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. (org.): Interciência, p 382.

MARTINS, V. G. 2005. **Produção de biosurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação**. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, p . 156.

MARTINS, V. G.; MARTINS, M. G.; SANTOS, G. C.; BENTO, D. M.; BAISCH, P.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. 2004. **Biorremediação a partir de biosurfactante produzido por fermentação em estado sólido**. XV COBEQ.

MacKENNA, E. J; KALLIO, R. E. 1964. **Hydrocarbon struture its effec on bacterial utilization of alkanes**. In: HEUKEKIAN, H.;DONDERO, N. C. ed. Principles and application in aquatic microbiology. New York. p. 1-14.

MEDEIROS, P. M. 2000. **Avaliação da origem de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos de Santos e São Sebastião, utilizando-se hidrocarbonetos marcadores geoquímicos**. Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP. p. 102.

MILANELLI, J.C.C. 1994. **Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento em um costão rochoso da praia de Barequeçaba, São Sebastião, SP.** Dissertação de Mestrado. Instituto Ocenográfico. USP. São Paulo, SP, p. 103.

MÖLLER Jr., O. O. 1996. **Hydrodynamique de la Lagune dos Patos (30°S, Brésil): Mesures et modélisation.** These de Doctorale, Université Bordeaux I, Ecole Doctorale des Sciences de la Terre et de la Mer. Bourdeaux. p. 203.

MORA, S. & SHEIKHOESLAMI, M. R. 2002. **Interpretation of Caspian Sea Sediment Data.** ASTP: Contaminant Screening Programme. Final Report. p. 28.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. 2000. **Organic Chemistry.** Ed. Prentice Hall. Sixth edition. p. 1278.

NAS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES). 1985. **Oil in the Sea, Inputs, Fates and Effects.** National Academy Press. Washington, DC, Chap. 4, p 270-368.

NICODEM, D. E., FERNANDES, M. C. Z., GUEDES, C. L. B., CORREA, R. J. 1997. **Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills.** Biogeochemistry, V. 39, n.2, p. 121-138.

NICODEM, D. E., GUEDES, C. L. B., CORREA, R. J. 1998. **Photochemistry of petroleum I: systematic study of a Brazilian intermediate crude oil.** Marine Chemistry, V. 63, n. 1-2, p. 93-104.

NICODEM, D. E., GUEDES, C. L. B., FERNANDES, M. C. Z., CORREA, R. J., SEVERINO, D., COUTINHO, M., SILVA, J. 2001. **Photochemistry of Petroleum.** Progress in Reaction Kinetics and Mechanism, V. 26, n. 2/3, p.219-238.

NIELSEN P.H. E CHRISTENSEN T.H. 1994. **Variability of biological degradation of aromatic hydrocarbons in an aerobic aquifer determined by laboratory batch experiments.** J. Contaminant Hydrology, V. 15, p. 305-320.

NISHIGIMA, F.N. 1999. **Aplicação da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC) na Purificação e separação de Hidrocarbonetos de Sedimentos das Regiões de Santos e Cananéia - São Paulo, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. USP. São Paulo. p. 89.

ODU, C.T.I. 1972. **Microbiology of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. 1. Extent of contamination and some soil microbial properties after contamination.** Journal of Institute of Petroleum, V. 58, p. 201-208.

ODUM, E. P. 1988. **Ecologia.** Rio de Janeiro- RJ. Editora Guanabara. p. 434.

OU DOT, J.; FUSEY, P.; ABDELOUAHID, D. E.; HALOUI, S. ROQUEBERT, M. F. 1987. **Capacités dégradatives des bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel.** Canadian Journal of Microbiology, V. 33, p. 232-243.

POFFO, I. R. F. 2000. **Vazamentos de óleo no litoral norte de São Paulo: análise histórica (1974-1999)**. Dissertação de mestrado. USP/PROCAM. Programa de pós-graduação em Ciências Ambientais, São Paulo.

PROVIDENT, M. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. 1993. **Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds**. Journal Ind. Microbiol., V. 12, p. 379-395.

REIS, E. G. 1999. **Pesca artesanal na Lagoa dos Patos, história e administração pesqueira**. IN: F. N. Alves (org) Por uma história multidisciplinar do Rio Grande, p. 81-84.

REYNIER, M. V.; BADARÓ-PEDROSO, C.; MELLO, S. L. R. & ZAMBONI, A. J. 1993. **Testes de toxicidade com microrganismos *Temora stylifera* e *Mysidopsis juniae* expostos a diferentes derivados da produção de petróleo**. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira. Publicação ACIESP, p. 425-429.

ROBERTSON A. 1998. **Petroleum hydrocarbons**. In: AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). Oslo, Norway. p. 661-716.

RODRIGUES, R. 1984. **Indicadores geoquímicos moleculares (biomarcadores) aplicados à exploração de petróleo**. In: Geoquímica do petróleo, CENPES-Petrobras. p. 157-190.

ROSATO, Y. B. 1997. **Biodegradação do Petróleo**. In: Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. p. 307-334.

RUTTENBERG, K. C. 1992. **Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments**. Limnology & Oceanography, V. 37, p. 1460-1482.

SHEPARD, F. P. 1954. **Nomenclature base don sand-silt-clay variations**. Journal of Sedimentary Petrology. Tulsa. Okla. p. 151-158.

SIMONEIT, B. R. T. 1993. **Hidrotermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems**. In: Organic Geochemistry – Principles and Applications (M. H. Engel & S. A. Macko, eds) Topics in Geobiology. Plenum Press. New York, V. 11, p. 397-418.

SIMS, R. C.; SIMS, J. L.; SORENSEN, D. L.; HASTINGS, L. L. 1988. **Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results USEPA**, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, V. 1, p. 154.

SNEDAKER, S. C.; GLYNN, P. W.; RUMBOLD, D. G. & CORCORAN, E. F. 1995. **Distribution of n-alkanes in marine samples from southeast Florida.** Marine Pollution Bull., V. 30, p. 83-89.

SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S.; GHANNDUUM, M. A.; RADWAN, S. S. 1993. **High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert.** Applied Microbiology & Biotechnology, V.39, p. 123-126.

STRICKLAND I. D. H. & PARSONS T. R. 1972. **Determination of particulate carbon. In: A Practical Handbook of Seawater Analyses.** 2^{ème} Ed. Fisheries Research Board Canada. p. 207-211.

SUGUIO, K. 1973. **Introdução a sedimentologia.** Ed. Edgard Blücher. São Paulo. 1^a edição. p. 317.

TISSOT, B. P. & WELTE, D. H. 1984. **Petroleum formation and occurrence.** Second revised and enlarged edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 699.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). 1991. **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments.** Reference methods for marine pollution studies, n^o 20, p. 97.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2000. **Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs.** EPA 83-R-00-001. Washington, D.C. 20460, p. 111.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2001. **EPA Oil Spill Program Overview.** [texto publicado em 02/07/01 no Internet]. Disponível em <http://www.epa.gov/oilspill/overview.htm>>. Acesso em 13 set. 2004.

VAN EYK J.; BARTELS, T.J. 1968. **Paraffin oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*. I. Introduction of paraffin oxidation.** Journal of Bacteriology, V. 96, p. 706-712.

VERSTRAETE. W.; VANLOOCKE, R.; DEBORGER; VERLINDE. A. 1976. **Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers.** In: SHARPLEY, JM; KAPLAN, A.M. ed. Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium. London: Applied Science Publishers. p. 99-112.

VOLKMAN, J. K.; HOLDSWORTH, G. D.; NEILL, G. P. & BAVOR Jr., H. J. 1992. **Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments.** Science total Environment, 112, p. 203-219.

WALKER, J.D.; COLWELL, R. R.; VAITUZIS, Z.; MEYER, S. A. 1975. **Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototbeca zopfii*.** Nature. London, V. 254, p. 423-434.

WANG, X.; YU. W.; BARTHA, R. 1990. **Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil**. Environmental & Science Technology, V. 24, p. 1086-1089.

WEBER, R. R. e BÍCEGO, M. C. 1987. **Distribuição e origem dos hidrocarbonetos parafínicos de sedimentos de superfície da costa do Estado de São Paulo entre Ubatuba e Cananéia**. II Simpósio sobre Ecossistemas da costa Sul e Sudeste Brasileira. São Paulo-SP, V.2, p. 307-336.

ZAMBONI, A. J. 2000. **Caracterização ecotoxicológica do estuário da Lagoa dos Patos no entorno de Rio Grande, RS: Fundamentos e técnicas**. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos – USP, p. 193.

ZAMBONI, A.J. 1993. **Avaliação do qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea)**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos – USP, p. 114.

ZANARDI, E. 1996. **Hidrocarbonetos no Canal de São Sebastião e Influência na Plataforma Interna Adjacente - Influência do Derrame de Maio de 1994**. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. USP. São Paulo-SP, p. 112

ZOBELL, C. E. 1946. **Action of microorganisms on hydrocarbons**. Bacteriological Reviews, V.10, p. 1-49.

9.- Anexos

Anexo .9.1

Os principais casos de vazamentos de óleo registrados no Brasil

Fonte	Data	Local	Vol. Vazado de óleo (m ³)
N/T Takimui Maru	Agosto/74	São Sebastião/SP	6.000
N/T Tarik Ibn Ziyad	Março/75	Baía de Guanabara/RJ	6.000
N/T Brazilian Marina	Janeiro/78	São Sebastião/SP	6.000
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão	Março/83	Bertioga/SP	2.500
Barcaça abastecedora	Setembro/84	Santos/SP	450
N/T Marina	Março/85	São Sebastião/SP	2.000
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão	Mai/88	São Sebastião/SP	100
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão	Agosto/89	São Sebastião/SP	350
N/T Penelope	Mai/91	São Sebastião/SP	280
N/T Themoná	Setembro/91	Bacia de Campos/RJ	2.150
Duto	Julho/92	Cubatão/SP	10.000
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão	Mai/94	São Sebastião/SP	2.700
Duto/petrobras	Março/97	Baía de Guanabara/RJ	2.800
N/M Smyrni	Julho/98	Santos/SP	40
N/T Maruim	Agosto/98	São Sebastião/SP	15
Duto/Petrobras	Agosto/99	Igarapé do Cururu (AM) e Rio Negro	3.000
Duto/Petrobras	Janeiro/00	Baía de Guanabara/RJ	1.292
Duto/Petrobras	Janeiro/00	Entre Cubatão e São Bernardo do Campo (SP)	200
Transbordamento	Fevereiro/00	Refinaria São José dos Campos/SP	500
Navio Mafra	Março/00	Canal de São Sebastião/SP	7250

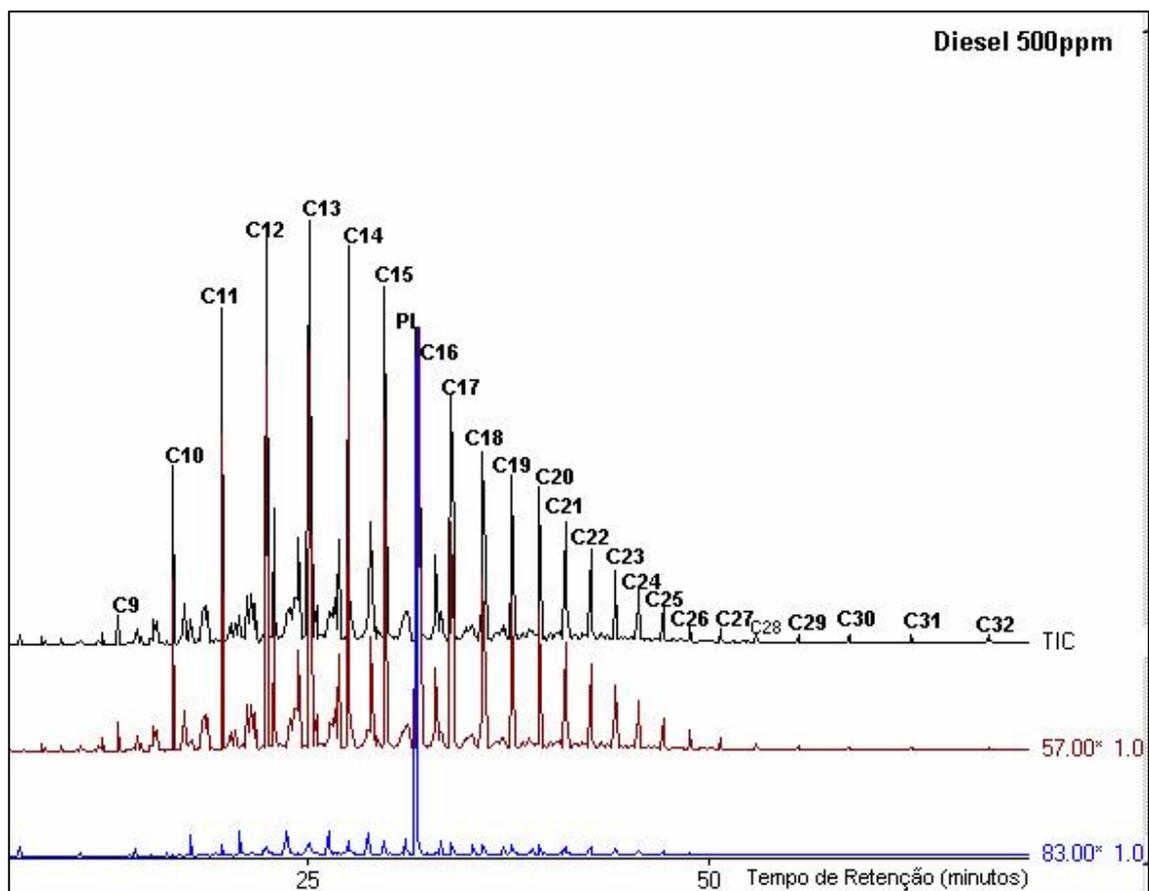
Duto	Julho/00	Refinaria Presidente Getúlio Vargas/PR	4.000.000
Trem da Companhia ALL	Julho/00	Ponta Grossa	60.000
Trem da Companhia ALL	Julho/00	Ponta Grossa	20.000
N/T Vergina II	Novembro/00	São Sebastião/SP	91,57
Duto/Petrobrás	Fevereiro/01	Córrego Caninana do Rio Nhundiaquara	4.000
Plataforma P-36	Março/01	Bacia de Campos	1.500
Caminhão	Abril/01	BR-277 entre Curitiba - Paranaguá	30.000
Trem de carga Ferrovia Novoeste	Mai/01	Área de preservação de Campo Grande/MS	35.000
Oleoduto/Petrobras	Mai/01	Barueri/SP	200.000
Navio Princess Marino	Agosto/01	Ilha Grande/RJ	715
Monobóia	Outubro/01	São Francisco do Sul/SC	150
Navio Norma	Outubro/01	Paranaguá/PR	392.000 (Nafta)
Transatlântico Coronia	Fevereiro/02	Baía de Guanabara/RJ	50.000
Navio Brotas	Mai/02	Baía de Ilha Grande/RJ	16.000 (petróleo leve)
Tanque de óleo	Junho/02	Pinhais/02	15.000
Vazamento Pier Sul do Term. M. A. Barroso	Junho/02	São Sebastião/SP	25.000
Navio (desativado) Meganar	Março/04	Baía de Guanabara/RJ	2.000
Navio Vicuña	Novembro/04	Baía de Paranaguá/PR	3 a 4 milhões de litros de óleo

Anexo 9.2

Dados completos sobre o óleo diesel usado no experimento

Anexo 9.3

Cromatograma do padrão e dados completos dos hidrocarbonetos alifáticos durante os seis meses de coleta.



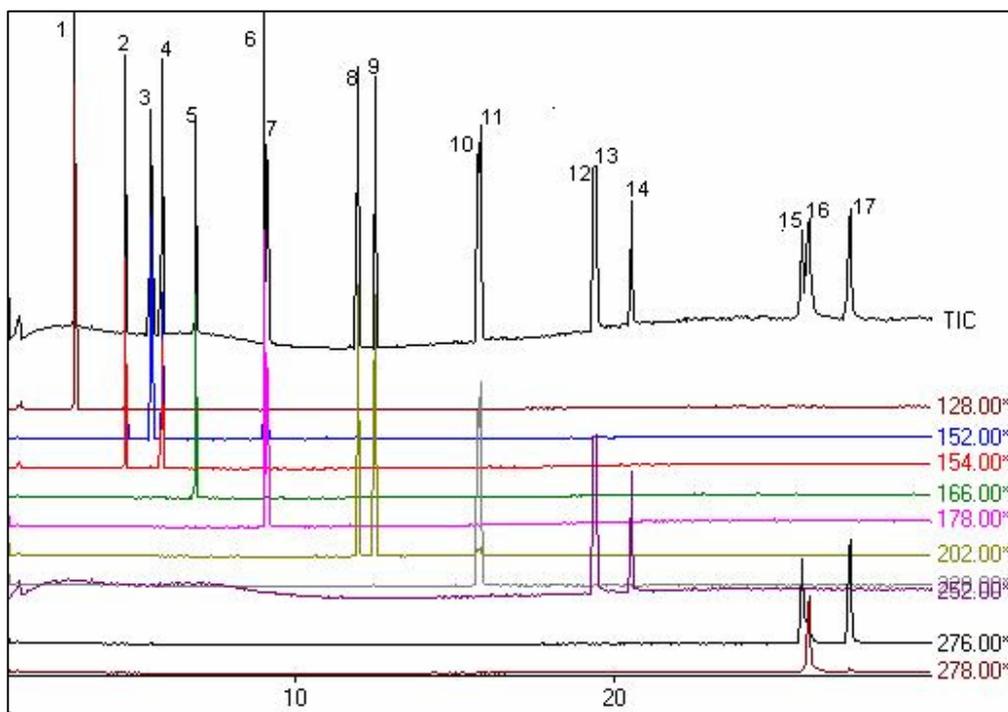
ANÁLISES DE SEDIMENTOS

	OLEO1F1	OLEO2F1	OLEO3F1	OLEO4F1	OLEO5F1
HIDROCARBONETOS TOTAIS DO PETRÓLEO (HTP) (mg/kg)					
Cromatográfico (mg/kg)	1820,04	4621,75	7277,01	66,43	77,58
HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS (ug/kg)					
C07	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C08	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C10	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C11	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C12	<LD	308,61	295,44	<LD	<LD
C13	348,13	6002,15	3416,79	442,82	<LD
C14	4802,23	20101,17	11263,91	1668,99	141,49
C15	14829,36	37678,73	22839,64	2476,12	373,07
C16	848,69	2699,92	2219,40	24,27	<LD
C17	27134,47	55916,44	41518,29	1940,37	1649,97
C18	26383,87	56218,35	42549,07	1689,53	1149,19
C19	46090,70	60555,34	47148,55	1728,01	1063,03
C20	24958,50	58648,69	48019,28	2665,62	1527,13
C21	21113,19	50513,06	52385,42	2074,17	1326,47
C22	17429,42	59182,00	34461,41	1616,58	1003,61
C23	26109,43	67372,02	30027,34	1227,37	798,28
C24	10133,59	28879,02	20310,02	999,38	836,64
C25	7676,25	19767,50	22453,55	2277,46	1756,40
C26	3651,44	9453,45	7658,86	468,56	726,07
C27	2305,19	5529,04	4716,34	1100,18	2025,34
C28	927,45	2607,61	2771,57	384,50	1168,94
C29	2326,07	3499,22	3607,71	3414,37	13496,56
C30	327,16	932,39	1007,51	215,36	1050,30
C31	928,89	1396,91	1655,46	1318,45	6249,76
C32	<LD	224,91	322,31	<LD	<LD
C33	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
C34	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

DIS1F1	DIS2F1	DIS3F1	DIS4F1	DIS5F1	BIOS1F1	BIOS2F1	BIOS3F1	BIOS4F1	BIOS5F1	
473,81	7,45	1698,52	209,24	653,06	508,35	438,20	10,32	163,48	191,63	
										LD (ug/kg)
37,99	77,24	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	16,15	<LD	<LD	0,01
<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	11,71	<LD	<LD	0,01
<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01
<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01
<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01
<LD	<LD	452,15	3,36	<LD	26,60	106,69	<LD	<LD	<LD	0,01
318,42	<LD	5289,40	168,17	10,02	<LD	842,48	<LD	62,68	<LD	0,01
3569,94	29,86	14093,76	933,10	206,49	6180,76	2403,12	22,28	541,84	14,38	0,01
10866,03	232,12	23195,12	2233,80	980,92	19056,84	4662,49	48,38	1286,34	53,99	0,01
17426,86	662,47	29857,00	3167,03	2387,09	28365,25	6784,22	<LD	1412,48	67,09	0,01
22406,29	664,30	34449,96	3128,58	2712,29	36965,73	9274,66	234,77	2358,31	148,97	0,01
23622,85	623,85	33235,86	3710,66	4980,09	37711,96	9468,10	312,74	1910,78	197,08	0,01
41338,87	571,58	34782,33	3695,88	3932,41	42239,03	12484,00	405,59	2610,92	314,20	0,01
40469,15	602,89	33285,02	4361,19	5341,66	67705,40	12890,36	484,57	3435,17	591,81	0,01
21390,13	521,99	29010,07	4011,42	5824,75	68733,71	11127,30	376,80	3141,36	794,81	0,01
18544,45	438,78	26292,80	3881,33	4656,30	36739,29	9187,25	286,27	2874,55	697,13	0,01
23936,79	345,52	43849,54	3278,00	5255,62	47387,22	7274,99	234,56	2189,91	824,78	0,01
11908,14	295,67	16183,58	2609,03	3976,38	26352,77	7287,36	226,82	2377,68	429,90	0,01
9400,04	243,71	17632,11	2717,25	4866,04	24123,40	7824,67	418,71	2745,83	1078,63	0,01
3677,62	149,39	6948,88	1891,93	5899,40	10459,09	2595,21	109,66	872,27	567,15	0,01
2081,45	108,65	4346,31	1163,73	3765,10	5570,91	1787,03	93,31	894,07	472,34	0,01
1123,91	69,18	2600,04	872,49	2396,40	3433,47	616,58	47,90	482,21	64,01	0,01
1005,51	50,03	2014,11	709,55	3375,13	2904,04	1521,60	143,30	2851,25	1261,28	0,01
375,84	21,50	870,16	339,01	1325,95	1198,52	308,34	<LD	400,56	328,51	0,01
394,98	<LD	795,27	375,24	2184,27	1257,74	846,90	79,21	1674,37	947,25	0,01
117,57	<LD	291,76	121,69	492,79	382,85	108,48	<LD	124,03	30,98	0,01
<LD	<LD	<LD	87,20	658,04	<LD	<LD	<LD	<LD	144,23	0,01
<LD	<LD	<LD	16,25	150,17	<LD	<LD	<LD	<LD	12,08	0,01

Anexo 9.4

Cromatograma do padrão e dados completos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos durante os seis meses de coleta.



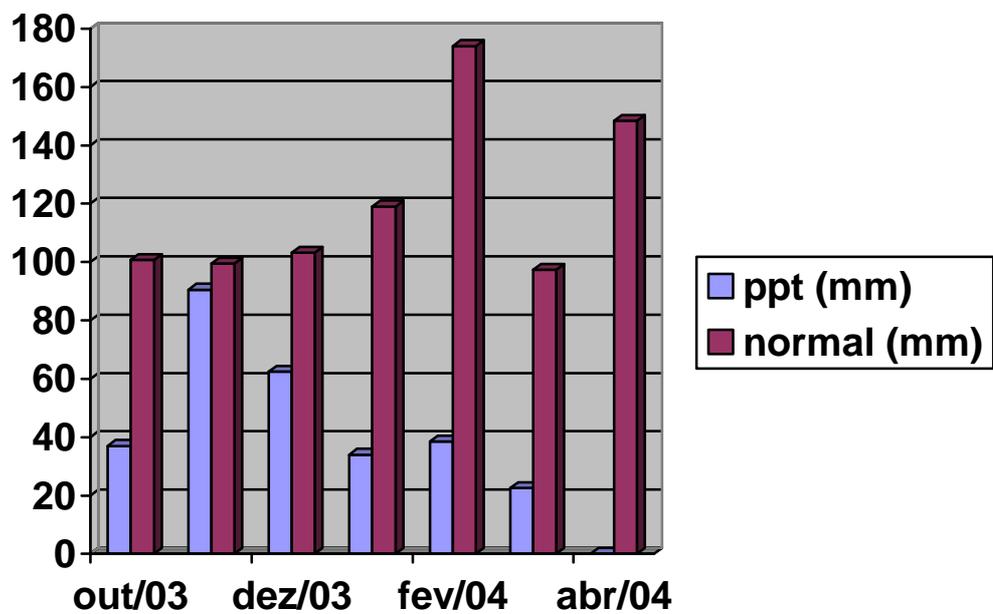
ANÁLISES DE SEDIMENTOS

	OLEO1F2	OLEO2F2	OLEO3F2	OLEO4F2	OLEO5F2	DIS1F2	DIS2F2	DIS3F2	DIS4F2	DIS5F2
HPAs (ug/kg)										
naftaleno	0,77	<LD	<LD	<LD	0,53	<LD	<LD	1,99	0,74	<LD
acenaftileno	<LD	<LD	<LD	1,38	<LD	4,17	<LD	<LD	31,93	2,80
acenafteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	9,18	1,77
fluoreno	74,34	165,22	64,26	<LD	<LD	57,93	<LD	115,93	39,32	48,34
fenantreno	323,06	488,81	206,81	56,91	33,45	438,04	7,86	355,79	421,94	15,18
antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	13,67	56,19	0,79	<LD	78,41	82,65
fluoranteno	66,72	205,17	229,85	105,61	<LD	377,70	1,42	160,82	494,11	95,45
pireno	98,12	348,00	289,93	131,88	<LD	584,47	<LD	181,49	454,23	44,51
benzo(a)antraceno	11,79	148,83	199,20	44,90	91,01	94,79	<LD	85,01	168,66	88,11
criseno	44,68	295,19	357,03	105,46	169,12	177,34	<LD	146,11	178,56	37,43
benzo(b)fluoranteno	11,59	31,55	89,77	24,35	21,22	109,21	<LD	25,43	188,86	23,24
benzo(k)fluoranteno	6,59	18,37	49,45	14,91	15,41	66,16	<LD	16,70	96,31	35,38
benzo(a)pireno	6,73	22,09	47,00	14,50	36,45	69,08	<LD	16,21	187,46	33,82
dibenzo(a,h)antraceno	3,76	17,40	29,31	7,36	15,77	72,65	<LD	4,42	154,82	6,94
benzo(ghi)perileno	<LD	2,21	7,05	0,50	1,93	7,31	<LD	1,46	26,34	24,57
indeno(1,2,3-cd)pireno	1,26	16,09	10,54	14,40	23,83	66,59	<LD	6,96	133,42	2,48

	BIOS1F2	BIOS2F2	BIOS3F2	BIOS4F2	BIOS5F2	LD
HPAs (ug/kg)						LD
naftaleno	0,56	<LD	<LD	2,79	<LD	0,50
acenaftileno	<LD	<LD	<LD	3,52	1,42	0,50
acenafteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,50
fluoreno	116,83	90,57	57,48	<LD	1,04	0,50
fenantreno	502,28	408,79	197,33	85,79	45,82	0,50
antraceno	94,86	<LD	<LD	65,28	14,99	0,50
fluoranteno	156,75	306,93	318,63	208,48	224,51	0,50
pireno	<LD	210,51	273,09	317,71	251,49	0,50
benzo(a)antraceno	116,98	78,07	174,71	129,91	133,26	0,50
criseno	184,54	134,31	229,93	237,32	237,42	0,50
benzo(b)fluoranteno	76,43	25,39	56,29	56,16	127,43	0,50
benzo(k)fluoranteno	7,04	11,32	21,92	30,27	<LD	0,50
benzo(a)pireno	25,07	<LD	40,53	58,18	68,98	0,50
dibenzo(a,h)antraceno	17,41	12,04	53,32	48,09	56,52	0,50
benzo(ghi)perileno	3,03	<LD	8,59	6,92	11,10	0,50
indeno(1,2,3-cd)pireno	16,48	3,32	40,16	47,71	53,24	0,50

Anexo 9.5

Dados sobre precipitação pluviométrica na cidade do Rio Grande



Fonte: FURG