



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Câmpus de Araraquara  
Instituto de Química



*Lucy Elaine Sugawara*

**Impacto da poluição ambiental em  
manguezal brasileiro,  
bioacumulação de HPAs em *Spartina  
alterniflora***

Tese de doutorado apresentada ao  
Instituto de Química, Universidade Estadual  
Paulista como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Química

**Orientador:** Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro

**Coorientadora:** Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara

2022

S947i Sugauara, Lucy Elaine  
Impacto da poluição ambiental em manguezal brasileiro, bioacumulação de  
HPAs em *Spartina alterniflora* / Lucy Elaine Sugauara. -- Araraquara, 2022  
252 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de  
Química, Araraquara  
Orientador: Clovis Augusto Ribeiro  
Coorientadora: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Sedimentos marinhos. 3.  
Planejamento experimental. 4. Toxicologia ambiental. 5. Plantas do manguezal.

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química,  
Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: "Impacto da poluição ambiental em manguezal brasileiro, bioacumulação de HPAs em *Spartina Alterniflora*"

**AUTORA: LUCY ELAINE SUGAUARA**

**ORIENTADOR: CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO**

**COORIENTADORA: MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



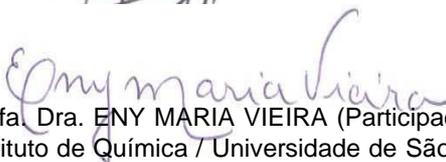
Profa. Dra. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI (Participação Virtual)  
Departamento de Química Analítica/Instituto de Química UNESP-Araraquara



Prof. Dr. FLAVIO SOARES SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Química Analítica e Química Ambiental / Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI - Itajubá



Prof. Dr. MARIO SERGIO GALHIANE (Participação Virtual)  
Departamento de Química/Faculdade de Ciências - UNESP-Bauru



Profa. Dra. ENY MARIA VIEIRA (Participação Virtual)  
Instituto de Química / Universidade de São Paulo - USP - São Carlos



Profa. Dra. MARIA LUCIA RIBEIRO (Participação Virtual)  
Departamento de Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente/Universidade de Araraquara-UNIARA-Araraquara

Araraquara, 10 de fevereiro de 2022.

## DADOS CURRICULARES

*Lucy Elaine Sugauara*

### 1- DADOS PESSOAIS:

**Nascimento:** 26 de junho de 1979

**Nacionalidade:** Brasileira

**Naturalidade:** São Paulo/SP

**Filiação:** Walter Sugauara

Inês Takabayashi

**Endereço:**

Rua Comendador Pedro Morganti, 919

Bairro São José

Araraquara/SP

CEP: 14.801-395

**email:** lucy\_sugauara@yahoo.com.br

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Departamento de Química Analítica

Rua Professor Francisco Degni, 55

Bairro Jardim Quitandinha

Araraquara/SP

CEP:14800-060

### Nome em citações bibliográficas:

SUGAUARA, L. E.;SUGAUARA, LUCY ELAINE

## **2- FORMAÇÃO ACADEMICA**

### **2004 – 2012 Graduação: Licenciatura em Química**

- Grande área: Química
- Instituição: Instituto de Química - UNESP
- Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

### **2011 – 2014 Mestrado em Química**

- Grande área: Química Analítica
- Subárea: Química Ambiental
- Instituição: Instituto de Química – UNESP
- Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi
- Título: Influência da fuligem de cana-de-açúcar na presença de HPA em hortaliças de consumo humano.

## **3- EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E DIDÁTICA**

### **Estágio Docência**

- Disciplina: Espectroanalítica
- Curso: Bacharelado em Química
- Período: 2º Semestre/ 2014
- Instituição: Instituto de Química - UNESP
- Supervisor: Edilene Cristina

### **Docência em disciplina**

- Disciplina: Análises Físico-Químicas e microbiológicas ambientais
- Curso: Técnico Controle Ambiental
- Período: 2º Semestre/ 2014
- carga horaria: 316 horas
- Instituição: UNIFEQB (Centro Universitário Octávio Bastos)

## **Atuou como docente mini-curso de cromatografia (45° Semana de Química)**

- Carga Horaria: 4 horas
- Período: 2° semestre/ 2015

## **Analista em Projeto de Prestação de Serviço**

- Atuação como analista no projeto de prestação de serviços “análise diária do teor de mercaptanas em gás natural”, com interveniência da FACTE (Fundação de Apoio a Ciência, Tecnologia e Educação).
- Período: 01/07/2011 até 2° semestre de 2015
- Período: 01/10/2018 até 2° semestre de 2021

## **PRINCIPAL PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO**

- Prado, G.F., Zanetta, D.M.T., Arbex, M.A., Braga, A.L., Pereira, L.A.A., de Marchi, M.R.R., de Melo Loureiro, A.P., Marcourakis, T., Sugauara, L.E., Gattás, G.J.F. and Gonçalves, F.T., 2012. Burnt sugarcane harvesting: particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. **Science of the total environment**, 437, pp.200-208.
- Pusceddu, F. H., Sugauara, L. E., de Marchi, M. R., Choueri, R. B., & Castro, Í. B. (2019). Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system. **Marine pollution bulletin**, 142, 576-580.
- BOUROTTE, Christine LM et al. Trace metals and PAHs in topsoils of the University campus in the megacity of São Paulo, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

### **3- PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CURSOS:**

#### ***Curso Bioensaios biologia molecular e celular***

- Local: UNESP Rio Claro\_SP
- Carga Horária: 30 horas

#### ***ISPAC: International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds***

- Período: 8 a 12 de setembro de 2013
- Local: Corvallis-OR/ Estados Unidos
- Trabalho apresentado em poster: PAHs in leaves vegetables under the influence of sugarcane burning in Brazil

#### ***ISPAC: International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds***

- Período: 13 a 17 de setembro de 2015
- Local: Bordeaux/ França
- Trabalho oral apresentado: PAHs occurrence in leafy vegetables highly consumed in Brazil

#### ***1º Workshop de inovação e empreendedorismo do IQ- UNESP***

- Período: 29-30 de março de 2016
- Carga Horária: 12 horas

#### ***III Simpósio de Ecotoxicologia***

- Período: 18 a 20 de abril de 2016
- Local: UNESP Rio Claro – SP
- Carga horária: 3 horas

#### ***41st international Symposium on capillary Chromatography***

- Período: 18 a 20 de abril de 2016
- Local: Fort Worth- Texas/ Estados Unidos
- Trabalho apresentado em poster: PAHs in Mangrove region: method validation and application to samples from Southeast Brazil

#### ***ECOTOX– 12th SETAC Latin America Biennial Meeting***

- Período: 7 a 10 setembro de 2017
- Local: Santos-São Paulo/Brasil
- Apresentação oral: Determinação de HPAs em *Spartina alterniflora*: aspectos analíticos e ambientais

*Dedico este trabalho à todos os amigos e colaboradores pelo esforço  
e dedicação para comigo e com a ciência.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço á Deus e meus guias espirituais por tudo em minha vida.*



*Agradeço à minha família de sangue e de coração, pelas broncas nas horas de desânimo, pelo apoio nas horas de fraqueza e pelo "colo" nas horas de desespero.*



*Agradeço imensamente a Professora Mary por todo apoio, paciência e carinho, por nunca duvidar da minha capacidade.*



*Agradeço aos "médicos" do corpo, mente e espírito por me acompanharem nesta caminhada.*



*Agradeço as minhas amigas RITA e Flu por me acompanhar nesta etapa da vida.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001*

*Agradeço a FACTE pela pelo apoio financeiro indispensáveis para a realização deste trabalho.*

*“A amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pesar o que se pensa nem medir o que se diz.”*

*George Elliot*

*“Nós sempre precisamos de amigos. Gente que seja capaz de nos indicar direções, despertar o que temos de melhor e ajudar a retirar excessos que nos tornam pesados. É bom ter amigos. Eles são pontes que nos fazem chegar aos lugares mais distantes de nós mesmos.”*

*Padre Fábio de Mello*

## RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes historicamente conhecidos, apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas sendo amplamente distribuídos e encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais. São considerados, dentre a classe de hidrocarbonetos, os mais tóxicos existentes, razão da grande importância dos estudos acerca desta classe de compostos. A região da Baixada Santista é historicamente conhecida por seus altos níveis de contaminantes ambientais, possuindo no seu entorno Cubatão com uma das regiões industriais mais densas, o porto de Santos com seu intenso tráfego de navios de carga, diversos locais de armazenamento de produtos derivados de petróleo e grandes áreas com crescimento populacional desordenado como o Dique da Gilda, a maior comunidade de palafita do Brasil. Este estudo teve como objetivo geral avaliar o comportamento da espécie *Spartina alterniflora*, quanto ao acúmulo de HPAs em estuário da zona litorânea do estado de São Paulo. Para isso, foram validados métodos de extração de HPAs para análise cromatográfica (GC-MS e/ou HPLC-FLU) de amostras de sedimento e de *Spartina alterniflora*, planta invasora conhecida por seu potencial biorremediador de contaminantes orgânicos e inorgânicos. Os métodos validados para análise de HPAs em sedimento e *Spartina alterniflora*, incluíram a extração por solvente em banho de ultrassom e análise por GC-MS, alcançando limites de quantificação de 15 a 20 ng g<sup>-1</sup>. Houve correlação entre as concentrações encontradas na planta (parte aérea + raiz) e as concentrações encontradas no sedimento próximo a planta (R<sup>2</sup>=0,842), indicando que esta espécie apresenta potencial de bioremediação para os HPAs. As concentrações de HPAs encontradas em *Spartina alterniflora* foram de 209±30 a 1581±133 ng g<sup>-1</sup> e em sedimento, a máxima concentração encontrada foi de 66.451 µg kg<sup>-1</sup>, valor dez vezes inferior à maior concentração publicada pela CETESB em 2001 de 734.000 µg kg<sup>-1</sup> (para o mesmo ponto incluído neste trabalho). Esta observação pode ser atribuída a alterações no parque industrial de Cubatão (modificação das políticas públicas, mudança de processos, etc), ocorridas nas duas décadas entre os períodos de amostragem: 2000 e 2017. Todas as amostras de sedimento mostraram fitotoxicidade (*Lactuca sativa*) e para o teste em organismo (*Tiburella viscana*) mais de 60% das amostras indicou toxicidade significativa. No entanto, sendo a Baixada Santista uma região historicamente bastante impactada, a toxicidade encontrada não pode ser correlacionada apenas com os HPAs. Foram calculadas as razões de diagnóstico (ratios), de acordo com diversas referências da literatura, sendo possível inferir que fontes pirogênicas apresentam maior contribuição para os HPAs presentes na região estudada. Utilizando os PCA foi possível agrupar as amostras com o somatório das concentrações de todos os HPAs sendo o fenantreno, antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno as respostas mais significativas para este agrupamento.

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are historically known contaminants. They have carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties, being widely spread and found as constituents of complex *mixtures* in all environmental areas. In the class of hydrocarbons, they are considered the most toxic, that being the reason for the great importance of the studies about this class of compounds. The region of Baixada Santista is historically known for its high levels of environmental contaminants, having in its surroundings: Cubatão, home of one of the densest industrial regions; the port of Santos with its intense traffic of cargo ships; several storage silos housing derivatives of oil; and large areas with population growing chaotically such as Gilda's Dique, the largest stilt slum in Brazil. This study aimed to evaluate the behavior of the species *Spartina alterniflora*, focusing on the accumulation of PAHs in estuary areas in the coastal zone in Sao Paulo. In order to achieve this goal, methods of PAH extraction were validated for chromatographic analysis (GC/MS and/or HPLC/FLU) of sediment samples and *Spartina alterniflora*, an invasive plant known for its bioremediation potential of both organic and inorganic contaminants. The validated methods for PAHs analysis in sediment and *Spartina alterniflora* included solvent extraction in an ultrasound bath and GC-MS analysis, reaching quantification limits of 15 to 20 ng g<sup>-1</sup>. A correlation between the concentrations found in the plant (shoot + root) and the concentrations found in the sediment near the plant ( $R^2=0.842$ ) was identified, indicating that this species has potential for bioremediation for PAHs. The PAH concentrations found in *Spartina alterniflora* ranged from 209±30 to 1581±133 ng g<sup>-1</sup> and in sediment, maximum concentration of 66,451 µg kg<sup>-1</sup>. Both concentrations are lower than the concentrations published in a 2001 CETESB study, which reported maximum of 734,000 µg kg<sup>-1</sup> for the same area included in this work. This observation can be attributed to changes in the industrial park of Cubatão (industries leaving the area, changes in processes, etc.), which occurred in the two decades between the sampling periods of 2000 and 2017. All sediment samples showed phytotoxicity (*Lactuca sativa*) and more than 60% of the organism (*Tiburella viscana*) test samples indicated significant toxicity. The Baixada Santista is a highly impacted region, however the toxicity found cannot be correlated with PAHs alone. The diagnostic ratios were calculated according to several references in the literature, making it possible to infer that pyrogenic sources present the greatest contribution to the PAHs detected source in the studied area. By using PCA, it was possible to group the samples with the sum of the concentrations of all PAHs, with phenanthrene, anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene and indene(1,2,3-cd)pyrene being the most significant responses for this grouping.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens de acidentes ambientais causados pelo vazamento de petróleo. A) Paraná 2000: óleo cru nos rios Arroio Saldanha, Barigui e Iguçu; B) Paraná: caranguejo coberto de petróleo C) Golfo do México: 2010 explosão da plataforma Deepwater Horizon; D) Louisiana, 2000: pássaro coberto de petróleo; E) Alagoas, 2019: mancha de óleo praia do Pontal do Peba; F) Cabo de Santo Agostinho, 2019: caranguejo coberto de óleo na praia. 29
- Figura 2.** Estimativa anual de novos casos de displasia no Brasil para o triênio 2020-2022 para cada 100 mil habitantes. 38
- Figura 3.** Mecanismo proposto para a ação mutagênica do benzo(a)pireno 40
- Figura 4.** Disfunções endócrinas: (a) resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista. 41
- Figura 5.** Estrutura da região de Baía (Bay) e região similar de Baía (Baylike) 42
- Figura 6.** A) Floração de *Spartina alterniflora*; B) Predominância da espécie em região alagada de mangue; C) Ocorrência mundial. 51
- Figura 7.** Localização da faixa do pré sal em azul mais escuro e divisão das Bacias de Campos e de Santos. 53
- Figura 8.** Incêndios que atingiram a região de São Vicente A) localização do bairro da Alemoa; B) localização dos terminais de armazenamento líquido que explodiram; C) foto do evento; D) fumaça vista da rodovia. 55
- Figura 9.** Localização do Dique da Gilda (A) organização do Dique da Gilda, localização do Caminho de São Sebastião em amarelo (B) 56
- Figura 10.** Caminho de São Sebastião: A) foto de parte do conjunto de construções irregulares de palafita; B) foto do evento; C) foto da degradação ambiental próximo à estas construções; D) fotos após o evento. 57
- Figura 11.** *Amphipodos Leptocheirus plumulosus* e *Tiburonella viscana* 66
- Figura 12.** Planejamento em estrela 68
- Figura 13.** Superfícies de respostas geradas por modelos quadráticos na otimização de duas variáveis: (A) máximo; (B) platô; (C) máximo; fora da região experimental; (D) mínimo e (E) superfície de sela. 69
- Figura 14.** Localização do ponto de coleta A) mapa de São Vicente com a localização do Instituto de Biociências Campus Litoral\_UNESP em destaque e o ponto de coleta; B) Portinho ponto de coleta. 74
- Figura 15.** *Spartina alterniflora* limpeza e preparo, inteira (A); somente as raízes (B) e somente as folhas (C). 75

<b>Figura 16.</b> Região de estudo, área impactada em destaque vermelho e área não impactada (amostra branco) área em destaque roxo	76
<b>Figura 17.</b> Localização dos pontos de coleta das amostras provenientes de áreas não impactadas: A) destaque para o local de coleta; B) distância até o Instituto de Biociências	77
<b>Figura 18.</b> Pontos de amostragem CETESB influências nas regiões	78
<b>Figura 19.</b> Pontos de amostragem 2017.	80
<b>Figura 20.</b> Método de extração previamente otimizado para A) amostras de hortaliças; B) método aplicado as amostras de <i>Spartina alterniflora</i> ; C) sedimento superficial provenientes de mangue.	91
<b>Figura 21.</b> Método otimizado para extração de HPAs em <i>Spartina alterniflora</i> .	94
<b>Figura 22.</b> Fluxograma método otimizado e validado para extração de HPAs em amostras de sedimento.	98
<b>Figura 23.</b> Teste <i>Lactuca sativa</i> (A) controle, areia lavada (B) amostra de sedimento	101
<b>Figura 24.</b> Teste ecotoxicológico com <i>Tiburinella viscana</i>	102
<b>Figura 25.</b> Cromatograma (GC-MS CP 3800, Varian Saturno 2000), obtido da análise de solução padrão mista de concentração de 5 µg mL <sup>-1</sup> para cada HPA diluído em diferentes solventes: (A) solvente isooctano; (B) solvente n-hexano.	105
<b>Figura 26.</b> Cromatograma (GC-MS, Varian CP 3800 MS 2000) solução padrão dos HPAs, a 5 µg mL <sup>-1</sup> e solução padrão deuterado a 2,0 µg mL <sup>-1</sup> modo scan, destaque para os compostos onde não houve total separação.	106
<b>Figura 27.</b> Cromatograma solução padrão 2,5 µg mL <sup>-1</sup> (GC-MS QP 2020 Shimadzu método descrito Tabela 10. A) cromatograma da aquisição modo SCAN; B) BaA+CriD10+Cri; C) BbF+BkF e D) Ind+Dib	109
<b>Figura 28.</b> Estruturas das fases estacionárias das colunas ZB-5MS (1,4-bis(dimetilsiloxi)fenileno dimetil polissiloxano) e RTX-5MS (difetil dimetil polissiloxano).	110
<b>Figura 29.</b> Cromatograma obtido na análise em HPLC-FLU de solução mista de padrões de HPAs de concentrações 5,12 a 256 ng mL <sup>-1</sup> com destaque aos compostos de baixa resposta (setas amarelas e verdes).	112
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas HPLC-FLU obtidos na análise da mistura de padrões de HPAs (concentração 0,8~40,0 ng mL <sup>-1</sup> ) com a utilização de diferentes intensidades de PMT (A) alta e (B) média	113

<b>Figura 31.</b> Cromatogramas HPLC-FLU referentes as análises de solução padrão de concentração 4,56 a 228 ng mL <sup>-1</sup> com diferentes programações no detector em cinza (3 intervalos de comprimento de onda) e em azul (9 intervalos de comprimento de onda).	115
<b>Figura 32.</b> Teste de eficiência do método de extração de HPAs por ultrassom em amostras de sedimento e <i>Spartina alterniflora</i>	119
<b>Figura 33.</b> Comparativo entre os intervalos de confiança das recuperações do teste de diferentes temperaturas de acondicionamento para amostras de sedimento.	127
<b>Figura 34.</b> Comparativo entre as temperaturas de acondicionamento para amostras de <i>Spartina alterniflora</i>	128
<b>Figura 35.</b> Porcentagem de recuperação dos HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> e sedimento, extraídos com e sem o uso de vórtex.	130
<b>Figura 36.</b> Intervalo de confiança do teste da utilização de vórtex na extração de HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> .	131
<b>Figura 37.</b> Intervalo de confiança do teste de utilização de vórtex na extração de HPAs em amostras de sedimento.	132
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas (HPLC-FLU) para <i>Spartina alterniflora</i> : amostra branco (A1) fortificada e extraída com n-hexano:acetona 1:1 (A2); Para sedimento: amostra branco (B1) e amostra fortificada extraídas com diclorometano:acetona 1:1 (B2)	139
<b>Figura 39.</b> Gráfico de superfície resposta da $\Sigma$ de concentrações de HPA	145
<b>Figura 40.</b> Gráficos superfície de resposta do benzo(a)pireno.	147
<b>Figura 41.</b> Comparativo entre análises do extrato de <i>Spartina alterniflora</i> folhas e caule (preto) e de raiz (pink), aplicação do método validado, análise em GS-MS Shimadzu.	151
<b>Figura 42.</b> Gráfico de Pareto referente aos resultados das extrações de sedimento	154
<b>Figura 43.</b> Gráficos de Pareto para a soma normalizada e para os dados de recuperação do benzo(a)pireno	155
<b>Figura 44.</b> Fluxograma da extração de HPAs em amostras de sedimento de acordo com dados do planejamento experimental e com base nos resultados de recuperação da soma normalizada de todos os compostos e do benzo(a)pireno.	156
<b>Figura 45.</b> Superfície de resposta dos resultados de recuperação do BaP	157
<b>Figura 46.</b> Método validado para extração de HPAs em <i>Spartina alterniflora</i>	158

<b>Figura 47.</b> Fluxograma do segundo método de extração de HPAs em amostras de sedimento validado.	162
<b>Figura 48.</b> <i>Spartina alterniflora</i> <b>A)</b> maré baixa; <b>B)</b> maré alta.	165
<b>Figura 49.</b> Pontos de coleta da <i>Spartina alterniflora</i> : região de coleta de amostras impactadas destacada em preto e não impactadas destacada em vermelho <b>(A)</b> ; pontos de coleta da região impactada <b>(B)</b> ; região de coleta de amostras não impactadas <b>(C)</b> .	166
<b>Figura 50.</b> Gráficos de intervalo de confiança (IC) e média das análises de HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> folhas+caule e <i>Spartina alterniflora</i> raízes, com nível de confiabilidade de 0,05.	172
<b>Figura 51.</b> Diferentes tipos de plantas estudadas em mangue para exposição de HPAs (LI et al., 2014)	175
<b>Figura 52.</b> Ponto de coleta 9 (próxima USIMINAS) e ponto 6 no Rio Pedreira (margem da Ilha Barnabé).	183
<b>Figura 53.</b> Pontos de amostragem do atual trabalho Rio Perequê P7 sem ponto CETESB correspondente, Rio Casqueira P10 e Largo da Pompeba P11 com respectivos pontos CETESB C10 e C11.	185
<b>Figura 54.</b> Canal de Bertiooga, pontos de amostragem do atual trabalho P6 e P4 e respectivos pontos CETESB C6 e C7.	186
<b>Figura 55.</b> Pontos de amostragem do atual trabalho P12, P13 e P14 e respectivos pontos CETESB C12, C25 e C13.	187
<b>Figura 56.</b> Pontos amostragem do atual trabalho P15, P16 e P17 e respectivos pontos CETESB C14, C15 e C16, ponto de amostragens atuais P20, P21 e P22 e ponto CETESB correspondente C17, delimitação do município em vermelho.	188
<b>Figura 57.</b> Portinho, ponto de coleta das amostras 20, 21 e 22.	189
<b>Figura 58.</b> Pontos de coleta das amostras de Bertiooga, BM amostra de mangue e BN amostra de nascente mapa em A e foto em B.	190
<b>Figura 59.</b> Locais de amostragem, Ariri e Cananéia, amostras não impactadas.	191
<b>Figura 60.</b> Gráfico de correlação entre COT e concentração de HPAs.	196
<b>Figura 61.</b> Gráfico de coeficiente de correlação entre as concentrações de HPAs e os resultados da análise granulométrica das amostras <b>(A)</b> fração grossa > 63 µm e > 1000 µm; <b>(B)</b> fração fina > 25 µm e ≤ 25 µm	197
<b>Figura 62.</b> Resultados do ratio (Fen/Pir) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.	199

<b>Figura 63.</b> Resultados do ratio (Fit/Pir) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.	200
<b>Figura 64.</b> Resultados do ratio (BaA/Cri) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.	201
<b>Figura 65.</b> Razões BbF/BkF em amostras de sedimento e prováveis fontes	202
<b>Figura 66.</b> Razões Ind/BghiP em amostras de sedimento e prováveis fontes	203
<b>Figura 67.</b> Razões de diagnóstico com a soma de 11 HPAs prioritários (L/H) em amostras de sedimento.	204
<b>Figura 68.</b> Razões de diagnóstico da somatória de HPAs, "pesados" de 4 a 6 (HW) e "leves" de 2 a 3 anéis aromáticos (LW).	205
<b>Figura 69.</b> Gráficos de correlação entre $\Sigma$ HPAs; <b>A)</b> sedimento X <i>Spartina alterniflora</i> TOTAL; <b>B)</b> SA <sub>RAÍZES</sub> X SA <sub>CAULE+FOLHAS</sub> ; <b>C)</b> SA <sub>TOTAL</sub> X SA <sub>RAÍZES</sub> e SA <sub>TOTAL</sub> X SA <sub>CAULE+FOLHAS</sub>	209
<b>Figura 70.</b> Germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> nos tratamentos controles e nas amostras de sedimentos.	211
<b>Figura 71.</b> Montagem do bioensaio utilizando <i>Tiburonella viscana</i> como organismo teste.	214
<b>Figura 72.</b> Distribuição espacial dos resultados qualitativos de toxicidade (para $p < 0,05$ ), Em vermelho as amostras que apresentaram maior toxicidade, em amarelo a amostra exibindo indício de toxicidade, em azul as amostras não tóxicas e em branco as amostras não testadas	220
<b>Figura 73.</b> <b>(A)</b> porcentagem explicada por cada PC; <b>(B)</b> Agrupamento das amostras de sedimento por PCA em função de cada HPA.	223
<b>Figura 74.</b> Mapa dos pontos agrupados de acordo com análise de PCA.	225
<b>Figura 75.</b> Influência das concentrações de HPAs na dispersão das amostras de sedimento.	226

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estrutura dos 16 HPAs considerados prioritários pela <i>Environmental Protect Agency</i> (EPA) dos Estados Unidos e respectivas massas molar ( $\text{g mol}^{-1}$ ), número CAS, ponto de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ ), solubilidade em água ( $\text{mg mL}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C}$ ), Log Kow, constante de Henry ( $\text{Pa m}^3\text{mol}^{-1}$ à $20^{\circ}\text{C}$ ) classificação de carcinogenicidade pela International Agency of Research on Cancer (IARC):	32
<b>Tabela 2.</b> Concentrações de $\Sigma$ HPA encontradas em sedimentos marinho e mangue em amostras provenientes de diferentes regiões.	45
<b>Tabela 3.</b> Relações de diagnóstico (RATIOS, eq.1, pg 19) para HPAs, encontradas na literatura	50
<b>Tabela 4.</b> Valores de $\Sigma$ HPAs na Baixada Santista, informadas em estudos na literatura	58
<b>Tabela 5.</b> Algumas técnicas de extração e quantificação de HPAs em amostras ambientais.	59
<b>Tabela 6.</b> Sumário das etapas referentes a parte experimental, apresentando pergunta a ser respondida em cada item e estratégia adotada.	73
<b>Tabela 7.</b> Pontos de coletas, coordenadas e data de coleta.	79
<b>Tabela 8.</b> Detalhes das campanhas de amostragem.	81
<b>Tabela 9.</b> Concentrações dos HPAs nas soluções padrão inicial e soluções estoque preparadas	83
<b>Tabela 10.</b> Especificações do GC-MS VARIAN CP 3800 MS 2000 utilizado e dados do método de análise dos compostos.	84
<b>Tabela 11.</b> Especificações do GC/MS-QP 2020 SHIMADZU e do método otimizado.	85
<b>Tabela 12.</b> Concentrações ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) das soluções padrão inicial (adquirida) e da solução padrão estoque, utilizada no estudo com o sistema HPLC-FLU	86
<b>Tabela 13.</b> Condições cromatográficas (HPLC-FLU) otimizadas para determinação de HPAs.	87
<b>Tabela 14.</b> Concentração em $\text{ng g}^{-1}$ dos HPAs após a fortificação das amostras com as soluções estoques.	89
<b>Tabela 15.</b> Fatores testados no planejamento completo e os níveis estabelecidos.	92
<b>Tabela 16.</b> Planejamento Experimental Completo 2k ( $k=4$ )	93
<b>Tabela 17.</b> Variáveis estabelecidas para a otimização de método de extração de HPAs das amostras de sedimento.	95
<b>Tabela 18.</b> Planejamento experimental fatorial fracionado para extração de HPAs em amostras de sedimento.	96
<b>Tabela 19.</b> Planejamento experimental do ponto central dos três fatores estudados.	97

<b>Tabela 20.</b> Parâmetros obtidos do método otimizado e validado no equipamento Varian GC MS CP 3800, valores em ng mL <sup>-1</sup> .	108
<b>Tabela 21.</b> Valores obtidos no método de separação e quantificação por GC MS SHIMADZU, concentrações em ng mL <sup>-1</sup> .	111
<b>Tabela 22.</b> Comprimentos de onda do método inicial e do método final com PMT fixo em médio.	114
<b>Tabela 23.</b> Parâmetros das curvas analíticas obtidas para HPAs, determinados por HPLC-FLU, concentrações em ng mL <sup>-1</sup>	116
<b>Tabela 24.</b> Valores de concentrações nas matrizes estudadas, após a fortificação e no extrato obtido após o processo explicitado na figura 32 (pag 118).	118
<b>Tabela 25.</b> Recuperação e CV, em porcentagem, dos HPAs em amostras fortificadas de sedimento e <i>Spartina alterniflora</i> . Análise por HPLC-FLU	120
<b>Tabela 26.</b> Recuperação e CV (n= 2), em porcentagem, na avaliação da influência da estratégia de secagem das amostras	122
<b>Tabela 27.</b> Concentrações nominais para as amostras fortificadas e nos extratos obtidos, de acordo com a Figura 32 (pag 118)	124
<b>Tabela 28.</b> Recuperações em porcentagem no teste de acondicionamento das amostras em diferentes temperaturas. n=2	125
<b>Tabela 29.</b> Variação de temperatura do banho de ultrassom conforme o tempo de uso.	133
<b>Tabela 30.</b> Recuperações das extrações (n = 3, banho de ultrassom, 10 minutos) de HPAs em sedimento efetuadas com aquecimento monitorado.	134
<b>Tabela 31.</b> Resultados do estudo da extração por DMFS: resposta modificada (recuperação normalizada) e coeficientes de variação. São apresentados os valores para cada HPA e para a somatória	137
<b>Tabela 32.</b> Resultados de recuperação obtidos, valores em porcentagem de recuperação (REC) e coeficientes de variação (CV), utilizando diferentes misturas de solventes no processo de extração por ultrassom e analisados por HPLC-FLU.	141
<b>Tabela 33.</b> Fatores estudados no planejamento completo e os níveis estabelecidos.	143
<b>Tabela 34.</b> Planejamento fatorial completo 2k para extração de 16 HPAs prioritários em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> e porcentagem de recuperação de cada HPA.	144
<b>Tabela 35.</b> Comparativo das melhores condições segundo resultados para $\Sigma$ HPA, benzo(a)pireno e as condições do método validado.	148
<b>Tabela 36.</b> Valores de limites de detecção e quantificação e faixa de trabalho do método de extração de HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> validado, os valores são expressos em ng g <sup>-1</sup>	149
<b>Tabela 37.</b> Variáveis estabelecidas para a otimização de método de extração de HPAs das amostras de sedimento.	152

<b>Tabela 38.</b> Descrição do planejamento fatorial fracionado 2k-2 , os resultados de recuperação para cada HPAs estudado e o valor da soma normalizado.	153
<b>Tabela 39.</b> Planejamento experimental do ponto central dos três fatores estudados	155
<b>Tabela 40.</b> Valores de limites de detecção e quantificação e faixa de trabalho do método de extração de HPAs validado em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> , os valores são expressos em ng g <sup>-1</sup>	160
<b>Tabela 41.</b> Valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método validado para amostras de sedimento, valores expressos em ng g <sup>-1</sup> .	161
<b>Tabela 42.</b> Dados comparativos entre os métodos de extração validados para amostras de sedimento, valores em ng g <sup>-1</sup>	164
<b>Tabela 43.</b> Concentrações de HPAs (ng g <sup>-1</sup> ) encontradas em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> (SA) (n=3).	167
<b>Tabela 44.</b> Valores reportados por Hong et. al.(2015) de incorporação de HPAs em <i>Spartina alterniflora</i> após 70 dias de exposição	170
<b>Tabela 45.</b> Concentrações médias encontradas nas folhas e raízes de <i>Spartina alterniflora</i> em ng g <sup>-1</sup> p.s.e respectivos desvios padrões.	171
<b>Tabela 46.</b> Concentrações de HPAs (ng g <sup>-1</sup> ) encontradas nas amostras de sedimento coletadas no pontos de amostragem indicados na Figura 19 (pag 80) n=3	178
<b>Tabela 47.</b> Concentração dos HPAs em cada amostra analisada e limites estabelecidos pelo CONAMA 454/2012 em (µg kg <sup>-1</sup> ) e concentrações encontradas nas amostras coletadas, em vermelho os valores acima do determinado para nível 1	193
<b>Tabela 48.</b> Concentrações de HPAs (µg kg <sup>-1</sup> ), análises de carbono orgânico total do sedimento fração final (µg kg <sup>-1</sup> ), normalização dos resultados.	195
<b>Tabela 49.</b> Valores de concentrações (∑ HPA ng g <sup>-1</sup> ) para amostras de sedimento e <i>Spartina alterniflora</i> coletadas nos mesmos pontos (Figura 19, pag 80)	206
<b>Tabela 50.</b> Resultados do teste de germinação em <i>Lactuca sativa</i> utilizando sedimento de mangue.	212
<b>Tabela 51.</b> Parâmetros monitorados durante o experimento.	216
<b>Tabela 52.</b> Resultado do experimento com <i>Tiburionella viscana</i> .	219

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Ace	Acenafteno
Acef	Acenaftileno
ACN	Acetonitrila
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
Ant	Antraceno
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BghiP	Benzo(ghi)pireno
BkF	Benzo(k)fluoranteno
CAS	Chemical Abstracts Services
CNA	Confederação Nacional dos Agricultores
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Conc	Concentração
Cri	Criseno
DahA	Dibenzo(a,h)antraceno
DCM	Diclorometano
DOE	Design of Experimental
EEA	European Environment Agency
EFSA	European Food Safety Authority
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária
EPA	Environmental Protection Agency
Fen	Fenantreno
Flu	Fluoranteno

FLU	Fluorescência
Flt	Fluoranteno
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
hER	Human Estrogen Receptor
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ind	Indeno(1,2,3-cd)pireno
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	International Programme on Chemical Safety
Koa	Coeficiente Octanol-Air
Kow	Coeficiente Octanol-Water
LC	Liquid chromatograph
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
ME	Método de Extração
MeOH	Metanol
MM	Massa molar
MOE	Margin of Exposure
MP	Material Particulado
MVA	Multivariate Analysis
Naf	Naftaleno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCC	Planejamento de Composto Central

P.E.	Ponto de Ebulição
P.F.	Ponto de Fusão
PFF	Planejamento Fatorial Fracionado
Pi	Pireno
Rec	Recuperação
Rn	Resposta normalizada
RSM	Response Surface Methodology
SOXWAVE	Soxhlet+ultrassom
SPE	Solid phase extraction
UE	União Européia
UM	Unidade de medida

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
CV	Coeficiente de Variação
D	Conveniência Global (Global Desirability)
d	Conveniência (Desirability)
g	Gramma
kg	Quilograma
L	Litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
rpm	Rotações por minuto
tr	Tempo de retenção
$\Sigma$	Somatório
$\lambda$	Lambda
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	31
1.1.1. HPAs e Saúde Humana	36
1.1.1.1. Carcinogenicidade	39
1.1.1.2. Alteração endócrina	40
1.1.2. HPAs e Meio Ambiente	42
1.1.3. Ocorrência de HPAs no Mangue	43
1.1.4. HPAs Ratios	46
1.1.4.1. Diferenciação entre Algumas Fontes Petrogênicas e Pirogênicas	47
1.1.4.2. Diferenciação entre Algumas Fontes Pirogênicas	48
1.2. <i>Spartina alterniflora</i>	50
1.3. Histórico da Baixada Santista com Relação à Exposição aos HPAs	52
1.3.1. Ano de 2010: Exploração em Escala Comercial do Pré-sal	52
1.3.2. Ano de 2015: Incêndio ALEMOA	54
1.3.3. Ano de 2017: Incêndio na Comunidade de Palafitas Denominado CAMINHO DE SÃO SEBASTIÃO	56
1.4. Extração e Análise dos HPAS	58
1.5. Testes biológicos	62
1.5.1. Teste de Fitotoxicidade	63
1.5.2. Testes em Organismos	64
1.6. Planejamento Experimental	66
1.6.1. A superfície de resposta (RSM: Response Surface Methodology)	67
1.7. Validação Analítica	69
1.7.1. Seletividade	70
1.7.2. Linearidade	70
1.7.3. Precisão	70
1.7.4. Exatidão	71
1.7.5. Limite de detecção	71
1.7.6. Limite de quantificação	71
1.7.7. Robustez	71

2. OBJETIVOS	72
3. PARTE EXPERIMENTAL	73
3.1. Amostragem	74
3.1.1. Coleta das Amostras para Otimização do Método de Extração	74
3.1.2. Plano de Amostragem	75
3.1.3. Pontos de Coleta: Área Não Impactada	76
3.1.4. Pontos de Coleta: Área impactada	77
3.1.5. Coleta de Amostras	81
3.2. Métodos Cromatográficos de Análise	82
3.2.1. GC-MS CP3800 VARIAN SATURN 2000	82
3.2.2. GC MS-QP 2020 SHIMADZU	85
3.2.3. HPLC- FLU VARIAN LC 920	86
3.3. Extração	88
3.3.1. Preparo das Amostras Fortificadas	88
3.3.2. Otimização do Processo de Extração	90
3.4. <i>Spartina alterniflora</i>	92
3.4.1. OTIMIZAÇÃO: Planejamento Experimental	92
3.4.2. VALIDAÇÃO: Método de Extração de HPAs em <i>Spartina alterniflora</i> (GC MS)	93
3.5. Sedimento	95
3.5.1. Extração por ultrassom com monitoramento de temperatura	95
3.5.2. Planejamento Experimental Fracionado ( $2^{k-2}$ )(GC-MS Varian)	95
3.5.3. Planejamento Experimental do Ponto Central (GC-MS Shimazu)	97
3.5.4. Validação do Método de Extração (GC-MS Shimadzu)	97
3.6. COMPOSIÇÃO: TAMANHO DAS PARTÍCULAS	98
3.6.1. Granulometria	98
3.6.2. Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS)	99
3.7. CARBONO ORGÂNICO TOTAL	99
3.8. TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	99
3.8.1. Teste com <i>Lactuca sativa</i>	100
3.8.2. Teste com <i>Tiburonella viscana</i>	101

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.1. MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE	104
4.1.1. GC-MS/MS CP3800 Varian Saturn 2000	104
4.1.2. GC MS/MS-QP 2020 SHIMADZU	108
4.1.3. HPLC- FLU Varian LC 920	111
4.2. MÉTODO DE EXTRAÇÃO	117
4.2.1. Testes Preliminares	117
4.2.1.1. TESTE da eficiência extração de HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> e sedimento pelo método de ultrassom	117
4.2.1.2. TESTE ETAPA DE SECAGEM influência da utilização de fluxo de nitrogênio na etapa de secagem, em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> (HPLC-FLU)	121
4.2.1.3. TESTE da influência da temperatura de acondicionamento na etapa de fortificação ( <i>Spartina anterniflora</i> e sedimento)	123
4.2.1.4. TESTE influência do uso de vórtex durante a extração de HPAs em amostras de sedimento e <i>Spartina alterniflora</i> (GC-MS Varian)	129
4.2.1.5. Extração de HPAs em amostras de sedimento com aquecimento	133
4.2.2. Extração de HPAs em amostras de sedimento por dispersão em fase sólida (GC-MS Varian)	135
4.2.2.1. Escolha do solvente de extração para amostras de <i>Spartina alterniflora</i> e sedimento, extração por ultrassom (HPLC-FLU)	138
4.3. OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	142
4.3.1. Otimização dos Método de Extração de HPAs em <i>Spartina alterniflora</i>	142
4.3.1.1. Planejamento Completo (GC-MS Varian)	142
4.3.1.2. Teste de aplicação do método de extração em amostras reais de <i>Spartina alterniflora</i>	149
4.3.2. Otimização do Método de Extração de HPAs em sedimento	152
4.3.2.1. Planejamento Experimental Fracionado ( $2^{k-2}$ )(GC-MS Varian)	152
4.3.2.2. Planejamento Experimental do Ponto Central (GC-MS Shimazu)	154
4.4. VALIDAÇÃO	158
4.4.1. Validação do método de extração de <i>Spartina alterniflora</i> (GC-MS Shimadzu)	158
4.4.2. Validação e aplicação do método de extração (GC-MS Shimadzu)	160

4.4.3. Validação do método de extração massa de 2,000 g (GC-MS Shimadzu)	162
4.5. Aplicação do Método de Extração de HPAs em Amostras de <i>Spartina alterniflora</i>	165
4.5.1. Concentração de HPAs nas folhas de <i>Spartina alterniflora</i>	173
4.5.2. Concentração de HPAs em outras espécies de plantas de regiões de mangue	174
4.6. Aplicação do Método de Extração em Amostras de Sedimento	177
4.6.1. Comparativo das Concentração de $\Sigma$ HPA16 do atual trabalho Valores da CETESB 2001 e Concentrações em outras regiões	181
4.6.2. Concentrações dos Pontos Controle	190
4.6.3. Concentração de de HPAs em sedimentos e Resolução CONAMA	192
4.6.4. Relação entre as Concentrações de HPAs e Carbono Orgânico Total	194
4.6.5. Relação entre Concentrações de HPAs e Análises Granulométrica	198
4.6.6. Ratios	198
4.6.7. Comparação entre as concentrações de HPAs encontras em sedimento e em <i>Spartina alterniflora</i> coletados no mesmo ponto	206
4.6.8. Testes Biológicos	210
4.6.8.1. <i>Lactuca sativa</i>	210
4.6.8.2. <i>Tiburionella viscana</i>	213
4.7. Análise das Componentes Principais	222
5. CONCLUSÕES	228
6. REFERÊNCIAS	229
7. ANEXOS	240
8. APÊNDICES	248

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O meio ambiente consiste em uma complexa rede interligada e harmoniosa, incluindo a biota e o meio abiótico, formada no decorrer de milhões de anos. Esta harmonia findou-se com o aumento das ações antrópicas ao longo do desenvolvimento humano.

A primeira revolução industrial com início na Inglaterra na segunda metade do século XVIII se espalhou pelo mundo acelerando o processo de degradação ambiental com o intuito do desenvolvimento de novas tecnologias e a produção em larga escala, o que acarretou a necessidade da busca por novos combustíveis. Nesse contexto, entre os séculos XVIII e XIX, o carvão mineral se tornou indispensável para o funcionamento dos primeiros motores movidos a vapor (NEVES & SOUSA, 2021).

Nos primeiros anos do século XX, a popularização dos automóveis ampliou ainda mais a demanda internacional por combustíveis de alto desempenho. Dessa forma, os combustíveis fósseis (então somente empregados na obtenção do querosene) passaram a ser essenciais para obtenção da gasolina. Algumas décadas mais tarde, essa mesma tendência transformou o diesel em combustível de grande utilização aumentando e consolidando a nossa dependência em relação ao petróleo e conseqüentemente, aumentando as emissões de contaminantes decorrente deste consumo (SOUSA, 2021).

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos nos estados gasoso, líquido e sólido, sendo composto em 75% de hidrocarbonetos de 4 a 26 átomos de carbonos, dividindo-se em alcanos, alcenos, alcinos, cicloalcanos e aromáticos. Uma vez inseridos no ambiente aquático, os óleos e seus derivados tendem a ser adsorvidos no material particulado e estes, são depositados nos sedimentos, e persistem por muitos anos, principalmente sob condições anóxicas, ou seja, na ausência de oxigênio (READMAN et al., 2002). Entre as substâncias que compõem o petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) apresentam grande preocupação ambiental, pois possuem ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos (PEREIRA NETO et al., 2000).

Uma das principais vias de entrada dos HPAs no meio ambiente é atribuída a diversos acidentes ambientais, relacionados ao processo de extração do petróleo,

seu transporte e possíveis vazamentos no decorrer dos processos ligados à cadeia extrativa/produzida.

Pode-se observar na Figura 1, imagens de três acidentes ambientais que ilustram o exposto anteriormente.

**Figura 1.** Imagens de acidentes ambientais causados pelo vazamento de petróleo. **A)** Paraná 2000: óleo cru nos rios Arroio Saldanha, Barigui e Iguazu; **B)** Paraná: caranguejo coberto de petróleo **C)** Golfo do México: 2010 explosão da plataforma Deepwater Horizon; **D)** Louisiana, 2000: pássaro coberto de petróleo; **E)** Alagoas, 2019: mancha de óleo praia do Pontal do Peba; **F)** Cabo de Santo Agostinho, 2019: caranguejo coberto de óleo na praia.



Fonte: Google imagens

O maior vazamento de petróleo no estado do Paraná ocorreu na cidade de Araucária nos dutos da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar) no Oleoduto Santa Catarina-Paraná (OSPAR) (LUBYI, 2021), pertencente à Petrobrás em julho de 2000 com o vazamento de quatro milhões de litros de petróleo cru (25.000 barris) causando a contaminação de toda a região dos rios Arroio Saldanha, Barigui e Iguaçu, prejudicando todo o ecossistema exposto (Figura 1A e 1B). De acordo com Roni Barbosa, membro da Comissão de Investigação do Acidente, membro do Sindicato dos Petroleiros do Paraná e Santa Catarina (Sindipetro), após 20 anos, as consequências do vazamento ainda podem ser percebidas: “Ainda hoje tem petróleo brotando do solo no terreno da refinaria. Os danos são quase que permanentes” (CUT BRASIL online 17/07/2020). Em 2021 no dia 8 outubro a Petrobras assinou acordo no valor de R\$ 1,4 bilhão em três Ações Cíveis Públicas (ACPs) que apuram danos ambientais decorrentes deste vazamento. A companhia, entretanto, ressalta que o acordo não implica reconhecimento jurídico dos danos alegado, nem de prática de conduta ilícita pela Petrobras. Mesmo após 21 anos não há indícios de uma responsabilização séria envolvendo ações e esforços na recuperação da região afetada (O GLOBO online 08/10/2021).

A Figura 1C ilustra acidente de grandes proporções no Golfo do México em 2010 com o vazamento de 4 milhões de barris no mar em decorrência da explosão da plataforma Deepwater Horizon, pertencente à inglesa British Petroleum (BP). Em seguida observamos derramamento de petróleo, em 2000 na Louisiana (EUA) que deixou cerca de 200 aves correndo sério risco de morte, e por último nas Figuras 1E e 1F um dos mais recentes vazamentos no Brasil que atingiu 409 localidades no Nordeste do país. Segundo balanço divulgado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), ao menos 104 municípios de todos os nove Estados do Nordeste foram afetados por fragmentos ou manchas de petróleo cru desde 30 de agosto de 2019. Segundo o Ministério da Saúde, o Nordeste tem 153 municípios litorâneos, o que significa que o óleo chegou em cerca de 67,9% das cidades da costa da região. Balanço do Ibama indica que apenas 166 das 409 localidades atingidas estão "limpas", isto é, sem vestígios ou manchas do petróleo.

### 1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes historicamente conhecidos, sendo relatados primeiramente pelo médico inglês Percivall Pott na segunda metade do século XVIII. Percivall diagnosticou diversos casos de câncer no saco escrotal em pacientes que tinham como única característica em comum a atividade laboral, todos exerciam a profissão de limpadores de chaminé (COGILANO et al., 2010).

Os HPAs são contaminantes orgânicos compostos apenas por carbono e hidrogênio, constituídos de dois ou mais anéis aromáticos fundidos (Tabela 1), de origem natural ou antropogênica, sendo resultante de pirólise de material orgânico e combustão incompleta. São onipresentes no meio ambiente, ocasionando níveis mensuráveis de exposição de fundo na população em geral (COGILANO et al., 2010). Estes compostos apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, sendo considerados dentre a classe de hidrocarbonetos, os mais tóxicos existentes, razão da grande importância dos estudos acerca desta classe de compostos. (SISINNO, 2003).

Apesar do conhecimento da existência de centenas de HPAs diferentes, apenas alguns são considerados importantes para estudos ambientais, a União Européia (LERDA et al., 2011) recomenda o monitoramento de 15 HPAs, a Agência de Proteção Ambiental norte Americana (*Environmental Protection Agency*, EPA) considera um grupo de 16 HPAs como sendo prioritários para estudos ambientais (JRC *European Union* 66955, 2011) e a NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) instituição também norte americana, recomenda 17 HPAs como prioritários, além dos 16 da EPA adiciona-se o benzo(e)pireno. Para este estudo consideramos os recomendados pela EPA, sumarizados na Tabela 1 (WHO, 2011).

A Agência Internacional de Pesquisas para o Câncer (*International Agency of Researchon Cancer*, IARC) estabelece uma classificação quanto a carcinogenicidade dos compostos (Tabela 1). Esta classificação é determinada por diversos estudos revisados e avaliados de possíveis agentes carcinogênicos como os HPAs, em cenário controlado (laboratório) e não controlado, com exposição ao composto ou à mistura complexa de compostos, considerando também o estilo de vida e os fatores biológicos e físicos dos expostos (IARC, 2020).

**Tabela 1.** Estrutura dos 16 HPAs considerados prioritários pela Environmental Protect Agency (EPA) dos Estados Unidos e as respectivas massas molar ( $\text{g mol}^{-1}$ ), número CAS, ponto de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ ), pressão de vapor, solubilidade em água ( $\text{mg mL}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ),  $\text{Log } K_{ow}$ , constante de Henry ( $\text{Pa m}^3\text{mol}^{-1}$  à  $20^{\circ}\text{C}$ ) classificação de carcinogenicidade pela International Agency of Research on Cancer (IARC):

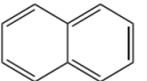
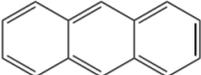
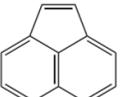
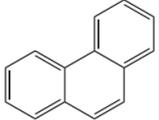
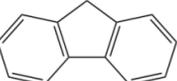
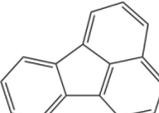
HPA	Abreviação	MM (g/mol)	Número CAS	P.F ( $^{\circ}\text{C}$ )	Pressão De Vapor	Log $K_{ow}$	Solubili dade	Constant e de Henry	Classific ação IARC	Agência	ESTRUTURA QUÍMICA
<b>Naftaleno</b>	Naf	128,171	91-20-3						-	EPA/ NIOSH	
<b>Antraceno</b>	Ant	178,229	120-12-7	216,4	$8,0 \times 10^{-4}$	4,5	0,0436	5,64	3	EPA/ NIOSH	
<b>Acenaftileno</b>	Acef	152,192	208-96-8						-	EPA/ NIOSH	
<b>Acenafteno</b>	Ace	154,208	83-32-9	95	0,29	3,92	3,9	18,5	-	EPA/ NIOSH	
<b>Fenantreno</b>	Fen	178,229	85-01-8	100,5	0,016	4,52	0,977 1,18	4,29	3	EPA/ NIOSH	
<b>Fluoreno</b>	Flu	166,219	86-73-7	115-116	0,08	4,18	1,68	9,81	3	EPA/ NIOSH	
<b>Fluoranteno</b>	Flt	202,251	206-44-0	108,8	0,00123	5,20	0,205 0,26	1,96	3	EPA/ NIOSH	
<b>Pireno</b>	Pir	202,251	129-00-0	150,4	0,00060	5,00	0,130 0,135	1,71	3	EPA/ NIOSH	

Tabela 1. (continuação)

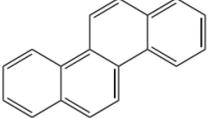
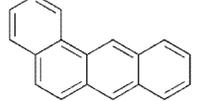
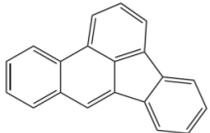
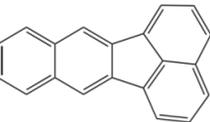
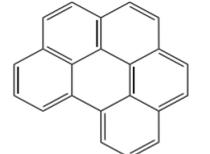
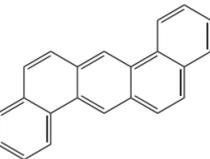
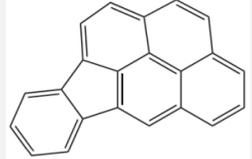
HPA	Abreviação	MM (g/mol)	Número CAS	P.F	Pressão De Vapor	Log K <sub>ow</sub>	Solubili dade	Constant e de Henry	Classific ação IARC	Agência	ESTRUTURA QUÍMICA
<i>Criseno</i>	Cri	228,288	218-01-9	253,8		5,89	0,00179	0,53	2B	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Benzo(a)antraceno</i>	BaA	228,2879	56-55-3	160,7	$2,8 \times 10^{-5}$	5,91	0,0090	1,22	2B	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Benzo(a)pireno</i>	BaP	252,309	59-32-8	178,1		6,35	0,00162 -0,0038	0,034	2A	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Benzo(b) fluoranteno</i>	BbF	252,309	205-99-2	168,3		5,78	0,0015	0,051	2B	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Benzo(k) fluoranteno</i>	BkF	252,309	207-08-9	215,7		6,11	0,0008	0,044	2B	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Benzo(g,h,i) perileno</i>	BghiP	276,331	191-24-2	278,3		6,90	0,00026	0,0027 (20°C)	3	EPA/EU/ NIOSH	
<i>Dibenzo(a,h) antraceno</i>	Dib	278,347	53-70-3	266,6		6,75	0,00050		2A	EPA/EU/ NIOSH	

Tabela 1. (continuação)

HPA	Abreviação	MM (g/mol)	Número CAS	P.F	Pressão De Vapor	Log K <sub>ow</sub>	Solubili dade	Constant e de Henry	Classific ação IARC	Agência	ESTRUTURA QUÍMICA
<i>Indeno (1,2,3-cd)pireno</i>	Ind	276,331	193-39-5	163,6			0,00019	0,029 (20C)	2B	EPA/EU/ NIOSH	

**LEGENDA:**K<sub>ow</sub>: constante de equilíbrio octanol/água

P.F: ponto de fusão

CAS: Chemical Abstract Service

EPA: Environmental Protect Agency

EU: European Union

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

**CLASSIFICAÇÃO IARC:**

- **Grupo 1:** O agente (mistura) é carcinogênico em humanos\*;
- **Grupo 2A:** O agente (mistura) é provável carcinógeno para humanos\*;
- **Grupo 2B:** O agente (mistura) é possível carcinógeno para humanos;
- **Grupo 3:** O agente (mistura) não possui classificação de sua carcinogenicidade em humanos\*;
- **Grupo 4:** O agente (mistura) é provável não carcinógeno em humanos\*.

\*As circunstâncias de exposição implicam nesta carcinogenicidade em humanos

As propriedades físico-químicas das substâncias são importantes ferramentas para o entendimento da dinâmica dos contaminantes no ambiente e nos seres expostos. Ao iniciar os estudos ambientais com o conhecimento das propriedades dos compostos, como constante de equilíbrio octanol-água ( $K_{ow}$ ), pressão de vapor e a constante de Henry, a escolha das matrizes a serem estudadas é mais assertiva para a condução dos estudos de exposição. A baixa solubilidade em água e os altos valores de  $\log K_{ow}$  demonstram maior afinidade por matéria orgânica e não pela fase aquosa, ou seja, se o estudo é conduzido em ambiente aquático, pode-se encontrar HPAs ao analisarmos não somente a água, mas na matéria orgânica e o sedimento que se encontram suspensos na água ou depositados.

A pressão de vapor e a constante de Henry nos indicam a probabilidade de se encontrar estas substâncias na atmosfera, os baixos valores de pressão de vapor nos mostra que os compostos são pouco voláteis, logo, será mais provável encontrá-los investigando o material particulado atmosférico e não a fase vapor.

A relação do tamanho molecular dos HPAs e sua consequência à saúde já é bem estabelecida na literatura. HPAs de menor massa molar são tóxicos para organismos aquáticos, enquanto os de maior massa molar apresentam extrema carcinogenicidade e mutagenicidade (KARLSSON e VIKLANDER, 2008).

Portanto, conhecendo as propriedades físico-químicas podemos aumentar as chances de localizar esses contaminantes nos organismos que habitam o local de estudo ou que percorrem o local para se alimentar, pois teremos uma ideia se houve efetiva exposição a estes contaminantes por via dérmica e/ou alimentar. Assim, é possível definir não somente as amostras ambientais escolhidas, como também os

tipos de organismos expostos e partes destes a serem estudadas para verificar o provável acúmulo e danos causados pela exposição aos HPAs.

Os HPAs prioritários podem ser divididos de acordo com o tamanho, e separados por semelhanças em suas propriedades físico-químicas, fornecendo informações das fases mais prováveis de serem encontrados: fase gasosa ou agregados em material particulado na atmosfera (PEREIRA NETO et al., 2000).

- **BAIXA MASSA MOLAR-** HPAs constituídos de três anéis aromáticos ou menos, com faixa de massa molar  $128-178 \text{ g mol}^{-1}$  são suficientemente voláteis para estarem presentes como compostos gasosos no ambiente. Estão nesta classe as seguintes substâncias: acenaftileno (Acef), acenafteno (Ace), naftaleno (Naf), fluoreno (Flu), fenantreno (Fen) e antraceno (Ant)
- **MÉDIA MASSA MOLAR-** HPAs com massa molar de  $202 \text{ g mol}^{-1}$  podem estar presentes tanto na fase gasosa quanto nas partículas suspensas, sendo estes o fluoranteno (Flt), pireno (Pir), criseno (Cri) e benzo(a)antraceno (BaA).
- **ALTA MASSA MOLAR-** HPAs de baixa volatilidade, sendo classificados como compostos semi voláteis (OLLIVON et al., 1999) encontrados em sua maioria nas partículas. Caracterizados pela massa molar maior de  $228 \text{ g mol}^{-1}$  constituídos de 5 anéis aromáticos ou mais, incluem as seguintes substâncias: benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), Indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind), dibenzo(a,h)antraceno (Dib) e benzo(g,h,i)perileno (BghiP).

### 1.1.1. HPAs e Saúde Humana

Os HPAs são moléculas com grande potencial mutagênico (HAN et al., 2019) e por isso há grande interesse no desenvolvimento de métodos que possam diagnosticar a ocorrência e dinâmica ambiental destes compostos, bem como a exposição do homem e da biota.

A mutagenicidade se refere a capacidade que uma substância ou condição ambiental possuem em induzir ou aumentar a frequência de mutações no organismo. As mutações podem ocorrer espontaneamente, ou podem ser

provocadas por agentes físicos (mutágenos físicos) ou químico (mutágenos químicos) (KARP et al., 2005).

O DNA, material genético dos organismos vivos, contém a informação genética codificada na sequência de suas bases nitrogenadas. Se esta sequência é alterada por mutação, a informação genética é modificada (genotoxicidade), e caso isto ocorra em células germinativas, esta alteração pode ser transmitida de geração para geração. Por outro lado, quando estes agentes atingem o DNA de células somáticas, isto é, as demais células do corpo, ocorre a alteração dos mecanismos celulares normais que controlam a multiplicação celular, podendo originar células cancerosas (PRADO, 2014).

Uma grande variedade de dados científicos endossa à hipótese de que fatores ambientais constituem a maior causa de câncer, conforme explica a teoria da mutação somática. Existem também sólidas evidências experimentais de que as substâncias carcinogênicas ou seus derivados metabólicos são também mutagênicos, este fato fortalece a hipótese de que estes agentes químicos atuam de modo a produzir alteração no DNA, por meio de reações químicas (KARP et al., 2005).

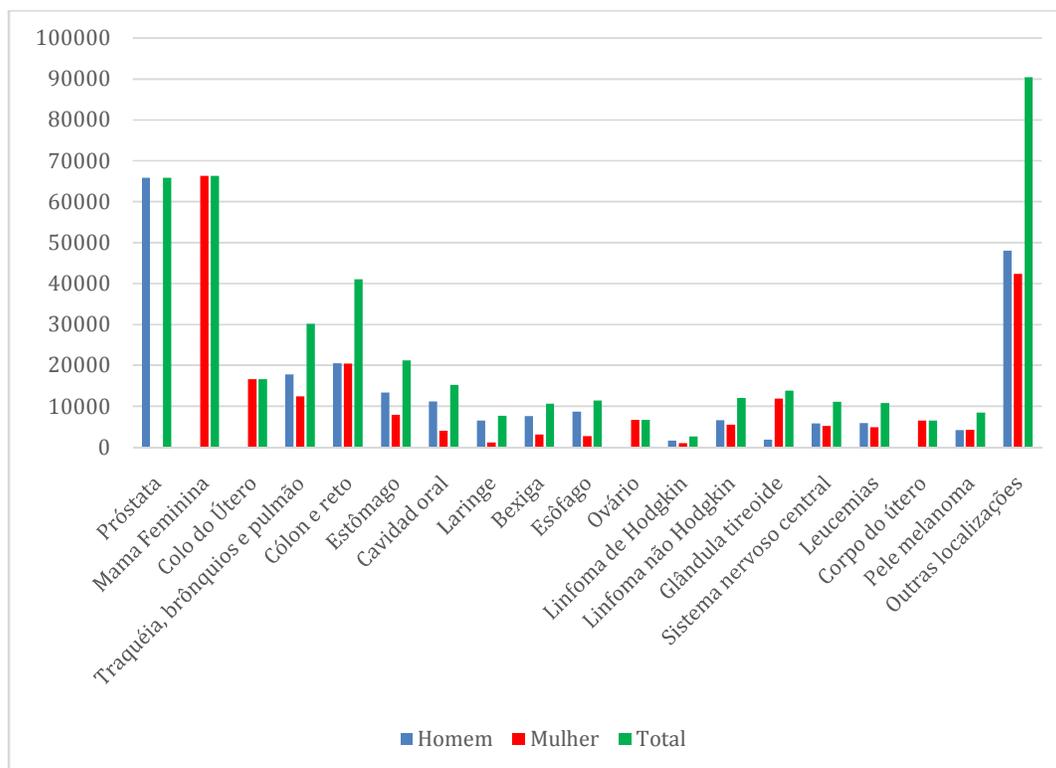
Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença de países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, o cenário foi modificado e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (DA SILVA et al., 2020). Isto se deve principalmente a questões relacionadas a problemas ambientais e falta de recursos.

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um problema evidente de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, pode-se esperar 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas com câncer, diagnosticado ou não. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (DA SILVA et al., 2020).

Para o Brasil as estimativas para o biênio de 2018-2019 (Figura 2) foram de 540 mil novos casos (INCA 2017) e para cada ano do triênio 2020-2022 apontam que

ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, mostrando um aumento de mais de 15% por ano entre as últimas estimativas realizadas pelo INCA (INCA, 2019).

**Figura 2.** Estimativa anual de novos casos de displasia no Brasil para o triênio 2020-2022 para cada 100 mil habitantes.



Fonte: INCA 2019

As exposições aos HPAs e a outros vários contaminantes conhecidos ocorrem de maneira passiva, pois estes estão presentes constantemente no ambiente em que habitamos, no ar que respiramos, na alimentação que consumimos dentre outras exposições mais específicas como as ocupacionais e pontuais.

### 1.1.1.1. Carcinogenicidade

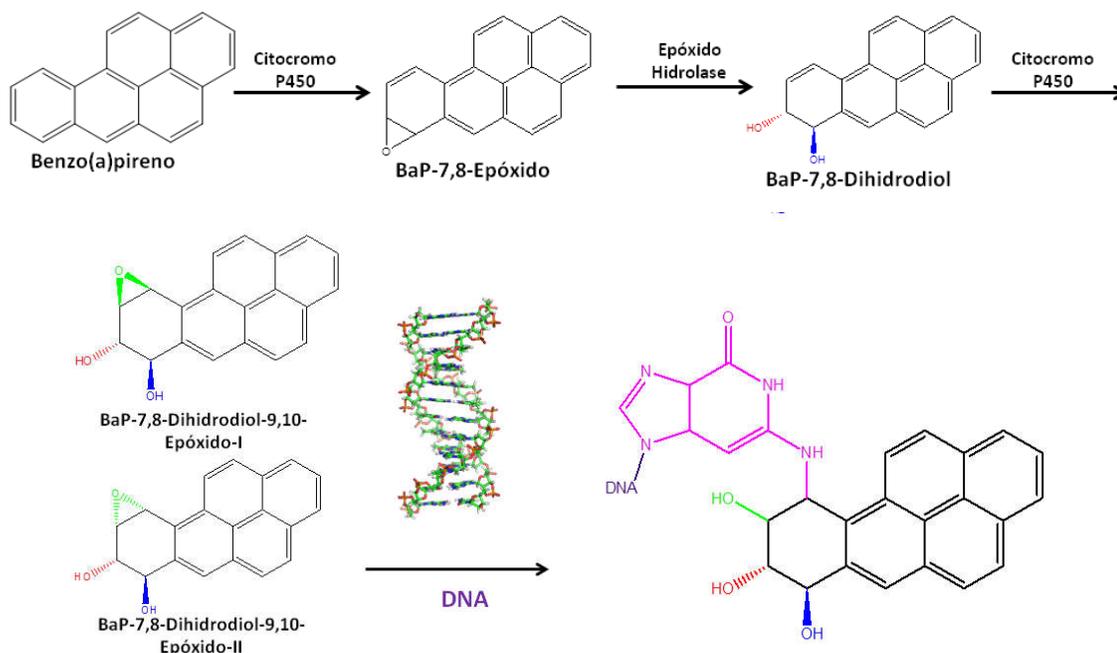
As atividades carcinogênicas de um composto em particular são dependentes de diversos fatores estruturais da molécula como forma, tamanho, fatores estéricos e potencial de ionização. Várias investigações estão sendo efetuadas em sistemas biológicos, tecidos de animais e em sistemas de bioensaios, para decifrar o mecanismo de ação carcinogênica quando expostos a determinada concentração de HPAs (TOMASETING et al., 2020; SERNA et al., 2020).

As características comuns dentre os carcinógenos orgânicos é a reatividade química de um de seus metabólitos quando exposto ao organismo da espécie suscetível, uma fração do composto administrado é convertido em um metabólito reativo o qual pode iniciar o processo carcinogênico. MILLERS e MILLERS apud KATIYAR; AGARWAL; MUKHTAR (1993, p. 11) resumiram pela primeira vez a relação estrutura-atividade indicando que todos os carcinógenos são eletrofílicos no início ou são transformados em um metabólito eletrofílico.

A atividade carcinogênica dos HPAs foi descrita primeiramente por BROOKES e LAWLEY p. 781 (1964 apud KATIYAR, AGARWAL e MUKHTAR, 1993, p. 11):

“Os metabólitos responsáveis pela atividade carcinogênica devem ser também os responsáveis pela ligação covalente com o DNA, uma vez que após o tratamento dérmico com HPA radioativos, em estudos com ratos, estes são encontrados ligados covalentemente ao DNA da pele.”

A maioria dos carcinógenos, especialmente os HPAs, são quimicamente pouco reativos. Para se tornar reativos, os HPAs devem ser ativados metabolicamente pelas enzimas do sistema citocromo P450 no fígado, que são responsáveis pelas reações oxidativas. O metabólito reativo formado é capaz de se ligar ao DNA e a organelas citoplasmáticas; iniciando a resposta carcinogênica final (Figura 3).

**Figura 3.** Mecanismo proposto para a ação mutagênica do benzo(a)pireno

Fonte: a autora.

### 1.1.1.2. Alteração Endócrina

O Sistema Endócrino é constituído por diversas glândulas e tecidos que secretam substâncias responsáveis pelo controle da maioria das funções biológicas. As substâncias secretadas são chamados hormônios e atuam em tecidos alvos ligando-se a receptores específicos.

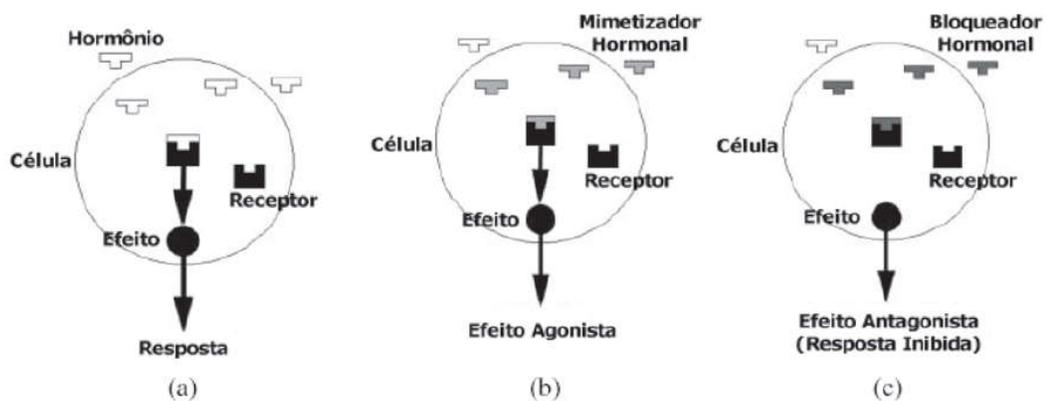
Um alterador endócrino é um agente externo que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios no organismo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento ou comportamento. Podem causar alterações em diferentes níveis atingindo, células, órgãos, indivíduos e até mesmo populações inteiras (JUVANCZ et al., 2008).

Os HPAs como alteradores endócrinos foram primeiramente descritos em modelos animais, e depois em ensaios com células e proteínas (ZHANG et al., 2016).

Algumas publicações sugerem que os HPAs, seus derivados hidroxilados e os nitro HPAs contendo 4 e 5 anéis podem interagir como alteradores endócrinos. Na Figura 4A observamos a ação natural do hormônio, se ligando ao sítio receptor

específico e ativando assim a resposta hormonal, na Figura 4B uma substância atua de forma agonista, se passando pelo hormônio natural, se encaixando no sítio de ligação específico, provocando uma resposta hormonal potencializada e na Figura 4C observamos o efeito antagonista, que causa a diminuição da resposta hormonal, a substância se liga ao sítio de ligação específica o inutilizando, diminuindo a disponibilidade destes receptores, causando a queda da resposta (SANTODONATO, 1997).

**Figura 4.** Disfunções endócrinas: **(a)** resposta natural; **(b)** efeito agonista; **(c)** efeito antagonista.



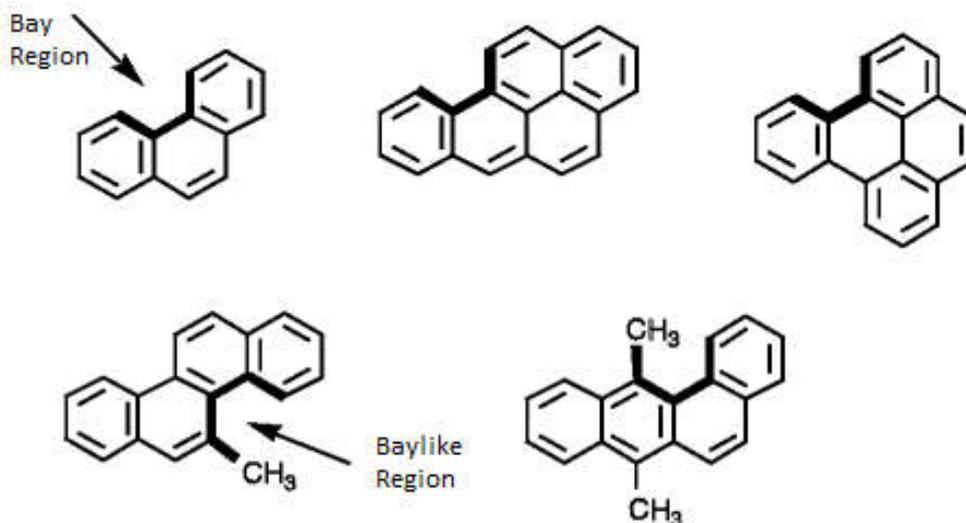
Fonte: GHISELLI e JARDIM, 2007

Estudos de exposições prolongadas ao benzo(a)pireno em células de Leyding (células que quando estimuladas produzem o hormônio testosterona) de ratos mostraram uma diminuição da qualidade do esperma do epidídimo (pequeno ducto que coleta e armazena os espermatozoides produzidos nos testículos) que pode estar associado a redução nos níveis de testosterona (CHUNG et al., 2011; CAMPOS, 2020).

MANSOUR e colaboradores (2020) correlaciona uma baixa saúde reprodutiva de homens que exercem atividades na indústria de coque. Neste estudo vários parâmetros foram investigados em sangue e sêmen para correlacionar com as concentrações encontradas de 1-hidroxipireno em urina. O 1-hidroxipireno é metabólito do pireno que ocorre comumente em abundância e por isso é indicado como biomarcador de exposição aos HPAs (ALEKSEENKO, et al. 2020).

Segundo os estudos de KUBINCOVÁ e colaboradores (2019) os HPAs de baixa massa molar contendo região de baía (bay) ou similar (baylike) Figura 5, causam rápida desregulação na comunicação intercelular em células dos testículos, resultando em disfunção reprodutiva.

**Figura 5.** Estrutura da região de Baía (Bay) e região similar de Baía (Baylike)



Fonte: HENKLER, STOLPMANN e LUCH; 2012

Outras consequências à exposição aos HPAs podem ser citadas como a alteração no mecanismo responsável por guiar a expressão de genes que desempenham papel essencial na regulação da diferenciação celular, alteração no desenvolvimento e metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes (ROSLUND et al., 2019).

### 1.1.2. HPAs e Meio Ambiente

Os HPAs são contaminantes ambientais onipresentes gerados de forma natural e antrópica. São investigados em diversas matrizes e ambientes, como solo de creches e berçários (ROSLUND et al., 2019), de área urbana (HINDERSMANN & ACHTEN, 2018) de plantações (ZHAN et al., 2014), aerossóis atmosférico (MIURA et al., 2019), sedimento de rios (KIM et al., 2018), sedimento marinho e organismo marinho (FRAPICCINA et al., 2018), fitoplâncton (KOTTUPARAMBIL e AGUSTI,

2020), lodo de rios (CHOUERI et al., 2008; WANG et al., 2012; BANIAMAM et al., 2017), dentre outros. Estas investigações tem por objetivo avaliar as fontes pontuais ou a influência de outras fontes já extintas, a relação entre concentração de contaminantes e consequências observadas, ou a constatação de valores de exposição humana permitidos ou não pelas leis ambientais de cada país.

No Brasil, existem o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) órgão consultivo e deliberativo responsável pelas leis de proteção ao meio ambiente e a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), órgão estadual responsável por controlar, fiscalizar, monitorar e licenciar as atividades geradoras de contaminações ambientais.

Em relação as legislações vigentes no Brasil para HPAs em amostras ambientais, existem apenas os dispostos pelas Resoluções CONAMA 420/2009 e 357/2005 que tratam das concentrações de alguns HPAs em solo e águas potável, salobra, subterrânea, doce e salina. A CETESB como órgão responsável pelo monitoramento no Estado de São Paulo forneceu importante documento consultivo para este estudo, reportando em 2001 concentrações de HPAs em diversos locais no litoral de São Paulo, incluindo a Baixada Santista.

A Baixada Santista agrega grande diversidade tanto ambiental quanto de fontes antrópicas geradoras de HPAs. Em sua zona costeira há grande diversidade de ecossistemas que alternam entre mangues, praias, campos de dunas e estuários, além de outros ambientes com significativa riqueza natural, muitos destes localizados dentro de áreas de preservação ambiental como o Parque Estadual Restinga de Bertiooga. Quanto as fontes de contaminação por HPAs podemos citar: combustão de matéria orgânica, combustão de combustível fóssil, cadeia extrativa do petróleo e contaminações provenientes do Porto de Santos.

### **1.1.3. Ocorrência de HPAs no Mangue**

Ao iniciar um estudo ambiental, é importante ter acesso a informações de concentrações reportadas para os analitos de interesse em matrizes e contexto ambiental similar, para que as estratégias ambientais e analíticas escolhidas tenham a confiabilidade requerida.

O ecossistema de mangue é de grande importância, sendo rico em matéria orgânica e biomassa que fornecem alimentação, proteção e condições de reprodução para uma grande variedade de espécies animais locais e da zona costeira que freqüentam esses ecossistemas, fazendo deles verdadeiros berçários e celeiros naturais da biodiversidade marinha. Representam ecossistema-chave, pois estima-se que 70 a 80% das espécies de interesse comercial passam pelo menos uma fase da vida neste ambiente, sendo a sua preservação de suma importância para o bom funcionamento de outros ecossistemas maiores e mais diversos que se estendem além dos limites de um bosque de mangue (SCHAEFFER-NOVELLI, 1999; KATHIRESAN; BINGHAN, 2001).

Reconhecendo a elevada importância ecológica e os benefícios diretos e indiretos desse ecossistema, no Brasil os manguezais são considerados “Áreas de Preservação Permanente” quando forem fixadoras de dunas ou estabilizadoras de mangues conforme o artigo 4º da Lei Federal 16.651 de 2012, “em toda a sua extensão”, também são considerados ecossistemas integrantes do bioma Mata Atlântica protegido pelas Leis 11.428 de 2006 (Lei da Mata Atlântica) e 12.651 de 2012 (Código Florestal). Além destas também existem os tratados internacionais aos quais o Brasil é signatário, que protegem as áreas de mangue por serem parte integrante das zonas úmidas e possuem proteção da sua fauna e flora e de toda a sua biodiversidade: Convenção de Washington (1946), Convenção de Ramsar (1971), Convenção de Bonn (1979) e a Convenção da Diversidade Biológica (1992) (THAMES, 2017).

O CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) possui a resolução 303 de 2002, que estava sendo discutida judicialmente para que ocorra a diminuição da proteção das restingas e dos manguezais.

As concentrações reportadas na literatura para soma de HPAs em amostras ambientais de sedimento de mangue ou marinho possuem valores bastante variados que podem ser observados na Tabela 2. No Brasil, valores unitários de concentração em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foram encontrados na Baía de Todos os Santos (BA) e em oposição na China valores de milhares  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foram observados em estudo de sedimento de mangue em 2014. Estas concentrações geralmente são expressas como o somatório dos HPAs estudados, em sua maioria os 16 considerados prioritários como citado no item 1.1.

**Tabela 2.** Concentrações de  $\Sigma$ HPA encontradas em sedimentos marinho e mangue em amostras provenientes de diferentes regiões.

ANO	Autor	País	$\Sigma$ HPAs	Concentração $\Sigma$ HPAs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Matriz
2018	MACÍAS-ZAMORA, MENDONZA-VEGA e VILLAESCUSA-CELAYA	Brasil	16	7,6-813	Sedimento superficial
2018	EL MADNY	Arábia Saudita	16	105,39	Sedimento superficial
2017	ASSUNÇÃO et al.	Brasil	16	6,8-437,3	Sedimento de mangue
2017	BANIEMAM et al.	Irã	16	17,3- 926,7 14,3-85,8	Sedimento superficial marinho Inverno outono
2017	TIWARI, SAHU e PANDIT	Índia	16	219-1925	Sedimento
2014	CESAR et al.	Brasil	23	0 -576,5	Sedimento
2014	LI et al.	China	16	1649-7925 313-2847 1189-5168	Sedimento mangue Futian Baguang Waterland
2012	WANG et al.	China	16	38,7-136,2	Sedimento mangue
2012	CHENG-DI DONG, CHIH-FENG CHEN e CHIU-WEN CHEN	Tailândia	16	13,196	Sedimento superficial
2009	TORRES et al.	Brasil	16	679,3 479,05	Sedimento (draga) Sedimento (T. Alemoa)
2008	VENTURINI et al.	Brasil	23	8,29 - 4163	Sedimento < 0,63mm
2006	BICEGO et al.	Brasil	23	22,6 - 68130	Sedimento superficial
2005	MARTINS et al.	Brasil	24	44,3 - 494,5	Sedimento
2004	MEDEIROS e BÍCEGO	Brasil	12	79,6 - 6843,6	Sedimento
2004	VENTURINI e TOMMASI	Brasil	13	8 - 4163	Sedimento

#### 1.1.4. HPAs Ratios

De acordo com as concentrações de HPAs individuais e seus isômeros, encontrados no ambiente, pode-se estimar a origem da contaminação por meio dos cálculos de razão de diagnóstico chamados de RATIOS. Já são conhecidos diversas razões diagnóstico aplicadas na literatura, alguns calculando a simples razão e outras aplicando a Equação 1 sendo utilizados HPAs de mesma massa molar (A e B)

$$\text{Equação 1: } \frac{A}{A + B}$$

Quando não se conhece a região estudada a primeira investigação a cerca da origem dos HPAs é a definição da origem petrogênica, pirogênica ou natural, existindo diversas razões utilizadas como fenatreno/antraceno, fluoranteno/pireno e benzo(a)antraceno/criseno (YUNKER et al., 2002). Após esta análise a aplicação de outras razões podem ser usadas para inferir a possível fonte pirogênica, se combustível fóssil ou não benzo(b)fluoranteno/benzo(k)fluoranteno (TOBISZESKI e NAMIESNIK, 2012) e indeno(1,2,3-cd)pireno/benzo(g,h,i)perileno (ZHANG et al., 2005).

Foram observadas na literatura razões de diagnóstico que verificam o aumento de emissões industriais (benzo(a)antraceno/benzo(g,h,i)perileno); diferenciação entre as fontes de tráfego, combustão de carvão, madeira e óleo (benzo(a)pireno/benzo(g,h,i)perileno) (JIANG et al., 2009) dentre outras.

Fontes **petrogênicas** são todos os produtos de origem do petróleo, **pirogênica** é a fonte advinda da combustão em altas temperaturas com a depleção do oxigênio, fontes **naturais** são as maneiras que se formam HPAs na natureza, processos de plantas e fungos por exemplo. As fontes pirogênicas podem ser diferenciadas de acordo com o material utilizado para a combustão, de origem vegetal (madeira, carvão vegetal, vegetação, etc) ou fóssil.

O uso dessas proporções é baseado na estabilidade termodinâmica relativa de alguns isômeros de HPAs. HPAs formados por reações rápidas de condensação serão termodinamicamente menos estáveis do que aqueles formados por processos

mais lentos, como diagênese que é o conjunto de processos químicos e físicos que ocorrem no sedimento, desde a sua deposição até sua consolidação ou catagênese, processo em que com o aumento de pressão a parte insolúvel da matéria orgânica formada a partir dos lipídios, proteínas e carboidratos dos seres vivos (querogênio), se altera, resultando em matéria orgânica fóssil, como petróleo ou carvão, definida como fontes petrogênicas que são enriquecidas com estes isômeros (SANTOS, BREHM et al., 2017; YUNKER et al., 2002). Portanto, essas relações/ratios podem ser empregadas para entender melhor a distribuição dos HPAs e diagnosticar as principais fontes geradoras no ambiente (SOUZA, 2010).

Para este trabalho foram utilizadas algumas destas razões de diagnóstico, conforme descrito a seguir.

#### 1.1.4.1. Diferenciação entre Algumas Fontes Petrogênicas e Pirogênicas

**1- Fenantreno/Antraceno (Fen/Ant):** a relação é dependente apenas da temperatura, fenantreno é o isômero triaromático mais estável e quando sua concentração é muito maior que a concentração do antraceno, a hipótese de possível fonte petrogênica é suportada, podendo ser utilizada relação simples como: **Fen/Ant** >>> 1,0: indica possíveis fontes petrogênicas e **Fen/Ant** < 1,0: indica possíveis fontes pirogênicas.

Há várias interpretações na literatura, para este trabalho utilizamos limites mais abrangentes:

- ✓ **Fen/Ant** < 5 provável origem pirogênica (exceto para a queima de gasolina que apresenta valores entre 5-9);
- ✓ 10 > **Fen/Ant** > 5 fontes mistas;
- ✓ 30 > **Fen/Ant** > 10 fontes mistas (descartando a combustão do diesel, carvão e creosoto);
- ✓ **Fen/Ant** > 30 provável fonte petróleo.

Algumas considerações importantes sobre o fenantreno em relação ao antraceno: quando livres o fenantreno é muito menos fotodegradável do que o antraceno, no solo ele é mais degradável, é protegido por substâncias húmicas qd não está ligado a partículas, não há mudança entre as degradações quando se

estuda sedimentos e a influência da deposição atmosférica. Esta relação é totalmente dependente da matriz em estudo.

**2- Fluoranteno/Pireno (Flt/Pir):** semelhante ao anterior, esta razão é correlacionada com a temperatura de formação, termodinamicamente o fluoranteno é menos estável que o pireno:

- ✓ **Flt/Pir**  $\leq 0,5$  indica provável fonte petrogênica, porém a combustão de diesel e outros lubrificantes também apresentam essa razão;
- ✓  $0,5 < \mathbf{Flt/Pir} < 1,0$  fontes mistas, porém emissão de automóveis também resulta neste intervalo;
- ✓ **Flt/Pir**  $> 1,0$  fontes pirogênicas como combustão de carvão ou biomassa são provavelmente dominantes.
- ✓ **Flt/Pir**  $> 1,2$  é utilizado como limite máximo para fontes petrogênicas.

**3- Benzo(a)antraceno/Criseno (BaA/Cri):** o benzo(a)antraceno é preferencialmente formado durante a combustão de biomassa e combustível fóssil, quando comparado ao criseno.

- ✓ **BaA/Cri**  $< 0,25$  fontes petrogênicas
- ✓  $0,25 < \mathbf{BaA/Cri} \leq 0,5$  fontes mistas
- ✓ **BaA/Cri**  $\geq 0,50$  fontes pirogênicas

#### 1.1.4.2. Diferenciação entre algumas fontes pirogênicas:

**1- Benzo(b)fluoranteno/Benzo(k)fluoranteno (BbF/BkF):** a relação é utilizada em amostras de solo e sedimentos urbanos, sendo minimamente influenciada sob condições aeróbicas de degradação e evaporação, é limitada a aplicação de diferentes tipos de creosoto.

- ✓ **BbF/BkF** = 0,9 madeira e fuligem
- ✓ **BbF/BkF** = 1,2 creosoto
- ✓ **BbF/BkF** = 1,3 emissões veiculares
- ✓  $2,5 \leq \mathbf{BbF/BkF} \leq 2,9$  derretimento de alumínio
- ✓ **BbF/BkF** = 3,7 forno de coque

**2- Indeno(1,2,3-cd)pireno/Benzo(g,h,i)perileno (Ind/BghiP):** a relação é utilizada para distinguir diferentes fontes pirolíticas especificamente as emissões veiculares em sedimentos contaminados (ZHANG et al., 2005; VAN DROOGE et al., 2012)

- ✓ **Ind/BghiP** < 0,25 forte influência petrogênica
- ✓ **0,25 < Ind/BghiP < 1,0** possível fontes mistas, a maioria das fontes pirogênicas se encontram neste intervalo, exceto alguns lubrificantes, combustão de gasolina e de diesel.
- ✓ **Ind/BghiP > 1,0** combustível petrogênico, se certas fontes petrogênicas forem descartadas (asfalto, partículas de pneu e carvão).

**3- Pireno/Benzo(a)pireno(Pir/BaP):** esta razão pode indicar a contribuição de fluxos terrigênicos negligenciados no sistema aquático, pode ser usado para discriminar combustão de madeira da combustão de carvão, mas não para diferenciar as fontes de combustão de espécies de diferentes de madeira.

- ✓ **Pir/BaP** ~ 0,7 queima de madeira
- ✓ **Pir/BaP** ~ 1,0 queima de gasolina
- ✓ **Pir/BaP** ~ 10 diesel
- ✓ **Pir/BaP** > 10 fontes petrogênicas

Existem também algumas razões de diagnóstico que utilizam a somatória dos HPAs separados em grupos de baixa massa molar (L) e alta massa molar (H):

**Equação 2:**

$$\frac{L}{H} = \frac{\sum \text{Fen} + \text{Ant} + \text{Pir} + \text{Flt}}{\sum \text{BaA} + \text{Cri} + \text{BkF} + \text{BaP} + \text{Ind} + \text{Dib} + \text{BghiP}}$$

**L/H > 1 FONTE PETROGÊNICO    L/H < 1 FONTE PIROGÊNICA**

**Equação 3:**

$$\frac{L_{HPA}}{H_{HPA}} = \frac{\sum \text{Naf} + \text{Ace} + \text{Act} + \text{Fen} + \text{Ant}}{\sum \text{Flt} + \text{Pi} + \text{Cri} + \text{BaA} + \text{BbF} + \text{BkF} + \text{BaP} + \text{Ind} + \text{Dib} + \text{BghiP}}$$

**L<sub>HPA</sub>/H<sub>HPA</sub> ≥ 2,3 FONTE PETROGÊNICO    L<sub>HPA</sub>/H<sub>HPA</sub> ≤ 0,4 FONTE PIROGÊNICA**

Na Tabela 3 estão apresentados alguns dos valores para relações de diagnósticos encontrados na literatura, segundo a Equação 1 (pag.46), são apresentadas também as fontes correspondentes atribuídas.

**Tabela 3.** Relações de diagnóstico (RATIOS, eq.1 , pg 19) para HPAs, encontradas na literatura

REFERÊNCIA	A	B	RATIOS (Eq.1)	FONTES ATRIBUÍDAS
<b>SANTOS et al., 2016</b> <b>PIES et al., 2008</b>	Antraceno	Fenantreno	<0,1	Petrogênica
			>0,1	Pirogênica
<b>VILLAR-VIDAL, 2014</b>	Indeno(1,2,3-cd)pireno	Benzo(ghi)perileno	<0,2	Petrogênica
			0,2-0,5	Combustão de combustível fóssil
<b>DE LA TORRE et al., 2009</b>	Fluoranteno	Pireno	>0,5	Combustão de lenha, carvão, etc
			<0,4	Petrogênica
			0,4-0,5	Combustível fóssil
<b>RAVINDRA et al., 2008</b>	Fluoreno	Pireno	>0,5	Combustão de madeira e gramíneas
			>0,5	Emissão diesel
<b>YUKER et al., 2002</b>	Benzo(a)antraceno	Criseno	>0,5	Emissão de petróleo
			<0,2	Petrogênica
			>0,35	Combustão de petróleo
			>0,5	Combustão de plantas, madeira e petróleo

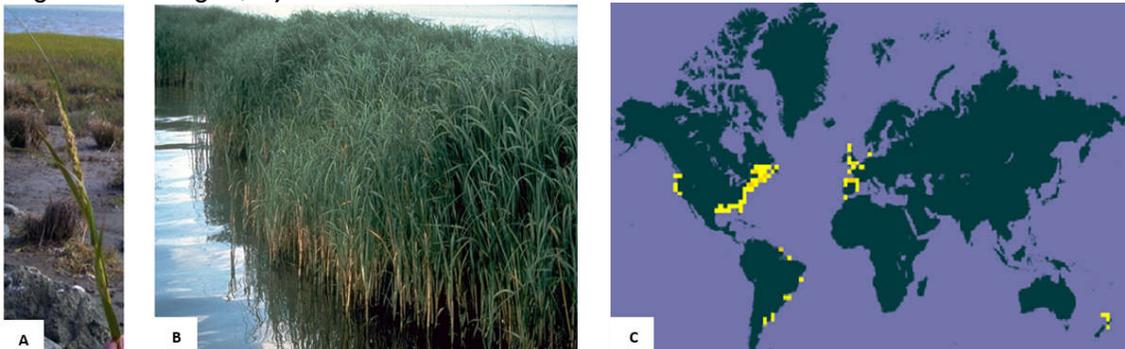
Os RATIOS têm sido utilizados no diagnóstico da fonte emissora de HPAs em diferentes matrizes ambientais como água, sedimento, solo, folhas, caule, pinhas de coníferas e mexilhões (TOBISZEWSKI & NAMIESNIK, 2012).

## 1.2. *Spartina alterniflora*

O gênero *Spartina* é formado por 16 espécies de gramíneas perenes que estão largamente distribuídas, sendo nativas de toda a costa do Oceano Atlântico, ocorrendo principalmente nas Américas do Norte e Sul, é uma gramínea adaptada a estuários, ocorrendo na região de entre marés, onde existe variação de salinidade e períodos de exposição e inundação. Dentre as representantes do gênero, *Spartina alterniflora* (Figura 6A e 6B) é a mais característica de manguezais, não se restringindo à região de marisma (KLEIN et al., 1981 apud AMÉRICO 2010).

A espécie ocupa as zonas mais baixas de estuários em diversas regiões costeiras ao longo do continente americano (COSTA & DAVY, 1992) Figura 6C. Vegetação típica de marismas da região sul do Brasil, a *S. alterniflora* apresenta-se como espécie dominante das porções frequentemente alagadas.

**Figura 6.** **A)** Floração de *Spartina alterniflora*; **B)** Predominância da espécie em região alagada de mangue; **C)** Ocorrência mundial.



A

B

C

Fonte: google imagem 2017

Fonte: Global Biodiversity Information Facility 2017

A *Spartina alterniflora* foi escolhida para este estudo por ser uma espécie invasora, resistente, abundante e pelos inúmeros relatos na literatura de seu potencial de biorremediação de solos e sedimentos contaminados, como nos estudos envolvendo evento de derramamento de petróleo com os objetivos de: avaliar sua capacidade de recolonização após o evento (LINDAU et al., 1999; PEZESHKI, 2000; LIN et al., 2002), investigar o acúmulo de metais em seus tecidos e seus efeitos (LACERDA, 1997; VIANA, 1999, YANG, DING e YUAN, 2020; CAI et al., 2020) e seu uso em projetos de fitorremediação observando as respostas desta espécie aos contaminantes (PEZESHKI, 2000; MENDELSSOHN & LIN, 2003; XIE et al., 2020).

A quantificação de HPAs em amostras provenientes de regiões estuarinas (sedimento, água e *Spartina alterniflora*) pode indicar o nível de contaminação do local, em relação a estes contaminantes, bem como auxiliar na identificação de possíveis fontes desta contaminação por meio dos cálculos de razão de diagnóstico. Além disso, os dados podem apontar para o possível potencial de *Spartina alterniflora* na biorremediação de mangues impactados por HPAs.

### 1.3. HISTÓRICO DA BAIXADA SANTISTA COM RELAÇÃO À EXPOSIÇÃO AOS HPAS

Utilizou-se mapas da CETESB (2001), para o reconhecimento do histórico e as possíveis fontes de HPAs na região em estudo, sendo de grande importância a localização das instalações industriais (**Anexo A**), dos locais de disposição de descarte industrial (**Anexo B**), fontes de poluição associados a falta de saneamento básico (**Anexo C**) e principalmente as concentrações de alguns HPAs relatados pela CETESB (**Anexos D1 a D12**). Além disso, foram investigados outros possíveis locais afetados por eventos de natureza antrópica, ocorrido nos últimos anos antes da coleta de amostras na Baixada Santista. Os acontecimentos que foram considerados de relevância para o estudo estão relatados a seguir.

#### 1.3.1 ANO DE 2010: EXPLORAÇÃO EM ESCALA COMERCIAL DO PRÉ-SAL.

O pré sal foi descoberto no final de 2007, e compreende uma extensa reserva de petróleo e gás natural abaixo de uma camada de sal, deste fato deriva o nome. Localizado em grandes profundidades oceânicas que se estende por 800 km entre os litorais do Espírito Santo e de Santa Catarina (Figura 7) formando as Bacias de Santos que abrange os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e uma parte do Rio de Janeiro, e a Bacia de Campos que abrange parte do Rio de Janeiro e Espírito Santo.

**Figura 7.** Localização da faixa do pré sal em azul mais escuro e divisão das Bacias de Campos e de Santos.



Fonte: google imagem 2021

A capacidade produtiva do pré-sal está em constante evolução, nos anos de 2010, 2014, 2016 e 2018 a produção respectiva foi de 41mil, 500 mil, 1 milhão e 1,5 milhões de barris de petróleo por dia, em 2018 haviam 77 poços de extração em atividade. No ano de 2020, nos meses de julho e agosto, a produção no pré-sal registrou novos recordes consecutivos de 2,18 e 2,20 milhões de barris por dia, extraídos de 117 poços em atividade, correspondendo a 70,7% da produção nacional (BRASIL, 2020).

Devido a localização que pode atingir 300 km da costa, profundidade de até 5000 metros de coluna d'água e acréscimo da camada de sal, a extensa faixa e a rápida evolução na capacidade extrativa do pré-sal, o impacto ambiental proveniente desta atividade é bastante preocupante. No intuito de amenizar tais preocupações a Petrobrás encomendou um Relatório de Impacto Ambiental (RIMA), efetuado pela Mineral Engenharia e Meio Ambiente (VIGLIO, DI GIULIO e FERREIRA, 2017).

O relatório de outubro de 2017 (Atividade de produção e escoamento de petróleo e gás natural do polopré-sal da Bacia de Santos – ETAPA 3), que trata das

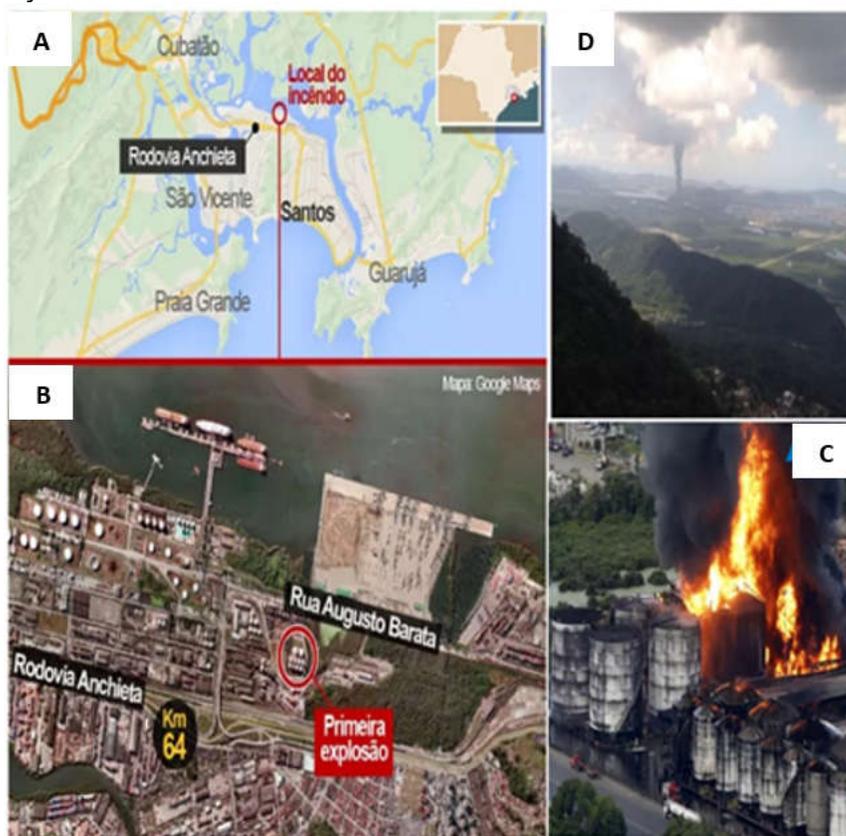
atividades de produção e escoamento de petróleo e gás natural do polo pré-sal da Bacia de Santos, determina que em caso de vazamento de óleo na Bacia de Santos será acionado imediatamente o Plano de Emergência para Vazamento de Óleo da Área Geográfica da Bacia de Santos (PEVO-BS), com disponibilização de recursos materiais e humanos em tempo hábil, pois o tempo de chegada dos recursos é menor do que o tempo de toque na costa.

O estudo abrange as consequências sócio econômicas e ambientais imediatas sem levar em conta o acúmulo de contaminantes nos compartimentos ambientais atingidos e consequências aos organismos e subseqüentes gerações, não diminuindo as preocupações em relação a influência da cadeia extrativa do petróleo no meio ambiente.

### **1.3.2 ANO DE 2015: INCÊNDIO ALEMOA**

O incêndio em tanques de armazenamento da empresa COSIPA, situado no bairro da Alemoa, localizado em São Vicente (SP) (Figura 8A e 8B) durou cerca de 9 dias, causando prejuízos ambientais à curto e longo prazo. Como prejuízos imediatos foram observados: o aumento da temperatura das águas em torno do local, ocasionando a morte de milhares de peixes (LYRA, 2015) e a alta taxa de problemas respiratórios da população próxima, por consequência da espessa nuvem negra (Figura 8C e 8D) que permaneceu por vários dias no local do incêndio (SALLES, 2015).

**Figura 8.**Incêndios que atingiram a região de São Vicente **A)** localização do bairro da Alemoa; **B)** localização dos terminais de armazenamento líquido que explodiram; **C)** foto do evento; **D)** fumaça vista da rodovia.



Fonte:google imagens 2017

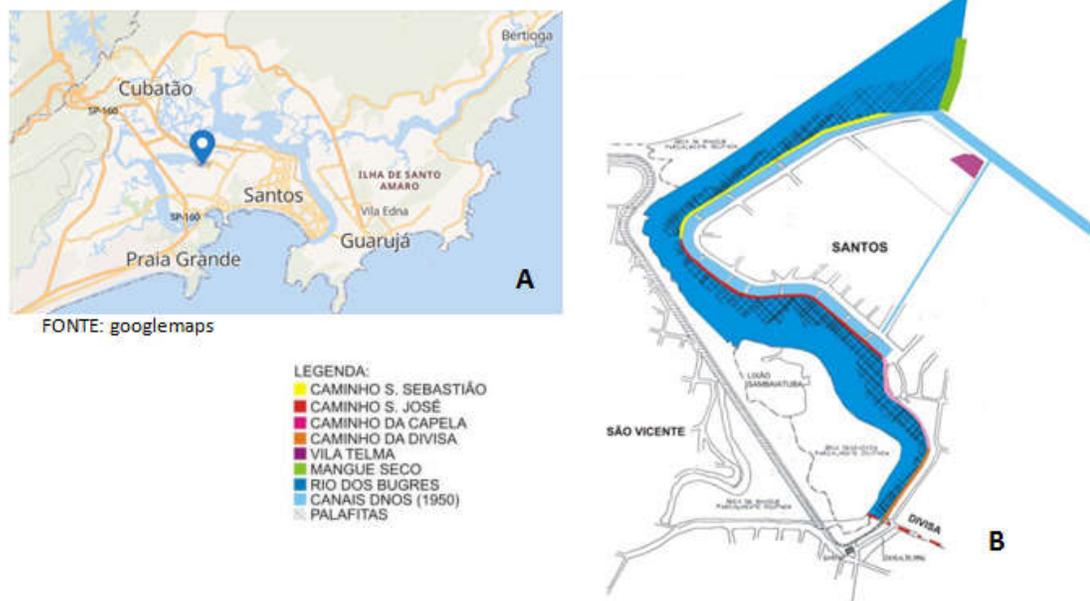
A grande quantidade de material utilizado para combater o incêndio LFE (líquido formador de espuma) ou LGE (líquido gerador de espuma), somada ao combustível queimado por dias ocasionou uma grande descarga de substâncias químicas no meio ambiente, atingindo rios e estuários próximos, causando possíveis danos aos compartimentos atingidos e à biota local. De acordo com informações do corpo de bombeiros cerca de 300 mil litros de LFE/LGE foram utilizados para combater o incêndio na Alemoa (MONTONE et al., 2018). Segundo pesquisas os AFFF (aqueous film forming foam), em português espumas formadoras de filme aquoso, um tipo de LFE/LGE em altas concentrações são tóxicos para as plantas e altera o perfil microbiano dos solos contaminados modificando o equilíbrio existente no ambiente (MONTAGNOLLI e BIDOIA, 2015).

### 1.3.3 ANO DE 2017: INCÊNDIO NA COMUNIDADE DE PALAFITAS DENOMINADA CAMINHO DE SÃO SEBASTIÃO.

A região de Santos possui o que já foi conhecido como o maior complexo de favelas sobre palafitas do Brasil, este complexo é chamado de DIQUE DA GILDA e é composto por seis subáreas: Mangue Seco (homenagem a novela Tiêta do Agreste), Vila Telma (homenagem a ex-prefeita Telma de Souza), Caminho de São Sebastião (homenagem a um famoso morador benzedeiro), Caminho São José (homenagem a 43 moradores homônimos), Caminho da Capela (existência de um marco religioso) e Caminho da Gilda (último aglomerado que se estende até a divisa de São Vicente).

O incêndio de 2017 ocorreu no Caminho de São Sebastião (amarelo Figura 9B), um dos maiores aglomerados que compõe o DIQUE DA GILDA, localizado mais ao norte da cidade de Santos (Figura 9 A).

**Figura 9.** Localização do Dique da Gilda **(A)** organização do Dique da Gilda, localização do Caminho de São Sebastião em amarelo **(B)**



O incêndio atingiu o Caminho de São Sebastião (Figura 10B) destruindo cerca de 200 moradias de palafita (Figura 10D), os bombeiros demoraram 2 horas e meia para que o fogo fosse extinto. Como podemos observar na Figura 10A, a região onde se encontra a comunidade de palafitas já possui perfil de mangue fortemente impactado pelo aumento populacional desordenado às margens do Rio dos Bugres (Figura 10A) onde não há saneamento básico, ocasionando o acúmulo de lixo e esgoto descartados sem controle (Figura 10C) próximo ao rio segundo informações da AGÊNCIA BRASIL (2017).

**Figura 10.** Caminho de São Sebastião: **A)** foto de parte do conjunto de construções irregulares de palafita; **B)** foto do evento; **C)** foto da degradação ambiental próximo à estas construções; **D)** fotos após o evento.



Fonte: google imagenn 2017

Por decorrência destes e outros eventos na região escolhida para o estudo, a literatura apresenta valores diversificados de somatório dos HPAs em amostras ambientais, podendo ser atribuídos aos diferentes locais de amostragem de cada estudo, refletindo a diversidade das fontes destes compostos nesta região. Observamos na Tabela 4 valores que variam de 0,100 a 733 mil  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . O menor

valor encontrado de somatória de HPAs foi observado entre a Baía de Santos e o início do Estuário de Santos, sob a influência da movimentação das correntes marítimas que podem transportar os contaminantes para outros locais. A maior concentração foi relatada pela CETESB em amostras do Canal da Cosipa que pela denominação geográfica compreende o limite físico de um rio, lamaçal ou estreito de oceano, não estando a influência de grande movimentação para transporte de contaminantes, podendo ser considerado um local de armazenamento contínuo.

**Tabela 4.** Valores de  $\Sigma$ HPAs na Baixada Santista, informadas em estudos na literatura

ANO	AUTORES	LOCAL	$\Sigma$ HPA $\mu\text{g kg}^{-1}$	TIPO DE AMOSTRA
2018	PERINA et al.	Estuário Santos-São Vicente	0,025-6,84	Sedimento superficial
2009	TORRES et al.	Porto de Santos	27,8-679,3	Sedimento dragado
2009	CHOUERI et al.	Santos e São Vicente	$2-42 \times 10^3$	Sedimento
2007	CESAR et al.	Estuário de Santos e São Vicente	0,11-0,95	Sedimento
2006	BICEGO et al.	Estuário de Santos e São Vicente	$22,6-6,8 \times 10^3$	Sedimento
2006	CESAR et al.	Estuário Santos-São Vicente	0,50-576	Sedimento
2004	MEDEIROS E BÍCEGO	Estuário de Santos	$79 \sim 15 \times 10^3$	Sedimento
2001	NISHIGUIMA, WEBER e BÍCEGO	Santos	$80-42 \times 10^3$	Sedimento
2001	CETESB	Canal da Cosipa	$109 \times 10^3 \sim 734 \times 10^3$	Sedimento mangue
		Canal de Bertioga	$2,9 \times 10^3 \sim 5,9 \times 10^3$	Sedimento mangue

#### 1.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS HPAS.

Diferentes métodos de extração de HPAs são observados na literatura em matrizes de interesse ambiental, como pode ser visto na Tabela 5, na qual foram incluídos trabalhos que abordam a extração de HPAs em amostras sólidas, semelhantes aos deste estudo, incluindo de 12 a 23 HPAs.

**Tabela 5.** Algumas técnicas de extração e quantificação de HPAs em amostras ambientais.

ANO	AUTOR	PAÍS	MATRIZ	TÉCNICA DE EXTRAÇÃO	TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO	HPAs
2018	EL MARADNY	Arábia Saudita	Sedimento Raízes Folhas	Soxhlet	GC-MS	16
2017	MONTANO et al	Brasil	Sedimento	Soxhlet		12
2017	MAHUGIJA, AHMED e MAKAME	Tanzânia	Sedimento	Ultrassom	GC-MS	
2015	AICHNER et al.	Alemanha	Solo	ASE	GC-MS	16
2015	AL DABBAS, ALLI e AFAJ	Iraque	Folhas de Eucalyptus Solo	-	HPLC-FLU e GC-MS	16
2015	HE et al.	Tibet	Solo	Soxhlet	GC-MS	15
2015	LI et al.	China	Sedimento superficial (mangue) Pântano Raíz Plantas	ASE	GC-MS	16

Tabela 5. (continuação)

ANO	AUTOR	PAÍS	MATRIZ	TÉCNICA DE EXTRAÇÃO	TECNICA DEQUANTIFICAÇÃO	HPAs
2015	ALBANESE et al.	Itália	Folhas de <i>Q. ilex</i> Solo	Ultrassom	GC-MS	14
2015	OBRIST,ZIELLINSKA e PERLINGER	EUA	Solo	ASE	GC-MS	23
2015	SUKHDHANE et al.	Índia	Sedimento <b>mangue</b>	Soxhlet	GC-FID	16
2015	WANG et al.	China	Solo urbano Solo suburbano Solo rural	Soxhlet	GC-MS	16
2012	WANG et al.	China	Folhas, caule e raiz de Phragmites Folhas, caule e raiz de <i>Spartina alterniflora</i> Folhas, sementes e rizoma de Scirpus	ASE	GC-MS	16
2011	FUJITA	Brasil	Solo superficial	Dispersão em fase sólida	HPLC-FLU	16

**LEGENDA:**

GC-MS: gas chromatograph-mass spectrometry GC-FID: gas chromatograph-detector flame ionization

ASE: accelerated solvent extraction HPLC: High performance liquid chromatograph

Considerando-se os trabalhos compilados na Tabela 5, a técnica de extração por solventes (Soxhlet e ASE) aparece com maior frequência, a extração por Soxhlet, apesar de consumir mais tempo e volume de solventes do que outras técnicas, ainda é utilizada, por ser a técnica preconizada pela EPA (U.S. EPA SW-846 *Method 3545A: PAH Extraction from Soil, Sludge, and Marine Sediment*). A extração acelerada por solventes (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*) é a mais empregada dentre as técnicas modernas de extração, pela possibilidade de adaptação da técnica descrita pela EPA em um dispositivo utilizando menor volume de solvente orgânico que suporte altas pressões, o problema desta técnica é a quantidade de compostos que são extraídos, gerando interferentes na separação e quantificação dos compostos de interesse.

A extração por solventes em banho de ultrassom e a dispersão de matriz em fase sólida, são técnicas de extração que também são empregadas na extração de HPAs em sedimento. Das técnicas de extração descritas é a técnica de maior acessibilidade, por não apresentar utilização de equipamentos sofisticados e específicos e foram aplicadas a este trabalho.

Ainda segundo o levantamento bibliográfico da Tabela 5 o detector mais utilizado para análises de HPAs separados por cromatografia gasosa é o espectrômetro de massas, que na verdade é um analisador dividido em 3 etapas, ionização, análise e detecção. Primeiramente o composto é separado no cromatógrafo, passa por uma fonte de ionização e ocorre o processo de ionização, este íon formado passa pelo analisador e espectros de massa (com os valores de  $m/z$  em função da sua abundância) serão gerados, os íons são ejetados em ordem crescente de sua relação massa/carga. Esse movimento gera uma corrente iônica que é multiplicada e produz um sinal proporcional ao número de íons da amostra que são detectados.

A identificação dos compostos é feita pela combinação única de átomos que as moléculas possuem e como cada tipo de átomo e seus isótopos existem em uma única razão na natureza, a razão entre a intensidade do íon molecular e as intensidades dos picos isotópicos fornecem informações sobre o número de cada tipo de átomo presente na molécula (AMARAL, OLIVEIRA e BUSTILLOS, 2011).

Muitos sistemas dispõem de um banco de dados (biblioteca), esta biblioteca permite a identificação da estrutura pela comparação entre os espectros da substância estudada e os da base de dados, gerando uma probabilidade de

confirmação da identidade do composto (NASCIMENTO et al., 2019). Apesar de todas as vantagens apresentadas pela cromatografia gasosa a cromatografia líquido com detecção de fluorescência (HPLC-FLU) continua a ser empregada, pela grande detectabilidade, baixo custo (quando comparado aos custos de manutenção de GC-MS) e alta seletividade. O que torna esta técnica seletiva e específica é a possibilidade de trabalhar com comprimentos de ondas específicos de excitação e emissão, podendo selecionar os melhores comprimentos de absorção e emissão do analito de interesse e assim excluir ou atenuar o sinal de demais interferentes da amostra. A sensibilidade da técnica advém da posição dos detectores, a fonte de luz é geralmente colocada a 90° em relação ao feixe de luz incidente para minimizar o risco de luz incidente transmitida ou refletida atingir o detector. A espécie necessariamente precisa ser um fluoróforo, ou seja, a espécie química deve ter a capacidade de absorver energia e liberar radiação eletromagnética para ocorrer o fenômeno da fluorescência (LAKOWICZ, 2010).

Este detector consiste em uma lâmpada, seguida por um filtro ou uma rede de difração. A luz gerada incidirá sobre a amostra causando a excitação da mesma. Ao retornar ao estado fundamental, o composto emite um feixe de luz que é dirigido a um filtro ou monocromador, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir no fotodetector.

### 1.5. TESTES BIOLÓGICOS:

O conhecimento da toxicidade tem como objetivo ampliar o entendimento do impacto da exposição aos contaminantes presentes em matrizes ambientais, não somente na flora como na fauna dos pequenos organismos que ali vivem e se expõem continuamente. Estes estudos são chamados de estudos toxicológicos ou ecotoxicológicos.

A toxicidade, segundo RODRIGUES (2005), é uma propriedade inerente a agentes tóxicos ou não, na qual reflete o potencial em causar efeitos danosos a diferentes organismos sob condições específicas de exposição, além de ser uma propriedade, a qual deve ser levada em consideração quando se estuda contaminantes ambientais, pois o impacto causado não dependerá somente das quantidades e sim da característica individual danosa ou não aos seres vivos.

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas (naturais ou sintéticas) nos ecossistemas e a sua ação nos organismos (WISEMAN et al., 2001). A avaliação da toxicidade das substâncias presentes em matrizes ambientais pode ser medida por meio de ensaios de fitotoxicidade, que é a ação tóxica ou reação adversa que uma substância presente no meio provoca nas plantas, a qual pode ser determinada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda (LABRE et al., 2008). Os testes de toxicidade em organismo são efetuados expondo os organismos em seu meio natural com adição do contaminante em estudo, seja água, sedimentos ou solo e avaliando assim os efeitos da contaminação na sobrevivência, crescimento, reprodução, comportamento e/ou outros atributos que possam ser monitorados.

#### 1.5.1. TESTE DE FITOTOXICIDADE

O teste de fitotoxicidade é um critério para avaliar os níveis de toxidez, a germinação de plantas e o comprimento da raiz têm sido bastante utilizado na determinação da toxicidade de resíduos por ser uma técnica simples, rápida, segura e reproduzível para avaliar os danos causados pelas combinações tóxicas presentes nesses materiais (KOMILIS; TZIOUVARAS, 2009).

Os testes que utilizam plantas superiores são considerados eficientes para a avaliação e monitoramento da toxicidade de poluentes e têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade em águas e sedimentos contaminados (FERNANDES et al., 2007; CZERNIAWSKA-KUSZA & KUSZA, 2011). Sua principal vantagem é a ampla variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, alongamento de raízes e aspectos bioquímicos, além de apresentar baixo custo e possibilidade de serem realizados continuamente (ŽALTAUSKAITE & ČYPAITE, 2008).

As sementes de *Lactuca sativa* têm sido bastante utilizadas e fornecem diversas vantagens sobre outros organismos testes, principalmente devido ao baixo custo e fácil cultivo (KOMILIS; TZIOUVARAS, 2009), está entre os organismos-teste mais utilizados para avaliar a fitotoxicidade e a citogenotoxicidade de efluentes domésticos e industriais (ŽALTAUSKAITE&ČYPAITE, 2008; ANDRADE et al., 2010) sendo esta espécie recomendada por agências internacionais para tal finalidade.

A necessidade de testes rápidos e sensíveis para o diagnóstico da qualidade de água e solos reflete-se no mundo todo. Bioindicadores têm sido aplicados em ensaios eficazes de toxicidade aguda, complementando os parâmetros físico-químicos de efluentes ou lixiviados. Salienta-se que o ensaio com semente de alface pode ser utilizado para amostras contaminadas com alguma substância ou mistura complexa líquida ou de sólidos solubilizados em solução aquosa.

### **1.5.2. TESTES EM ORGANISMOS**

No Brasil os ensaios com organismos aquáticos são solicitados pela CETESB em diversas ocasiões, como processos de licenciamento, para caracterização e acompanhamento de impactos de novos empreendimentos, na avaliação de risco em áreas contaminadas, no controle de efluentes, em autorizações para uso de produtos em corpos hídricos e avaliações de acidentes ambientais (CETESB, 2017). Esses testes auxiliam mostrando se as concentrações de contaminantes em um determinado local são altas o suficiente para causar efeitos adversos nestes organismos (EPA, 1994).

Existem na literatura e na legislação brasileira organismos testes considerados modelos para cada tipo de análise de acordo com o ambiente onde será efetuada a coleta de material e o propósito das análises. A primeira característica importante a ser avaliada sobre o organismo teste é a sua disponibilidade durante o ano, não sofrer com a sazonalidade, podendo ser obtido a partir de fontes internas ou comerciais para atender ao monitoramento.

Segundo a resolução 454 do CONAMA a caracterização ecotoxicológica deve ser realizada, quando couber, em complementação à caracterização química, com a finalidade de avaliar os impactos potenciais à vida aquática.

Nas amostras de sedimento de mangue os ensaios ecotoxicológicos devem ser realizados com amostras de sedimento integral e preferencialmente para organismos do grupo dos anfípodos (CONAMA, 2012).

Para a verificação de efeitos tóxicos em amostras ambientais como água bruta, sedimento, efluentes ou de produtos, são aplicados ensaios ecotoxicológicos as amostras em estudo. A CETESB indica métodos normatizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), no entanto, caso necessário, a CETESB

pode solicitar estudos complementares, na inexistência de uma publicação do órgão, serão indicados métodos cientificamente reconhecidos como os publicados pela *International Standardization Organization* (ISO), *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) dentre outras.

Para EPA são considerados os seguintes organismos para teste em amostras de estuários e marinhos (EPA, 1994)

1. *Mysidopsis bahia* (para águas marinhas e estuarina)
2. *Cyprinodon variegatus* (para águas marinhas e estuarianas)
3. Ordem dos *Amphipodas* (para sedimento marinho): *Rhepoxynius abronius*, *Eohaustorius estuarius*, *Ampelisca abdita*, *Grandidier Ila japonica*.

A publicação da ABNT de 2015 (ANT NBR 15638) que aborda os ensaios com anfípodes marinhos e estuarino, em sedimentos para análises ecotoxicológicas aquáticas, também indicam o uso da ordem dos *Amphipodas* como sendo a ideal para as análises das matrizes deste estudo.

O *Amphipoda* é uma ordem que agrupa pequenos crustáceos que habitam todos os ambientes marinhos, águas salobras e doces. Integram mais de sete mil espécies, entre elas cavadores de túneis e tubos e de natação livre. São utilizados para testes em sedimento, por possuir altas taxas de sensibilidade em locais contaminados (BELLAN-SANTINI, 1980; LAMBERSON et al., 1992), além de ter uma importante função nos ecossistemas bentônicos (REISH & BARNARD, 1979).

Segundo a ABNT NBR 15638 de 2015 os seguintes *Amphipodas* para testes em sedimento são descritos *Leptocheirus plumulosus* e *Tiburonella viscana* (Figura 11), para testes de toxicidade aguda em toxicologia aquática.

**Figura 11.** *Amphipodos Leptocheirus plumulosus* e *Tiburonella viscana*



Fonte ABNT NBR 15638 (2015)

### 1.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os processos analíticos são realizados por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. De acordo com BRASIL e colaboradores (2007) estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de condições ótimas "verdadeiras", as quais são atingidas pelo emprego de sistemas multivariados.

Existem duas grandes áreas de atuação para a análise multivariada: o Planejamento de Experimentos (Design of Experiments - DOE) e a Análise Multivariada de Dados (Multivariate Analysis - MVA). O DOE parte do princípio de que um bom planejamento pode gerar resultados ótimos com tempo e custos reduzidos.

No DOE há três objetivos principais:

- a) triagem de variáveis, ou seja, focar as atenções apenas na determinação dos fatores relevantes para se atingir o objetivo desejado;
- b) otimização de experimentos: obter um modelo que forneça as condições de trabalho a serem aplicadas para se obter as melhores respostas e
- c) robustez: consequência refletida nos resultados quando há pequenas oscilações no método otimizado.

Após a obtenção de bons resultados torna-se necessária uma ferramenta para entender e interpretar todos os dados obtidos experimentalmente. Neste sentido, o MVA tem como objetivo reconhecer as principais fontes de variação de dados complexos (muitas variáveis) e tornar as informações interpretáveis através de gráficos simples.

Há diversas estratégias que podem ser empregadas, e sua escolha deve se adequar a realidade de cada experimento e o objetivo a ser atingido. Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA, MORAIS e NAGATA, 2005).

O planejamento fatorial  $2^k$  utiliza  $k$  fatores analisados em 2 níveis. Este tipo de planejamento é particularmente útil nos estágios iniciais de um trabalho experimental, quando se têm muitas variáveis a investigar. Esses fatores podem ser estudados em um planejamento fatorial completo ou fracionado. O planejamento fatorial fracionado pode ser do tipo  $2^{k-1}$  ou  $2^{k-2}$  e estão entre os tipos mais usados de planejamento para projetos de produtos industriais e para melhoria de processos (BRASIL et al., 2007).

O planejamento fracionado é utilizado principalmente para selecionar quais fatores exercem os efeitos mais significativos na resposta desejada. Na etapa inicial de um planejamento com muitas variáveis independentes, as mais importantes são detectadas e um novo planejamento é feito considerando apenas as variáveis que apresentaram significância para o processo.

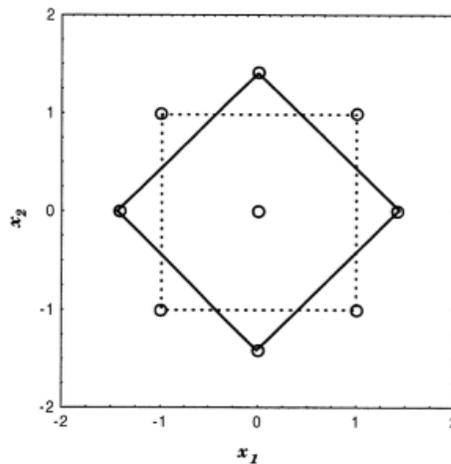
#### **1.6.1. A superfície de resposta (RSM: Response Surface Methodology)**

Superfície de Resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que possuem duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A modelagem é feita normalmente ajustando-se modelos simples (em geral lineares ou quadráticos) às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento sempre ocorre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado

modelo ao ponto ótimo desejado, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Para a localização do ponto ótimo pode-se utilizar o planejamento em estrela acrescentando ao modelo inicial um planejamento idêntico, porém girando de 45 graus em relação à posição de partida. O resultado é uma distribuição octogonal, como pode ser vista na Figura 12. Um argumento geométrico simples permite concluir que os novos pontos, assim como os primeiros, estão a uma distância de  $\sqrt{2}$  unidades codificadas do ponto central. Todos eles estão, portanto, sobre uma circunferência de raio  $\sqrt{2}$  (BARROS NETO, BRUNS e SCARMINIO, 2001).

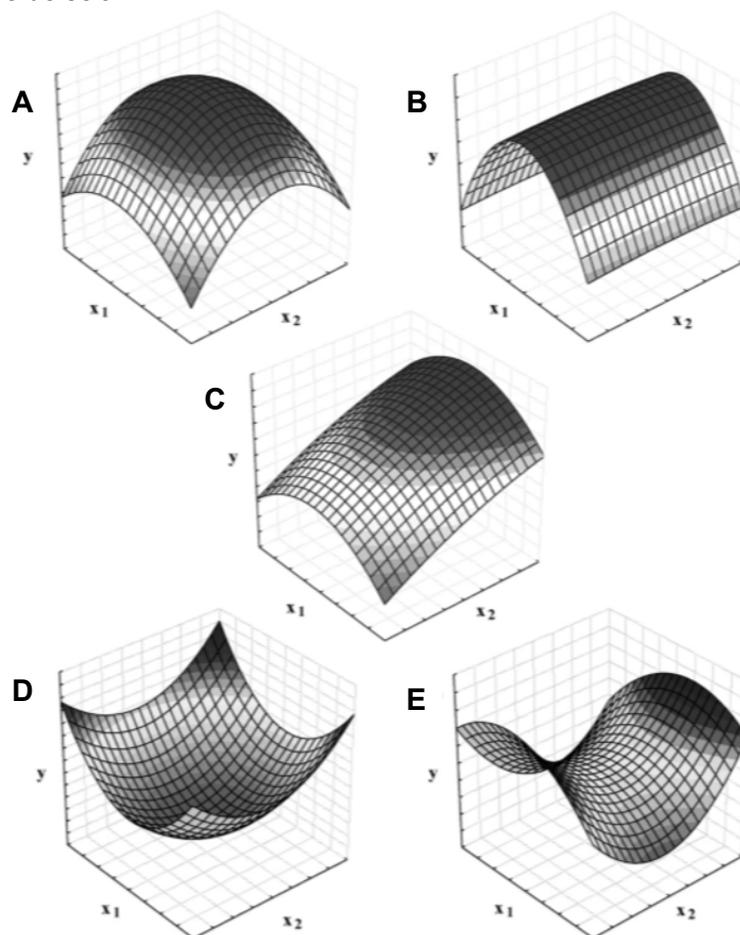
**Figura 12.** Planejamento em estrela



Fonte: BARROS NETO, BRUNS e SCARMINIO, 2001.

Exemplos de superfícies de resposta na otimização de duas variáveis pode ser visto na Figura 13. Os tons escuros indicam os locais onde se encontram as condições experimentais que fornecem as melhores respostas. As Figuras 13A e 13B representam uma superfície onde o ponto máximo está localizado dentro da região experimental estudada; a Figura 13C demonstra o ponto máximo fora da região experimental estudada sendo necessário deslocar, se possível, as condições iniciais do planejamento. A Figura 13D apresenta o ponto mínimo, onde encontramos as piores respostas e pode ser visto na Figura 13E o ponto de sela como ponto crítico. O ponto de sela é uma inflexão entre os pontos de máximo relativo e mínimo relativo. É possível encontrar as regiões ótimas observando as superfícies de resposta (BEZERRA et al., 2008).

**Figura 13.** Superfícies de respostas geradas por modelos quadráticos na otimização de duas variáveis: (A) máximo; (B) platô; (C) máximo; fora da região experimental; (D) mínimo e (E) superfície de sela.



Fonte: BEZERRA et al., 2008.

### 1.7. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Segundo a ANVISA a validação analítica deve garantir, através de estudos experimentais que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (PORTAL ANVISA, 2019).

É de extrema importância que os estudos de validação sejam representativos e com adequadas faixas de concentrações para análise de determinado analito contido em uma matriz. Métodos para compostos que se encontra em altas

concentrações requerem critérios de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para determinação de baixas concentrações. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de método analítico que inclua técnicas cromatográficas são: seletividade; linearidade; faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004).

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e algumas vezes, como figuras analíticas de mérito e serão detalhados a seguir:

**1.7.1. Seletividade:** de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

**1.7.2. Linearidade:** corresponde a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A correlação entre sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica.

**1.7.3. Precisão:** representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto que utiliza um número significativo de medidas, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de método, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto. A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de

valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável. Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação.

**1.7.4. Exatidão:** representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.

**1.7.5. Limite de detecção:** representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando procedimento experimental, este valor corresponde à menor concentração injetada, estando ou não no intervalo linear.

**1.7.6. Limite de quantificação:** representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, quantificada utilizando um determinado procedimento experimental com confiabilidade analítica adequada, ou seja, no gráfico de linearidade corresponde à menor concentração pertencente ao intervalo linear (RIBANI et al., 2004).

**1.7.7. Robustez:** de acordo com o INMETRO (INMETRO, 2020) mede a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros.

## 2 OBJETIVOS

Considerando-se a vulnerabilidade da Baixada Santista em termos de contaminação por HPAs e o potencial da espécie *Spartina alterniflora* em processos de fitorremediação, este trabalho teve como **objetivo geral** avaliar o comportamento da espécie *Spartina alterniflora*, quanto ao acúmulo de HPAs em estuário da zona litorânea do estado de São Paulo.

Como **objetivos específicos** destacam-se:

→Otimização e validação de método para determinação de HPAs em sedimento de mangue, bem como folhas e raízes de *Spartina alterniflora*, utilizando a técnica GC-MS e/ou HPLC-FLU;

→Comparação das concentrações de HPAs das folhas e raízes encontradas em amostras de *Spartina alterniflora* coletadas em região impactada (Baixada Santista) e não impactada;

→Avaliação das relações de diagnóstico (ratio) para inferir a origem dos HPAs;

→Avaliação do potencial tóxico do sedimento e a contribuição dos HPAs .

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Para melhor entendimento da parte experimental, a Tabela 6 a seguir sumariza os questionamentos deste trabalho e estudos realizados para respondê-los.

**Tabela 6.** Sumário das etapas referentes a parte experimental, apresentando pergunta a ser respondida em cada item e estratégia adotada.

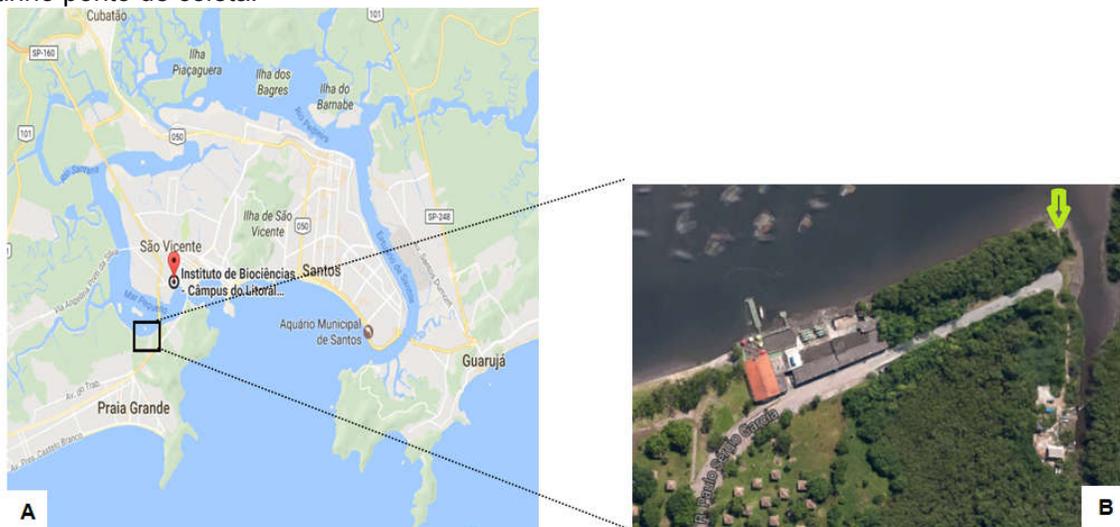
ITEM	QUESTÃO	ESTRATÉGIA	TÉCNICA/LOCAL
3.1.1	A Baixada Santista possui grande influência industrial e urbana. Dentro desta região onde poderíamos obter amostras fidedignas que refletissem esta exposição e em quais matrizes?	Mapeamento de áreas impactadas e de fácil acesso.	✓ São Vicente (Portinho) ✓ TIPOS DE AMOSTRAS: Sedimento e <i>Spartina alterniflora</i>
3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5	Como e onde seriam feitas as amostragens de forma a obter resultados representativos do local, mantendo a integridade das amostras?	Planejamento da amostragem: Levantamento bibliográfico e histórico	✓ São Vicente –via aquática/terrestre ✓ Bertioga- via terrestre
3.2	Considerando as informações encontradas na literatura como quantificar os HPAs?	Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência	✓ CG MS (Nubbe) ✓ HPLC-FLU (lab GRESKO)
3.3 3.4 3.5	Como extrair os HPAs das amostras de forma eficiente?	Otimização dos testes de extração em sedimento e <i>Spartina alterniflora</i>	✓ Extração por Ultrassom ✓ Extração por dispersão na fase sólida ✓ Planejamento experimental
3.6	Existe relação direta entre tamanho de partícula de sedimento e a concentração dos HPAs?	Peneirar as amostras em diferentes mesh	✓ Granulometria
3.7	A relação entre quantidade de carbono total e concentração dos HPAs é diretamente proporcional?	Analisar o carbono total de cada amostra	✓ TOC (lab Raquel Puppo)
3.8	As amostras de sedimento coletadas possuem efeitos tóxicos em organismos? Estes efeitos podem ser relacionados as concentrações de HPAs encontradas?	Ensaio biológicos.	✓ Testes ecotoxicológicos • <i>Lactuca sativa</i> (UNESP Rio Claro) • <i>Tiburionella viscana</i> (UNESP São Vicente)

### 3.1. AMOSTRAGEM

#### 3.1.1. Coleta das Amostras para Otimização do Método de Extração

Coletaram-se amostras de *Spartina alterniflora* e sedimento superficial de mangue na cidade de São Vicente no estado de São Paulo (Figura 14A) no local conhecido como Portinho (Figura 14B).

**Figura 14.** Localização do ponto de coleta **A)** mapa de São Vicente com a localização do Instituto de Biociências Campus Litoral\_UNESP em destaque e o ponto de coleta; **B)** Portinho ponto de coleta.

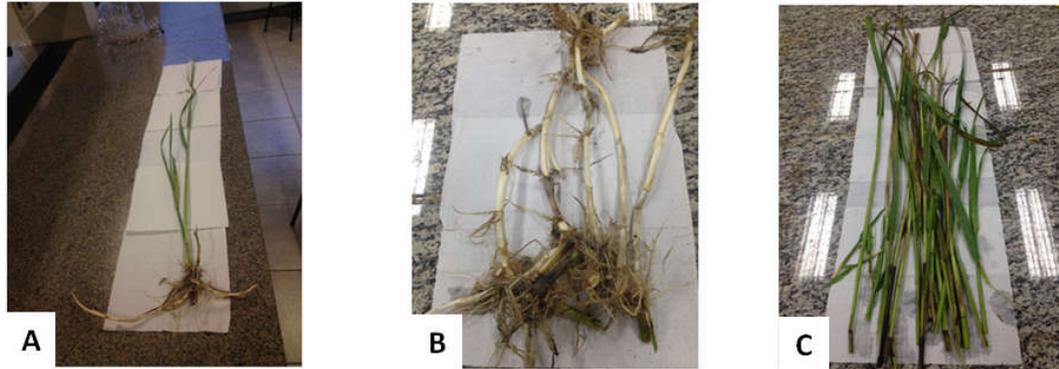


Fonte: Googlemap

Após as coletas, as amostras foram conservadas em caixa térmica e gelo reciclável até o transporte ao Instituto de Química em Araraquara, onde foram preparadas para as etapas subsequentes.

O sedimento foi distribuído em frascos de vidro, previamente limpos e secos, a *Spartina alterniflora* foi lavada (Figura 15A) para a retirada de todo sedimento impregnado nas folhas e raízes. As raízes foram separadas das folhas e caule (15C), quando estas estavam presentes (Figura 15B) e acomodadas em frascos de vidros, previamente limpos e secos. Todos os fracos foram adequadamente identificados quanto o ponto de amostragem e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizadas.

**Figura 15.** *Spartina alterniflora* limpeza e preparo, inteira (A); somente as raízes (B) e somente as folhas (C).



FONTE: a autora

As amostras foram liofilizadas (Liofilizadores Christ Alpha 1-2 LD plus Bomba Vaccubrand modelo RZ25 e Christ Alpha 2-4 LD plus e Bomba Vaccubrand modelo RC 6) até a total retirada de umidade que variou de 3-5 dias para a *Spartina alterniflora* (folhas, caule e raiz) e de 5-10 dias para as amostras de sedimento.

Após a liofilização as amostras de *Spartina alterniflora* foram trituradas em moinho de facas de aço inox (IKA® A11 basic) e as amostras de sedimento foram peneiradas de mesh 25, partículas,  $\leq 63\mu\text{m}$  (Bertel Ind. Metalúrgica LTDA, Caieiras-SP). Após este preparo uma parcela de cada amostra foi pesada (~1,000 gramas) em balança analítica (Mettler Toledo AG 245), dentro de vial âmbar de 40 mL, que foram etiquetados com o valor da massa e acondicionados em geladeira (5°C) até os testes de extração.

### 3.1.2. Plano de Amostragem

O plano de amostragem foi estabelecido com base nos estudos realizados pela CETESB em 2001 e levantamento de dados sobre as recentes modificações na região. Para este trabalho foram escolhidas duas principais regiões, Santos/São Vicente e Bertioga, considerando características fundamentais para uma amostragem representativa de locais com alta probabilidade de exposição aos HPAs (impactados) e regiões com o mínimo possível de exposição à estes contaminantes (não-impactados). Outro determinante para a escolha dos locais foi a disponibilidade

da *Spartina alterniflora* e da possibilidade de se efetuar a coleta, ou seja, acesso aos locais.

As coletas de amostras de locais impactados foram efetuadas em pontos nas regiões de Santos e São Vicente (área vermelha destacada no mapa). E as amostras de locais não impactados (branco ou testemunha) em locais próximos a reserva florestal localizada em Bertioga (área roxa em destaque no mapa) (Figura 16).

**Figura 16.** Região de estudo, área impactada em destaque vermelho e área não impactada (amostra branco) área em destaque roxo



Fonte: google map modificado pela autora.

### 3.1.3. Pontos de Coleta Área Não Impactada

As amostras do branco foram obtidas próximo ao rio Itaguapé com extensão localizada em áreas dentro e fora do perímetro da Reserva Ecológica Parque Estadual Restinga de Bertioga (área em destaque verde escuro no mapa da Figura 17A), cerca de 2 horas de distância do Instituto de Biociências \_Campus Litoral da UNESP onde as amostras de sedimento foram entregues para os testes biológicos (Figura 17B). Os pontos ideais, escolhidos inicialmente eram pontos no canal do Rio Itaguapé na divisa do Parque Ecológico. Este local é de difícil acesso e apenas pode ser explorado por via aquática, com auxílio de pequenos caiaques, impossibilitando a coleta, portanto a amostragem foi efetuada no final deste canal na foz delta (onde o rio desemboca no mar).

**Figura 17.** Localização dos pontos de coleta das amostras provenientes de áreas não impactadas: **A)** destaque para o local de coleta; **B)** distância até o Instituto de Biociências

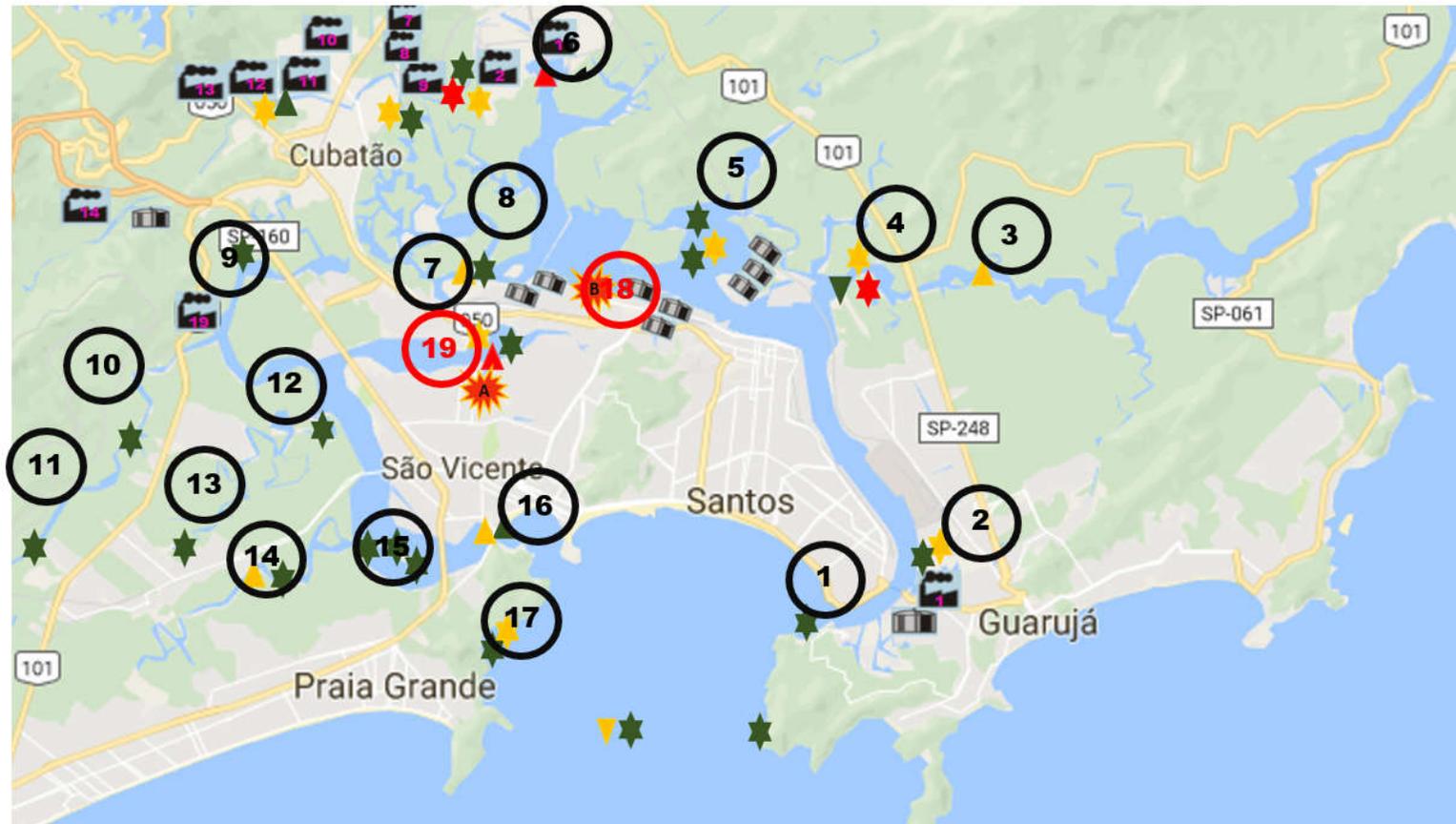


Fonte: googlemap

### 3.1.4. Área impactada

Os pontos de amostragem em áreas impactadas foram definidos de acordo com o histórico de influências antrópicas e possível acessibilidade para as coletas. No mapa da Figura 18 pode-se observar dados da CETESB de locais onde se encontram diversas indústrias instaladas de armazenamento de petróleo e derivados, locais onde foram coletadas amostras de sedimento as quais foram detectados HPAs de alta e/ou baixa massa molar. Também estão destacados locais onde ocorreram eventos que podem contribuir para o aumento das concentrações destes contaminantes. No ponto A (Figura 18 próximo ao ponto de coleta 19) ocorreu em 2017 o incêndio em moradias irregulares (palafitas) e o ponto B (Figura 18 próximo ao ponto de coleta 18) local que em 2015 ocorreu o incêndio no terminal da Alemoa, local de armazenamento de combustíveis.

Figura 18. Pontos de amostragem CETESB influências nas regiões



Fonte: googlemap modificada pela autora

**LEGENDA:**

- ▲ Alto peso molecular (≥4 anéis)
- ▼ Baixo peso molecular (≤3 anéis)
- ★ Todos os HPAs estudados
- 🏭 Indústrias
- Pontos de coleta influências fixas
- Baixas concentrações
- Médias concentrações
- Altas concentrações
- 🚚 Terminais de grânéis líquidos
- Pontos de coleta decorrente de acontecimentos pontuais

**Numeração Indústrias:**

- 1: Cosipa
- 2: IFC
- 3: Manah
- 4: Serrana
- 5: Ultrafértil
- 6: Union Carbide
- 7: Alba
- 8: Rhodia
- 9: Carbo cloro



- 10: Petrocoque
- 11: CBE
- 12: Petrobrás RPBC
- 13: Ultrafértil-CB
- 14: Cia Santista de Papel
- 15: Coperbrás
- 16: Colubia
- 17: Solornico
- 18: Liquid Química
- 19: Ciel
- 20: Doe Química

Considerando as informações disponíveis e as condições operacionais, foi decidido por uma única campanha de amostragem, nesta campanha o maior número de pontos, dentre os pontos estudados pela CETESB em 2001 seriam incluído.

As coordenadas dos pontos de coleta e as datas estão sumarizados na Tabela 7, na Figura 19 estão os pontos de coletas indicados.

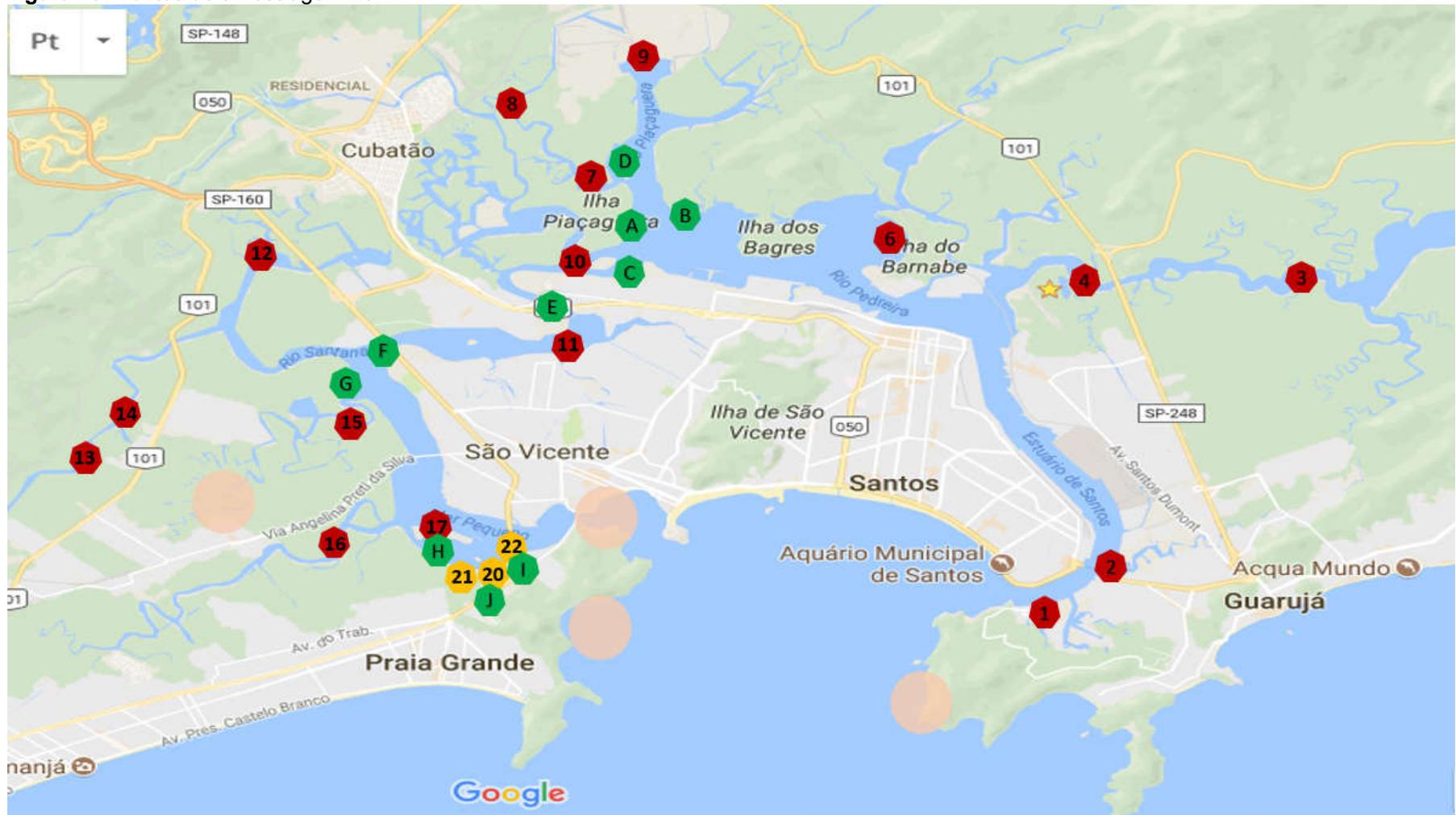
Dia 10 de julho de 2017 foram coletados sedimento (marcador vermelho ) e *Spartina alterniflora* (marcador verde )

Dia 11 de julho de 2017 apenas sedimento (marcador amarelo )

**Tabela 7.** Pontos de coletas, coordenadas e data de coleta.

PONTO	COORDENADAS		DATA
	latitude	longitude	COLETA
1	-23.9947	-46.3074	10/07/2017
2	-23.9859	-46.2866	10/07/2017
3	-23.9191	-46.2958	10/07/2017
4	-23.9208	-46.2507	10/07/2017
6	-23.9174	-46.3318	10/07/2017
7	-23.8986	-46.3844	10/07/2017
8	-23.8816	-46.4012	10/07/2017
9	-23.8711	-46.3717	10/07/2017
10	-23.9198	-46.3824	10/07/2017
11	-23.9345	-46.3869	10/07/2017
12	-23.9193	-49.4509	10/07/2017
13	-23.96302	-46.4801	10/07/2017
14	-23.9533	46.4744	10/07/2017
15	-23.9519	-46.4354	10/07/2017
16	-23.9559	-46.4385	10/07/2017
17	-23.9835	-46.4327	10/07/2017
20	-23.9864	-46.4034	11/07/2017
21	-23.9865	-46.4031	11/07/2017
22	-23.9865	-46.4032	11/07/2017

Figura 19. Pontos de amostragem 2017.



Fonte: google map modificado pela autora.

### 3.1.5. Coleta de Amostras

As amostras de sedimento superficial foram coletadas em balde de metal onde as porções foram separadas com pá de metal e dispostas em recipientes de alumínio em 3 porções, uma que seria destinada Instituto de Biociências –UNESP São Vicente (220 ml) , uma para as análises químicas deste trabalho (500 ml) e outra para ensaios de fitotoxicidade (220 ml) no Instituto de Biociências – UNESP Rio Claro. As amostras de *Spartina alterniflora* foram embaladas completamente com papel alumínio e armazenadas em saco plástico sob refrigeração (5°C). Todas as amostras foram etiquetadas com identificação de numeração do ponto previamente estabelecida e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável. A amostragem no Portinho, pontos 20, 21 e 22 da Figura 19, também foi efetuada com posterior acondicionamento das amostras conforme descrito anteriormente. Informações de via, horários e datas de todas as coletas podem ser vistos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Detalhes das campanhas de amostragem.

Data	Horário	Via utilizada	Pontos	Matriz
10/07/2017	5:30-11:00	Aquática	1 a 17 (Figura 18)	sedimento
10/07/2017	14:00-17:00	Aquática	A a H (Figura 18)	<i>Spartina alterniflora</i>
11/07/2017	10:00	Terrestre	20, 21 e 22 (Figura 18)	sedimento
11/07/2017	10:00	Terrestre	I e J (Figura 18)	<i>Spartina alterniflora</i>

Amostras de sedimento proveniente do distrito de Ariri na cidade de Cananéia, litoral norte do estado de São Paulo foram analisadas para comparação pois o local é pouco impactado. As amostras foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof Dr Dênis Abessa, docente do Instituto de Biociência Unesp do Campus de São Vicente.

### 3.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISE

Considerando-se os métodos mais utilizados nas análises de HPAs descritos na literatura (revisão bibliográfica, Tabela 5, pag. 59-60), optou-se pela utilização de cromatógrafo gasoso para as análises de separação e quantificação dos HPAs em amostras ambientais.

Também utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência para a otimização de parâmetros dos métodos de extração, em amostras de sedimento e *Spartina alterniflora*.

O trabalho foi desenvolvido utilizando os seguintes equipamentos:

- 1- Cromatógrafo Gasoso da Varian CP-3800 com espectrômetro de massas Saturn 2000 ion trap, possui fonte de ionização por impacto eletrônico e analisador íon trap.
- 2- Cromatógrafo Gasoso MS/MS-QP 2020 SHIMADZU com analisador quadrupolo, possui fonte de ionização de impacto eletrônico e analisador quadrupolo.
- 3- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência LC 920 Varian com detector de fluorescência.

A seguir estão detalhados os métodos desenvolvidos em cada equipamento, padrões e solventes utilizados.

#### 3.2.1. GC-MS Varian CP 3800 MS 2000

Para a solução estoque utilizou-se o padrão analítico da AccuStandar Z-014G-R PAH Mix 2 mg mL<sup>-1</sup> em diclorometano:benzeno (1:1). A partir de 1 mL da solução padrão, foram efetuadas duas diluições, utilizando-se n-hexano (95% pureza, Tedia). A primeira diluição foi efetuada com o volume total da solução padrão (1,000 mL) diluindo-se a 5,0 mL (balão volumétrico limpo e seco), obtendo-se assim a solução A. A segunda diluição foi efetuada tomando-se 1,000 mL da solução A com o auxílio de micropipeta, em balão volumétrico diluindo-se a 10,0 mL (balão volumétrico limpo e seco), obtendo-se a solução B. As concentrações das soluções A e B e informações sobre o padrão estão sumarizados na Tabela 9. As soluções estoque foram transferidas dos balões volumétricos para frascos de vidro com batoque de teflon e tampa de rosca (frascos para “headspace”, de 40mL), após serem devidamente identificados, foram armazenados a -20°C em freezer.

**Tabela 9.** Concentrações dos HPAs na solução padrão e nas soluções estoque preparadas

HPA	n. CAS	Solução padrão*	Solução Estoque A	Solução Estoque B
		(mg mL <sup>-1</sup> )	(µg mL <sup>-1</sup> )	
Acenafteno	83-32-9	2	400	40
Acenaftileno	208-96-8	2	400	40
Naftaleno	91-20-3	2	400	40
Fluoreno	86-73-7	2	400	40
Fluoranteno	206-44-0	2	400	40
Pireno	129-00-0	2	400	40
Fenantreno	85-01-8	2	400	40
Antraceno	120-12-7	2	400	40
Criseno	218-01-9	2	400	40
Benzo(a)antraceno	56-55-3	2	400	40
Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	2	400	40
Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	2	400	40
Banzo(a)pireno	50-32-8	2	400	40
Dibenzo(a,h)antraceno	53-70-3	2	400	40
Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	2	400	40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	2	400	40

\* AccuStandard Z-014G-R, em diclorometano:benzeno (1:1)

Nessa técnica de análise GC-MS um íon típico do analito é formado, denominado íon precursor ou íon pai, o qual é fragmentado, em íons com relação massa/carga menores denominados íons fragmentos ou íons filhos, que auxiliam na identificação e quantificação das substâncias estudadas. As condições cromatográficas otimizadas para análise de HPAs por GC-MS, incluindo os íons precursores ou pais para o métodos, estão apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Especificações do GC-MS/MS VARIAN CP 3800 MS 2000 utilizado e dados do método de análise dos compostos.

<b>Equipamento</b>	<b>VARIAN CP 3800 MS2000</b>				
<b>Coluna</b>	PHENOMENEX Zebron ZB 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm)				
<b>Tempo de análise</b>	38 minutos				
<b>Injetor</b>	300°C; splitless; volume 1 µL				
<b>Programação da Coluna</b>	<b>Temperatura (°C)</b>		<b>Taxa de Aquecimento (°C/min)</b>		<b>Hold (min)</b>
	80		0		6
	140		20		2
	180		20		0
	186		1,0		0
	245		20		2
	300		7		6,19
<b>Programação Espetrômetro de Massas</b>	<b>TEMPO (min)</b>		<b>MASSA (m/z)</b>		<b>DADOS COMPOSTOS</b>
	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>Nome/Massa Íon Pai/Modo/m/z/V</b>
	5,00	7,00	148	151	1_149,9m/z_NR_55m/z_30V
	7,00	11,00	126	138	2_136,3 m/z_NR_49,8 m/z_20V
					3_128,0m/z_NR_48,0m/z_20V
	11,00	12,50	170	172	4_172,0m/z_NR_63,1m/z_70V
					5_153,2m/z_NR_71,3m/z_10V
	12,50	14,00	151	162	6_162,2m/z_NR_71,3m/z_40V
					7_152,1m/z_NR_55,7m/z_50V
	14,00	16,00	164	167	8_165,2m/z_NR_60,9m/z_58V
					9_188,1m/z_R_69m/z_0,30V
	16,00	20,00	176	189	10
					e11_178,1m/z_NR_65,3m/z_56V
	20,00	25,00	200	203	12 e 13_202,2m/z_74,2m/z_66V
14_240,3m/z_R_105,8m/z_0,90V					
25,00	28,00	225	240	15	
				e16_228,2m/z_NR_100,5m/z_23V	
28,80	29,82	250	255	17 e 18_252,3_NR_111,1m/z_50V	
				19_263,7m/z_R_116,4m/z_0,99V	
29,82	32,00	250	264	20_252,1m/z_NR_111,1m/z_18V9	
				21_276,3m/z_NR_121,7m/z_20V	
32,00	38,00	275	279	22_278,2m/z_NR_122,6m/z_40V	

### 3.2.2. GC MS-QP 2020 Shimadzu

Após alguns meses de testes o equipamento GC-MS (VARIAN CP 3800 MS 2000) ficou inoperante por tempo indeterminado, impossibilitando a continuidade dos testes. Assim sendo, as condições cromatográficas otimizadas anteriormente foram mantidas e o estudo da resposta do detector MS foi re-avaliado no equipamento GC-MS Shimadzu QP 2020, onde se deu a continuidade até a finalização deste trabalho. Por se tratar de outro tipo de analisador (quadrupolo), os parâmetros do espectrômetro de massas referentes ao TRAP não foram utilizados. As especificações do equipamento, coluna e detalhes do método podem ser vistos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Especificações do GC/MS-QP 2020 SHIMADZU e do método otimizado.

Equipamento	Shimadzu GC-MS-QP2020			
Coluna	Rtx-SMS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm)			
Tempo de análise	38 minutos			
Injetor	300°C; split 1:5; volume 1 µL			
Programação de temperatura da Coluna	Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Hold (min)	
	80	0	6	
	140	20	2	
	180	20	0	
	186	1,0	0	
	245	20	2	
	300	7	6	
Programação Aquisição Espetrômetro de Massas	TEMPO (min)		MASSA (m/z)	
	Início	Fim	Início	Fim
	5,00	7,00	148	154
	7,00	11,00	126	138
	11,00	12,50	170	172
	12,50	14,00	151	1162
	14,00	16,00	164	167
	16,00	20,00	176	189
	20,00	25,00	200	203
	25,00	28,00	225	240
	28,80	29,82	250	255
	29,82	32,00	250	264
32,00	38,00	275	279	

Para o estudo de linearidade dos métodos em cromatografia gasosa preparou-se uma solução estoque B1 de concentração 20 µg mL<sup>-1</sup> a partir da solução estoque B (Tabela 9, pag 83) de 40 µg mL<sup>-1</sup>. A partir de B1 foram preparadas 19 soluções de

mistura de padrões de HPAs, em n-hexano, utilizando-se micropipetas e balões volumétricos, as concentrações preparadas foram de 100 ng mL<sup>-1</sup> e 10 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram transferidas para frascos âmbar (20 mL) com batoque de teflon e tampa de rosca, identificados e acondicionados em temperatura de -20°C. Para análise, alíquotas de aproximadamente 1,5 mL de cada uma das 19 soluções foram inseridas em vial âmbar de volume de 2 mL. Estas soluções foram utilizadas para a verificação da linearidade dos métodos desenvolvidos nos equipamentos descritos nos itens 3.2.1 (pag. 83) e 3.2.2. (pag. 85).

### 3.2.3. HPLC- FLU VARIAN LC 920

Solução padrão dos 15 HPAs foram preparados a partir de uma solução estoque proveniente da diluição do padrão misto da Sigma Aldrich TCL HPAs MIX 49156 em acetonitrila. Foram analisadas 10 soluções diluídas com concentrações entre 0,16 a 800 ng mL<sup>-1</sup> (Tabela 12) em duplicata.

**Tabela 12.** Concentrações (ng mL<sup>-1</sup>) das soluções padrão inicial (adquirida) e da solução padrão estoque, utilizada no estudo com o sistema HPLC-FLU

HPA	n. CAS	Solução Padrão	Solução Estoque A	Faixa de de trabalho**
Naftaleno	91-20-3	20000	400	4,00-400
Acenaftileno	208-96-8	-	-	-
Acenafteno	83-32-9	40000	800	8,00-800
Fluoreno	86-73-7	4000	80	0,800-80
Fenantreno	85-01-8	1600	32	0,32-32
Antraceno	120-12-7	800	16	0,16-16
Fluoranteno	206-44-0	2000	40	0,4-40
Pireno	129-00-0	4000	80	0,80-80
Benzo(a)anraceno	56-55-3	2000	40	0,4-40
Criseno	218-01-9	2000	40	0,4-40
Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	800	16	0,16-16
Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	800	16	0,16-16
Benzo(a)pireno	59-32-8	2000	40	0,4-40
Dibenzo(a,h)antraceno	53-70-3	8000	160	1,6-160
Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	3200	64	0,064-64
Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	2000	40	0,4-40

\* Sigma Aldrich TCL HPAs MIX 49156, em acetonitrila

\*\* a partir da solução estoque, foram preparadas 10 soluções de trabalho

O método analítico para a quantificação dos HPAs foi baseado em método desenvolvido neste grupo de pesquisa para amostras de hortaliças (SUGAUARA, 2013). Esta técnica permite a detecção de 15 HPAs, excluindo o acenafileno dentre os 16 prioritários da EPA, por apresentar baixa fluorescência, sendo necessária uma concentração elevada e não aplicável às amostras em estudo.

Os comprimentos de ondas de excitação e emissão otimizados para o detector de fluorescência, os parâmetros previamente otimizados para o HPLC e especificações do equipamento, estão sumarizados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Condições cromatográficas (HPLC-FLU) otimizadas para determinação de HPAs.

Equipamento	VARIAN LC 920			
Coluna	SUPELCOSIL PAH (250mm x 4,6 mm x 5 mm)			
Tempo de análise	42 minutos			
Volume Injeção	20 µL			
Temperatura da Coluna	Sala climatizada sem forno de coluna			
Fase Móvel	ACN:H <sub>2</sub> O			
Gradiente	ACN(60%)5' -----25'----- ACN(100%) 12'			
Vazão	1,2 mL min <sup>-1</sup>			
Detector	Tempo (min)	$\lambda_{excitação}$	$\lambda_{emissão}$	PMT
	0,0	275	325	Médio
	13,0	252	370	Médio
	15,0	240	398	Médio
	17,0	290	460	Médio
	18,5	240	389	Médio
	24,7	260	380	Médio
	27,0	290	430	Médio
	35,5	300	419	Médio
37,6	302	503	Médio	

O forno de coluna do equipamento não foi utilizado por não apresentar estabilidade no controle de temperatura, na tentativa de evitar oscilações a sala do HPLC-FLU permaneceu climatizada por todo o período de análise.

### 3.3. EXTRAÇÃO

#### 3.3.1. Preparo das Amostras Fortificadas

As amostras liofilizadas foram pesadas em balança analítica (250 mg *Spartina alterniflora* 500 mg sedimento) em vials âmbar de 40 mL. Os padrões utilizados para análise em cromatografia gasosa possuem a mesma concentração para todos os analitos, pois o sinal é proporcional à quantidade de íons formados, enquanto para cromatografia líquida com detector de fluorescência as concentrações dos analitos são variadas, pois o sinal será proporcional a propriedade de fluorescência de cada analito.

As amostras foram organizadas em 3 conjuntos para cada matriz sendo separadas por 1- AMOSTRAS FORTIFICAÇÃO (ANÁLISE EM GC/MS) 2- AMOSTRAS FORTIFICAÇÃO (HPLC-FLU); 3- AMOSTRAS TESTEMUNHA (BRANCO); totalizando 6 conjuntos de amostras.

Os dois conjuntos de amostras (sedimento e *Spartina alterniflora*) ANÁLISE EM HPLC-FLU foram fortificados utilizando solução estoque preparada a partir da solução Sigma Aldrich TCL HPAs MIX 49156 em acetonitrila. A descrição em detalhes está sumarizada a seguir:

- *Spartina alterniflora* (partes aéreas) → adição de 150 µL de solução padrão estoque dos 15 HPAs com concentrações de 16 a 400 ng mL<sup>-1</sup> (Tabela 14)
- Sedimento → adição de 300 µL de solução padrão estoque dos 15 HPAs com concentrações de 16 a 400 ng mL<sup>-1</sup> (Tabela 14)

Para a fortificação das ANÁLISE EM GC-MS foi necessário a diluição de uma nova solução estoque a partir da solução estoque B descrita na Tabela 9 (pag. 83), proveniente da solução AccuStandar Z-014G-R PAH Mix. Esta nova solução estoque que chamaremos de **estoque C** foi preparada da seguinte maneira, em um balão volumétrico de 10,0 mL previamente limpo e seco, foi adicionado 500 µL da solução estoque B, ao balão volumétrico foi adicionado n-hexano até o volume final de 10,0 mL. A **solução estoque C** possui concentração final de 2 µg mL<sup>-1</sup> dos 16 HPAs.

Os dois conjuntos de amostras (sedimento e *Spartina alterniflora*) ANÁLISE EM GC-MS foram fortificados da seguinte forma:

- *Spartina alterniflora* → adição de 50 µL de solução padrão estoque C com concentração de 2000 ng mL<sup>-1</sup>.
- Sedimento → adição de 100 µL de solução padrão estoque C com concentração de 2000 ng mL<sup>-1</sup>.

As matrizes permaneceram em contato com a solução padrão por no mínimo 24 horas antes do prosseguimento dos testes. As concentrações finais das matrizes fortificadas estão na Tabela 14.

**Tabela 14.** Concentração em ng g<sup>-1</sup> dos HPAs após a fortificação das amostras com as soluções estoques.

HPAs	Amostras de Sedimento e <i>Spartina alterniflora</i>	
	ANÁLISE EM HPLC-FLU	ANÁLISE EM GC/MS
Naftaleno	240	400
Acenaftileno	-	400
Acenafteno	480	400
Fluoreno	48	400
Fenantreno	19,2	400
Antraceno	9,6	400
Fluoranteno	24	400
Pireno	48	400
Benzo(a)anraceno	24	400
Criseno	24	400
Benzo(b)fluoranteno	9,6	400
Benzo(k)fluoranteno	9,6	400
Benzo(a)pireno	24	400
Dibenzo(a,h)antraceno	96	400
Benzo(g,h,i)perileno	38,4	400
Indeno(1,2,3-cd)pireno	24	400

Ao terceiro conjunto de amostras (BRANCO) foi adicionado 500 µL do mesmo solvente utilizado na conservação dos padrões, acetonitrila (padrão HPLC) e n-hexano (padrão GC).

Todas as amostras após a adição de solução padrão ou solvente, foram submetidas a agitação em vórtex por 30 segundos e deixadas por 24 horas acondicionadas a -20°C. Após este período de 24 horas as amostras foram colocadas na capela sob fluxo moderado de N<sub>2(g)</sub> até a secagem completa, os vials foram fechados com tampa de rosca contendo septo de silicone facetado com Teflon<sup>MR</sup>, vedados com Parafilm<sup>MR</sup> e armazenados a 5°C (refrigerador) até o início de cada teste. Estas amostras foram utilizadas em todos os testes preliminares de extração.

### 3.3.2. Otimização do Processo de Extração

O método de extração por ultrassom possui parâmetros que devem ser ajustados no decorrer de sua otimização, como tempo de extração, solvente ou misturas de solventes extratores, volume do solvente e número de extrações consecutivas por amostra. A eficiência do método de extração de HPAs em amostras de sedimento e *Spartina alterniflora* foi testada utilizando as amostras fortificadas no item 3.3.1 de concentrações finais indicadas na Tabela 14 (pag. 89). Na Figura 20 podemos observar os detalhes dos métodos otimizados.

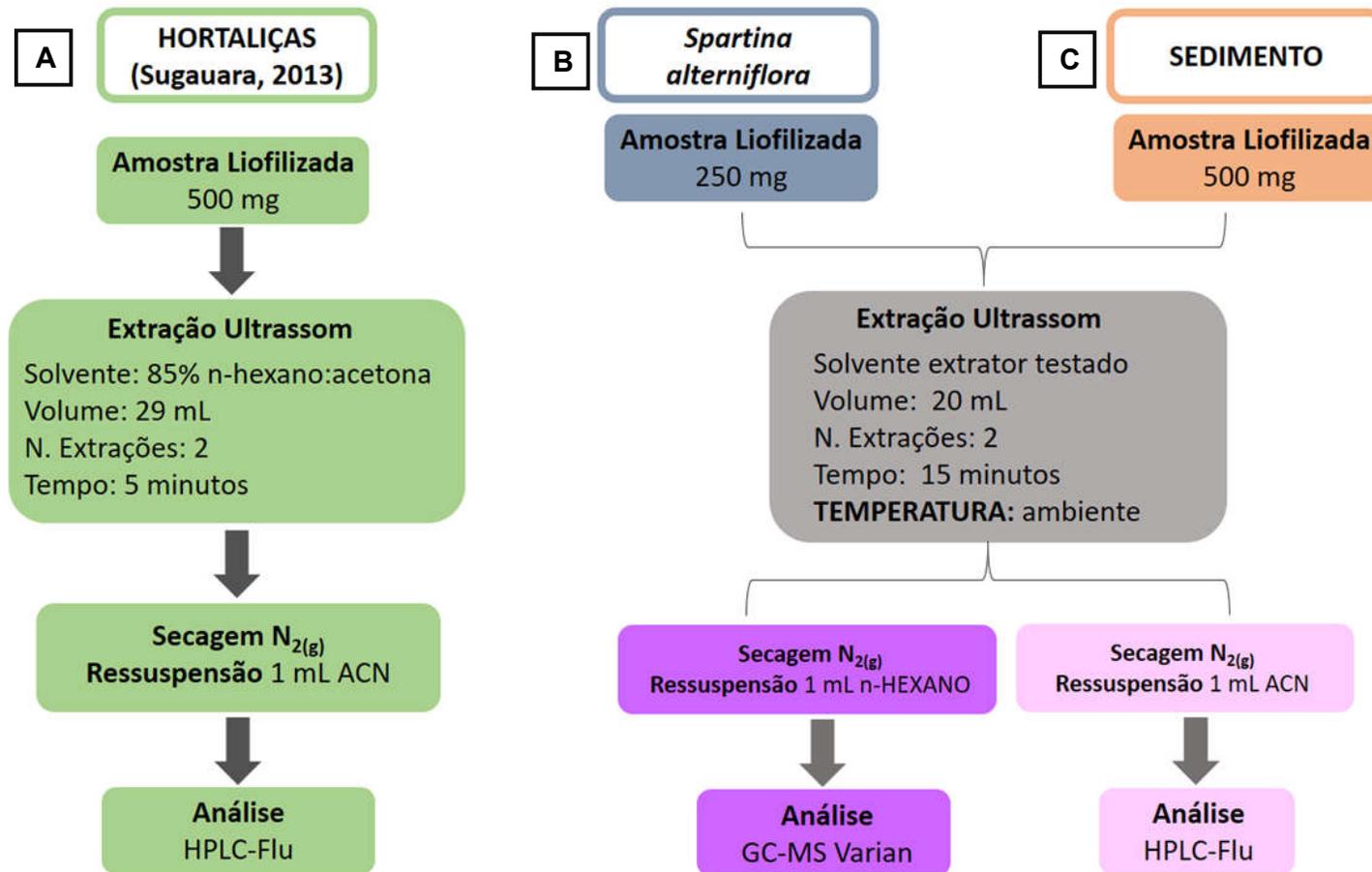
Como base para a extração dos HPAs foi utilizado método previamente desenvolvido no nosso grupo de pesquisa para extração de HPAs em amostras de hortaliças (SUGAUARA, 2013), como pode ser observado na Figura 20.

Os parâmetros otimizados inicialmente foram:

- Mistura de solventes: diclorometano (Panreac<sup>MR</sup> 99,9%) e acetona (Honeywell<sup>MR</sup> 100%) 1:1; n-hexano (Tedia<sup>MR</sup> 95%) e diclorometano 1:1 e acetona e n-hexano 1:1.

- A utilização de vórtex (Phoenix Luferco, São Paulo, Brasil) antes de cada etapa de extração foi testada pois potencializa a dispersão do solvente extrator, podendo resultar em aumento da eficiência do processo. O teste de extração de HPAs nas matrizes fortificadas e do branco em banho de ultrassom (Arruda Ultrassons SX50 de capacidade de 20 litros), após agitação por vórtex, foram realizadas em duplicata.

**Figura 20.** Método de extração previamente otimizado para amostras de hortaliças (A); método aplicado as amostras de *Spartina alterniflora* (B); sedimento superficial provenientes de mangue (C).



Fonte: a autora

### 3.4. *Spartina alterniflora*

#### 3.4.1. Otimização do Método de Extração de HPAs - Planejamento Experimental

Após observar os testes preliminares e definir os solventes extratores (acetona e n-hexano) e a utilização de vórtex, efetuou-se um planejamento experimental completo (2k) onde k representa o número de variáveis a serem otimizadas.

Algumas observações e ajustes foram necessários para que os experimentos fossem conduzidos considerando os custos e a possibilidade de execução, sabendo que seriam analisadas um grande número de amostras. Para isso os parâmetros ajustados foram, massa da amostra fixada em 500 µg, o volume mínimo de solvente extrator necessário para que a amostra fosse totalmente encoberta (mínimo de 10 mL), número de extrações consecutivas (máximo de 3), proporção da mistura de solvente e tempo de extração. Os fatores contendo os ajustes dos níveis estão sumarizados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Fatores testados no planejamento completo e os níveis estabelecidos.

FATORES	MENOR NÍVEL (-1)	MÉDIO (0)	MAIOR NÍVEL (+1)
A) Solvente de Extração (n-hexano:acetona)	50%	75%	100%
B) Volume do Solvente (mL)	10	15	20
C) Tempo de Extração (min)	10	20	30
D) Número de Extrações Consecutivas	1	2	3

As amostras foram pesadas (500 µg) em vial âmbar de 40 mL e fortificadas com adição de 30 µL de solução estoque B (item 3.2.1 Tabela 9, pag. 83), obtendo uma concentração de 1200 ng mL<sup>-1</sup>, após a adição do padrão seguiu-se a sequência descrita ao final do item 3.3.1 (pag. 88). Os experimentos gerados pelo programa Statistica<sup>MR</sup> 7.0 referentes ao planejamento experimental completo (2k) com k= 4 estão detalhados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Planejamento Experimental Completo 2k (k=4)

Número do Experimento	A	B	C	D
1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	-1
4	-1	1	1	-1
5	-1	1	-1	1
6	-1	-1	-1	1
7	1	1	1	1
8	-1	1	1	1
9	-1	1	-1	-1
10	1	1	-1	-1
11	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	1	1
13	-1	-1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	-1	1	1
16	-1	-1	1	-1
M1	0	0	0	0
M2	0	0	0	0
M3	0	0	0	0
M4	0	0	0	0

**LEGENDA:**

A: tipo de solvente  
 B: volume de solvente  
 C; tempo de extração no ultrassom  
 D; número de replicatas  
 M: experimento nos níveis médios

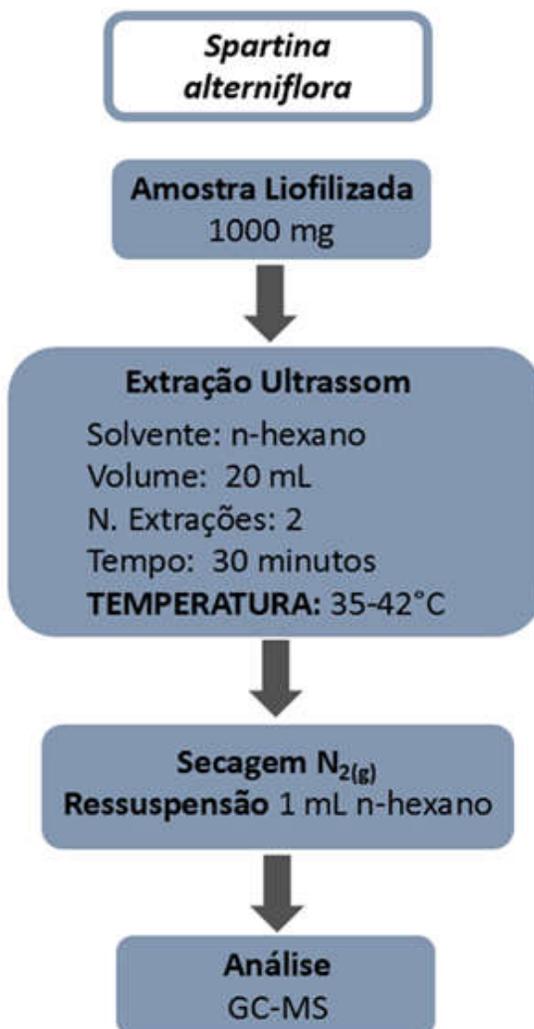
### 3.4.2. Validação do Método de Extração de HPAs (Análise em GC-MS)

Amostras de raízes e folhas+caule de *Spartina alterniflora* previamente liofilizada foram pesadas (aproximadamente 1,000 g) e fortificadas com 12 concentrações em duplicatas (100, 300, 600, 700, 900, 1100, 1200 e 1300 ng g<sup>-1</sup>) e triplicatas (30, 40,

50 e 60 ng g<sup>-1</sup>). As fortificações das amostras de concentração 30; 40; 50; 60; 100; 300; 600; 700 e 900 ng mL<sup>-1</sup>, foram efetuadas com a adição de solução estoque C, descrita no item 3.3.1 (pag. 88) nas seguintes alíquotas: 15; 20; 25; 30; 50; 150; 300; 350 e 450 µL respectivamente. Para as amostras de concentração 1100; 1200 e 1300 ng mL<sup>-1</sup> foi utilizada a solução estoque B, descrita na Tabela 9 item 3.2.1, com a adição das seguintes alíquotas 27,5; 30 e 32,5 µL respectivamente, após a adição do padrão seguiu-se a sequência descrita ao final do item 3.3.1(pag 88).

Amostras do branco foram extraídas em triplicata, todas as extrações seguiram o método descrito na Figura 21.

**Figura 21.** Método otimizado para extração de HPAs em *Spartina alterniflora*.



Fonte: A autora.

### 3.5. SEDIMENTO

#### 3.5.1. Extração por Ultrassom –Monitoramento de Temperatura

O método de extração foi baseado no descrito por SUGAUARA (2013) adicionando-se monitoramento de temperatura de acordo com reportado por LI e colaboradores (2010).

As amostras foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.3.1 (pag. 88), em triplicata utilizando os seguintes solventes extratores: acetona e mistura de acetona:diclorometano (1:1). As extrações foram realizadas com o monitoramento da temperatura do banho de ultrassom, que variou de 35-42°C.

#### 3.5.2. Planejamento Experimental Fracionado ( $2^{k-2}$ ) - GC-MS Varian

A otimização do método foi iniciada com a aplicação de planejamento experimental fracionado  $2^{k-2}$ , indicado para métodos com 4 fatores ou mais, a serem otimizados. Os fatores avaliados são mostrados na Tabela 17, com os respectivos níveis testados.

**Tabela 17.** Variáveis estabelecidas para a otimização de método de extração de HPAs das amostras de sedimento.

FATORES	MENOR NÍVEL	0	MAIOR NÍVEL
A) Solvente de Extração (acetona:DCM*)	50%	70%	90%
B) Volume de Solvente (mL)	10	20	30
C) Tempo de Extração (min)	10	20	30
D) Número de Extrações Consecutivas	1	2	3
E) Massa da Matriz (g)	1,000	1,500	2,000

\* diclorometano

As amostras utilizadas nesta etapa foram pesadas (aproximadamente: 1,000; 1,500 e 2,000 g ) em vial âmbar de 40 mL e fortificadas com adição de 30 µL de solução estoque B (item 3.2.1 Tabela 9, pag. 83), obtendo uma concentração de

1200 ng mL<sup>-1</sup>, após a adição do padrão seguiu-se a sequência descrita ao final do item 3.3.1 (pag 88).

As amostras foram extraídas de acordo com o descrito na Tabela 18, de forma aleatório, sendo em três níveis: baixo, intermediário e alto. Amostras do branco foram extraídas de acordo com o planejamento experimental, obtendo-se ao final o dobro de experimentos, 26 no total (13 amostras fortificadas + 13 amostras branco).

**Tabela 18.** Planejamento experimental fatorial fracionado para extração de HPAs em amostras de de sedimento.

Número do Experimento	A	B	C	D	E
1	-1	-1	-1	1	1
2	-1	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1
5	1	1	1	1	1
6	1	-1	-1	-1	-1
7	-1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	1	1	-1
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0

A: solvente extrator  
 B: volume do solvente  
 C: tempo de extração  
 D: número de extrações  
 E: massa da matriz

+1: maior nível estudado  
 0: nível médio estudado  
 -1: menor nível estudado

### 3.5.3. Planejamento Experimental do Ponto Central - GC-MS Shimazu

As amostras utilizadas nesta etapa foram pesadas (aproximadamente: 1,000; 1,500 e 2,000 g) em vial âmbar de 40 mL e fortificadas com adição de 30 µL de solução estoque B (item 3.2.1 Tabela 9, pag. 83) obtendo uma concentração de 1200 ng mL<sup>-1</sup> no extrato, após a adição do padrão seguiu-se a sequência descrita ao final do item 3.3.1.

Após a finalização do planejamento experimental fatorial fracionado, aplicou-se o segundo planejamento experimental, com a fixação de alguns fatores: massa do analito em 1,000g e a quantidade de extrações consecutivas, 2. Neste planejamento foram avaliados os seguintes fatores: tempo de extração, composição e volume do solvente extrator (Tabela 19, pag.88 ).

**Tabela 19.** Planejamento experimental do ponto central dos três fatores estudados.

FATORES	-α	-1	0	+1	+α
A) Solvente de Extração (acetona:DCM*)	60%	70%	80%	90%	100%
B) Volume de Solvente (mL)	10	15	20	25	30
C) Tempo de Extração (min)	5	8	12	15	20

\* diclorometano

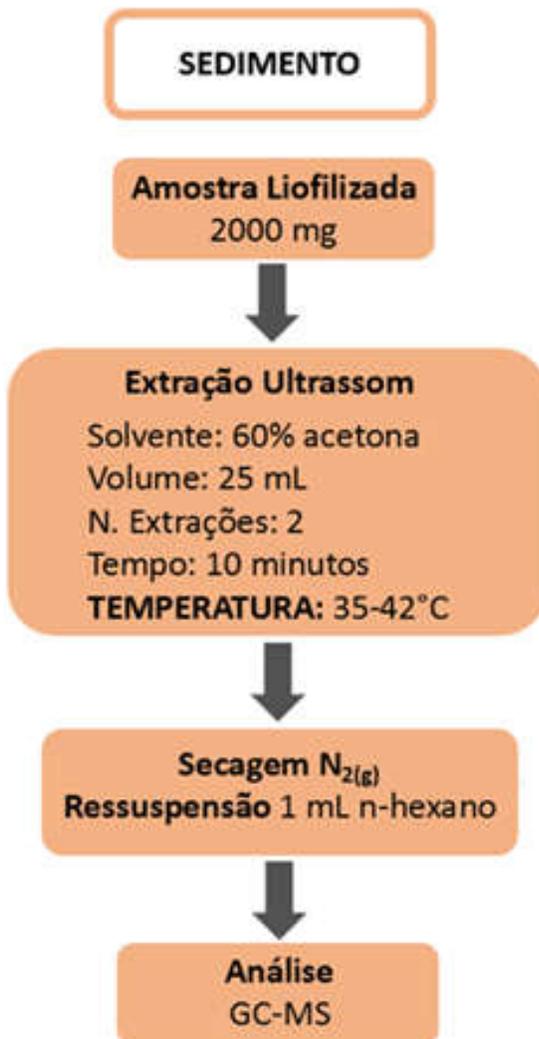
### 3.5.4. Validação do Método de Extração (GC-MS Shimadzu)

Dois métodos foram otimizados e validados de acordo com o exigido pela ANVISA. No método **A** 1,000 g de cada amostra de sedimento liofilizado foi pesado em vial âmbar de 40 mL, estas amostras foram fortificadas em cinco níveis, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng mL<sup>-1</sup> em duplicata com adição de 25; 50; 250 e 500 µL de solução estoque C respectivamente. A solução estoque C foi descrita no item 3.3.1 pag. 88.

Para o método **B** o mesmo procedimento foi aplicado modificando a massa de sedimento (2,000 g) resultando na adição de alíquotas de 12,5; 25; 125 e 250 µL de

solução estoque C, descrita no item 3.3.1 (pag. 88) para obtenção das concentrações finais de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng mL<sup>-1</sup>. O método B está descrito na Figura 22.

**Figura 22.** Fluxograma método otimizado e validado para extração de HPAs em amostras de sedimento.



Fonte: A autora.

### 3.6. COMPOSIÇÃO: TAMANHO DAS PARTÍCULAS

#### 3.6.1. Granulometria

Os testes granulométricos foram efetuados no intuito de se obter a composição da matriz em estudo. Após as amostras de sedimento serem liofilizadas, foram peneiradas em peneiras de aço inoxidável (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA,

Caieiras-SP) nas malhas 18, 250 e 500 mesh que correspondem a separação das seguintes frações: fração  $\leq 25$ ;  $25 >$  fração  $< 63$  e fração  $\geq 63$   $\mu\text{m}$ .

### 3.6.2. Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS)

DLS é técnica não invasiva e bem estabelecida para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região dos submicrométricos. A fração mais fina ( $\leq 63\mu\text{m}$ ) foi dispersa em água deionizada, disposta em cubeta e analisada no equipamento Zetasizer Nano ZN.

### 3.7. CARBONO ORGÂNICO TOTAL

As análises foram feitas pesando-se separadamente a fração fina de sedimento ( $\leq 63\mu\text{m}$ ) e a amostra total em vial de 20mL. À cada amostra adicionou-se 10 mL de água deionizada e misturadas por 30 segundos em vórtex. Após aguardar 24 horas acondicionadas a 5°C as amostras foram submetidas as análise de teor de carbono orgânico total no TOC-5000A Shimadzu catalizador de sensibilidade normal.

### 3.8. TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

O conhecimento da toxicidade no auxílio da avaliação da qualidade ambiental se faz cada vez mais necessário na complementação dos resultados das análises química. Esta é uma consequência da atual necessidade social perante a constante exposição aos contaminantes gerados pela atividade humana, seja ela industrial ou urbana. Os estudos de toxicidade tem como objetivo ampliar o entendimento das consequências da exposição a estes contaminantes, presente em matrizes ambientais, gerando dados dos possíveis impactos, não somente na flora como também na fauna dos pequenos organismos que habitam o local e se expõem continuamente. A toxicidade, segundo RODRIGUES (2005), é uma propriedade inerente a agentes tóxicos ou de alguns subprodutos moleculares, na qual reflete o potencial em causar efeitos danosos a diferentes organismos sob condições específicas de exposição. A toxicidade de um agente deve ser avaliada minuciosamente, pois o impacto ambiental dos contaminantes não depende somente das quantidades, mas também da susceptibilidade individual danosa aos seres vivos expostos.

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas (naturais ou sintéticas) nos ecossistemas e a sua ação nos organismos (LYNCH; WISEMAN; DE LEIJ; SIMON, 2001). A avaliação da toxicidade das substâncias presentes nos resíduos sólidos pode ser medida por meio de ensaios de fitotoxicidade, que é a ação tóxica ou reação adversa que uma substância presente no meio provoca nas plantas, a qual pode ser determinada observando a germinação das sementes, o alongamento da raiz e crescimento da muda (LABRE; SILVA; MILLIOLI; CARVALHO, 2008).

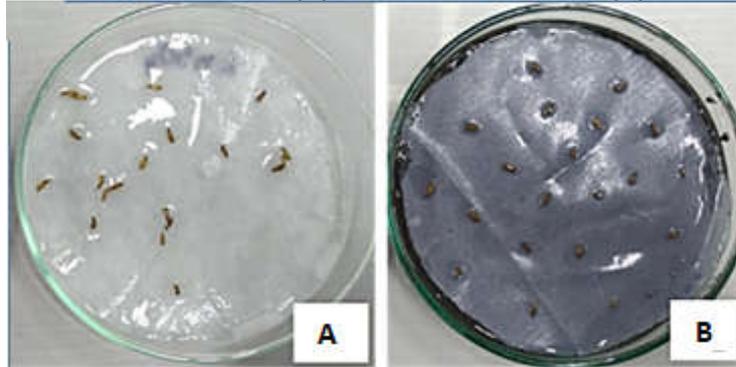
### 3.8.1. Teste com *Lactuca sativa*

Testes em que são utilizadas plantas superiores são considerados eficientes para a avaliação e monitoramento da toxicidade de poluentes e têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e sedimentos contaminados (FERNANDES et al., 2007; CZERNIAWSKA-KUSZA & KUSZA, 2011). Sua principal vantagem é a ampla variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, alongamento de raízes e aspectos bioquímicos, além de apresentar baixo custo e possibilidade de serem realizados continuamente (ŽALTAUSKAITĖ & ČYPAITĖ, 2008). A *Lactuca sativa* L. (alface) está entre os organismos-teste mais utilizados para avaliar a fitotoxicidade e a citogenotoxicidade de efluentes domésticos e industriais (ŽALTAUSKAITĖ & ČYPAITĖ, 2008; ANDRADE et al., 2010), sendo esta espécie recomendada por agências internacionais para tal finalidade.

Os ensaios foram conduzidos pela aluna de doutorado em Biologia Celular e Molecular Lais R. D. Sommaggio do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro. O bioensaio foi realizado com a variedade *Grand rapids* da marca Isla, com algumas modificações da metodologia proposta por SOBRERO E RONCO (2004). O teste de germinação foi realizado em placas de Petri contendo as amostras de sedimento (Figura 23B). Para os controles (Figura 23A) utilizou-se areia lavada e autoclavada como controle negativo (CN) e uma solução de sulfato de zinco 0,05 M como controle positivo (CP). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e em duplicata. Sobre as amostras de sedimento e tratamentos controles foram dispostas 20 sementes de alface. As placas de Petri contendo as

amostras foram colocadas em estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio no escuro, por 5 dias a 22 °C. Após este período se realizou uma contagem das sementes que germinaram.

**Figura 23.** Teste *Lactuca sativa* (A) controle, areia lavada (B) amostra de sedimento



Crédito das fotos: MSc. Ana Carolina Feitosa Cruz (UNESP-CLP)

### 3.8.2. Teste com *Tiburonella viscana*

Os testes foram realizados pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, do Instituto de Biociências, UNESP- Campus Litoral Paulista. As etapas experimentais estão descritas a seguir.

Os exemplares de *Tiburonella viscana* foram coletados no nível superior do infralitoral da Praia do Engenho D'Água, em Ilhabela, com auxílio de uma draga manual, desenvolvida especialmente para coleta de anfípodos. Após a coleta, os animais foram transferidos para frascos de polietileno contendo sedimento e água do mar do local, e transportados para o laboratório, dentro de caixas de isopor.

Após triagem e identificação dos indivíduos de *Tiburonella viscana* em estereomicroscópio, os animais foram aclimatados por 5 dias em tanques contendo água do mar filtrada e uma camada de 2 cm de sedimento controle, a  $25 \pm 2$  °C, com iluminação e aeração constantes, conforme orientações de MELO (1993) e ABNT (2016). O método utilizado na execução dos testes de toxicidade de sedimentos seguiu basicamente uma adaptação do protocolo descrito por MELO & ABESSA (2002) e ABNT (2016) para *Tiburinellaviscana*, o qual foi miniaturizado segundo USEPA (1994), KUBITZ et al. (1996) e SHIELDS et al. (1991).

Os testes foram conduzidos em frascos de polietileno de alta densidade com volume de 350 mL (Figura 24). Cerca de 24 horas antes do início de cada experimento, as amostras de sedimento foram homogeneizadas manualmente e as réplicas preparadas, em número de 4 por amostra testada; para algumas amostras, havia pouco volume de sedimento e nesses casos apenas 3 réplicas foram preparadas. Em cada uma foi introduzida uma camada de 1,5 cm ( $\cong$ 100 mL) de sedimento não peneirado e 200 mL de água do mar filtrada em elemento filtrante do tipo CUNO (0,1  $\mu$ m).

**Figura 24.** Teste ecotoxicológico com *Tiburinella viscana*



Crédito das fotos: MSc. Ana Carolina Feitosa Cruz (UNESP-CLP)

Parâmetros físico-químicos da água circundante nos frascos-teste contendo as amostras foram medidos antes e ao final do teste: a salinidade foi medida com auxílio de um refratômetro da marca ATAGO-S/Mill com precisão de 1 ‰; o pH foi medido por meio de pHâmetro Lutron modelo PH-206 (precisão de 0,01); o teor de oxigênio dissolvido foi por meio do oxímetro YSI modelo 550A (com precisão de 0,01 mg L<sup>-1</sup>); temperatura, com auxílio de um termômetro de mercúrio com precisão de 0,5 °C; e concentração de nitrogênio amoniacal, pelo método de titulação por colorimetria descrito por KOROLEFF (1970) e tem limite de detecção de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal total.

No dia seguinte, foram iniciados os testes. Cada réplica recebeu 5 indivíduos adultos saudáveis e de mesmo tamanho. De acordo com MELO (1993), são

considerados saudáveis os organismos que apresentam movimentação regular dos apêndices e do tubo digestivo, respondem a estímulos contraindo o corpo, não apresentam deformações ou anomalias morfológicas e se enterram num período de até uma hora após serem introduzidos nos frascos-teste. Não foram utilizadas fêmeas ovadas. Durante os experimentos os animais não foram alimentados e permaneceram sob aeração e iluminação constantes, e temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE

#### 4.1.1. GC-MS CP3800 Varian Saturn 2000

Na fase preliminar de testes de identificação foi utilizado solução padrão previamente adquirida. A solução padrão do fabricante Sigma Aldrich<sup>MR</sup> contém 13 HPAs (acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, fenantreno e pireno) com porcentagem de pureza > 97% para o pireno, >98% para o fluoreno, >99% para os demais, com concentração informada pelo fabricante de 500 µg mL<sup>-1</sup>, o padrão foi dissolvido em isoctano, obtendo ao final concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup> (solução estoque) que foi diluída em isoctano em balão volumétrico a uma concentração aproximada de 5 µg mL<sup>-1</sup> para cada HPA.

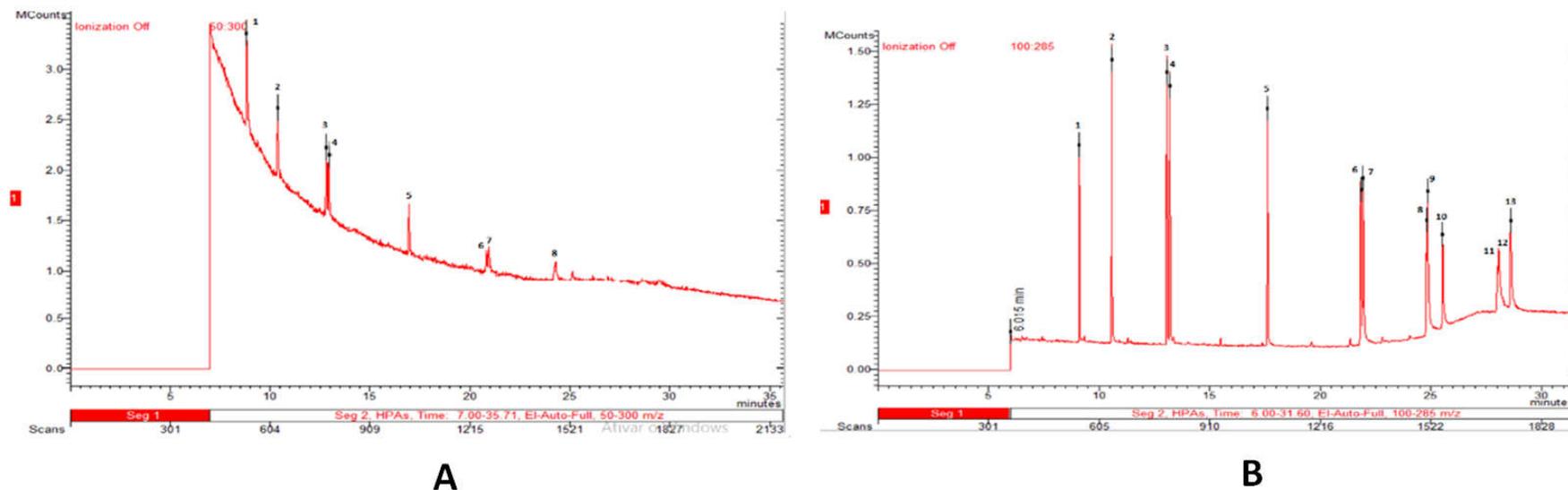
Após as primeiras injeções verificou-se que a linha de base não era adequada, apresentando ruído excessivo, prejudicando a análise das áreas dos picos referentes aos analitos. Ruído é todo o sinal apresentado no gráfico da análise que não possui como origem a amostra estudada.

Com o objetivo de melhorar a linha de base e diminuir o ruído optou-se por trocar o solvente do padrão e verificar qual a influência deste fator na análise. A solução padrão foi seca e ressuspensa em n-hexano com mesmo volume, não alterando a concentração.

O padrão dissolvido em n-hexano foi testado apresentando melhores resultados vistos na Figura 25. A linha de base na Figura 25A, referente a injeção do padrão em isoctano, apresenta ruído elevado, em 25B, referente ao padrão diluído em n-hexano, a linha de base se mostra mais estável e os sinais dos compostos podem ser observados de forma mais precisa.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

**Figura 25.** Cromatograma (GC-MS CP 3800, Varian Saturno 2000), obtido da análise de solução padrão mista de concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para cada HPA diluído em diferentes solventes: **(A)** solvente isoctano; **(B)** solvente n-hexano.



**LEGENDA:** 1-Acenaftileno, 2- Fluoreno, 3- Fenantreno, 4-Antraceno, 5- Pireno, 6- Benzo(a)antraceno, 7- Criseno, 8- Benzo(k)fluoranteno, 9- Benzo(b)fluoranteno , 10- Benzo(a)pireno, 11-Indeno(1,2,3-cd)pireno, 12-Dibenzo(a,h)antraceno, 13-Benzo(g,h,i)perileno

Após esta observação foi definido o solvente utilizado para a curva analítica e para a ressuspensão do extrato como sendo o n-hexano.

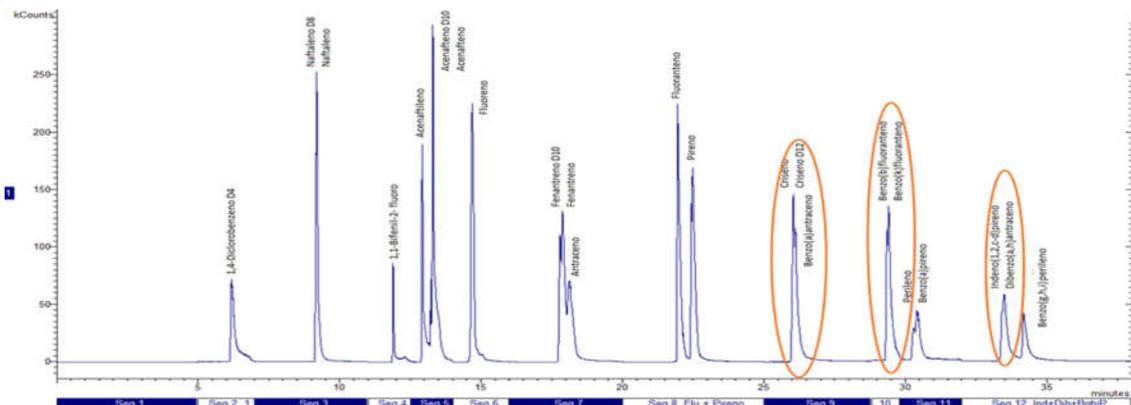
A continuidade do processo se dá pela otimização da separação dos compostos estudados, com o intuito de quantificá-los. Nesta etapa novo padrão foi utilizado da AccuStandard<sup>MR</sup> Z-014 G-R contendo 16 HPAs que foi preparado de acordo com o item 3.2.1 (pag. 82).

Foi testado alguns HPAs deuterados, o padrão deuterado utilizado para os testes foi o AccuStandard<sup>MR</sup> Z-014J Internal Standard de concentração 4,0mg mL<sup>-1</sup> em diclorometano, contendo acenafteno-d10; criseno-d12; 1,4-diclorobenzeno-d4, naftaleno-d8, perileno-d12 e fenantreno-d10. O padrão deuterado foi diluído em balão volumétrico (10,0 mL) previamente limpo e seco (SOLUÇÃO ESTOQUE A deuterado) concentração de 400 µg mL<sup>-1</sup> que foi novamente diluída em balão volumétrico de 10,0 mL (SOLUÇÃO ESTOQUE B deuterada) concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>.

Às soluções analisadas adicionou-se 50 µL da solução estoque B deuterado, obtendo a concentração de 2,0 µg mL<sup>-1</sup> no volume final de 1,0 mL.

As condições cromatográficas otimizadas para análise de HPAs por CG-MS estão apresentadas Tabela 10 (pag 84). Na Figura 26 podemos observar que os compostos de estruturas semelhantes não foram separados com boa resolução, o criseno e o benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno; indeno(1,2,3-cd)pireno e o dibenzo(a,h)antraceno.

**Figura 26.** Cromatograma (GC-MS, Varian CP 3800 MS 2000) solução padrão dos HPAs, a 5 µg mL<sup>-1</sup> e solução padrão deuterado a 2,0 µg mL<sup>-1</sup> modo scan, destaque para os compostos onde não houve total separação.



Os HPAs com estruturas similares são de difícil separação por cromatografia a gás, pois a fragmentação destes compostos também é similar, o que prejudica a sua identificação utilizando os respectivos íons majoritários.

A análise no modo SCAN da solução padrão e da solução dos padrões deuterados são mostradas na Figura 26, observamos que não houve separação entre os HPAs e os respectivos deuterados, pois co-eluem devido ao princípio da separação em cromatografia gasosa que é baseado na diferença das interações entre os compostos e a fase estacionária. Sabendo que os compostos deuterados possuem estruturas iguais aos não deuterados com exceção da substituição dos átomos de hidrogênio por deutério, conseqüentemente as interações com a fase estacionária serão iguais e a separação não ocorrerá, esta separação só é possível quando identificamos e selecionamos o íon majoritário de cada composto.

O modo Scan observado na Figura 26, é indicado para verificar a qualidade do método de separação, se há separação entre os picos dos analitos, caso seus analitos possuam fragmentação semelhante entre si, os íons escolhidos estarão interferindo na quantificação, para resolver este problema podemos selecionar o modo *Selected Ion Monitoring* (SIM) onde apenas os íons escolhidos são monitorados, podendo especificar no programa um ou vários íons a serem analisados. Para a escolha do íon quantificador devemos buscar por íons com duas características, "único" e "intenso" segundo BUSTILLOS, O. V. (2011).

Para o estudo de linearidade do método cromatográfico foi utilizada o modo SIM para cada composto desejado, uma solução estoque B descrita no item 3.2.1 (pag. 82) foi utilizada, cada diluição foi analisada em triplicata. Com os dados obtidos, construiu-se gráficos de linearidade e os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ), faixa de trabalho, LD e LQ estão sumarizados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Parâmetros obtidos do método otimizado e validado no equipamento GC-MS Varian CP 3800, valores em ng mL<sup>-1</sup>.

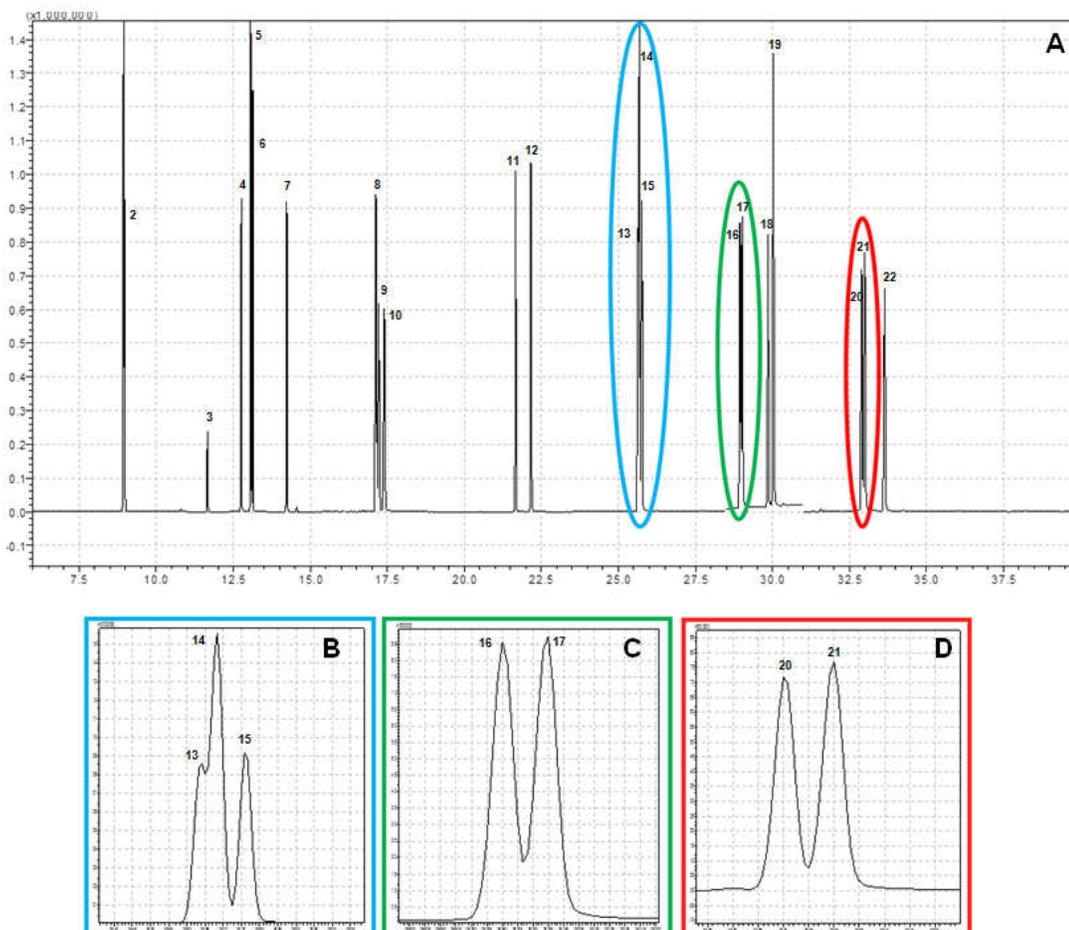
HPAs	Curva Analítica	CD	LD	LQ	Faixa de trabalho
Naftaleno	y= 111,65x + 4823,9	0,99	100	100	100-5000
Acenaftileno	y= 275,11x - 28864	0,99	200	200	200-5000
Acenafteno	y= 91,747x + 18070	0,94	200	300	300-5000
Fluoreno	y= 91,747x + 18070	0,97	200	200	200-5000
Fenantreno	y= 150,0x + 3684,3	0,99	100	100	100-5000
Antraceno	y= 182,24x + 6215,8	0,99	200	300	300-5000
Fluoranteno	y= 79,699x - 10359	0,99	100	100	100-5000
Pireno	y= 142,87x - 11572	0,99	200	300	300-5000
Benzo(a)anraceno	y= 72,615x - 86,088	0,99	200	200	200-1000
Criseno	y= 106,76x - 5763,5	0,97	100	100	100-1000
Benzo(b)fluoranteno	y= 298,21x - 85385	0,99	100	100	100-900
Benzo(k)fluoranteno	y= 30,661x - 2514,7	0,99	100	100	100-5000
Benzo(a)pireno	y= 98,687x - 29891	0,99	100	100	100-5000
Dibenzo(a,h)antraceno	Não foi possível a separação				
Benzo(g,h,i)perileno	y= 77,326x + 6086,7	0,99	100	100	100-5000
Indeno(1,2,3-cd)pireno	y= 56,109x - 9395,3	0,97	100	100	100-2000

LEGENDA: CD-Coeficiente de Determinação

#### 4.1.2. GC-MSQP 2020 Shimadzu

O sistema GC-MSQP 2020 SHIMADZU foi testado com solução padrão de HPAs obtida como descrito no item 3.2.1 (pag.82). O cromatograma da Figura 27 mostra a separação dos compostos de massas molares iguais ou semelhantes, que demonstraram pouca resolução nas análises com o sistema GC-MS CP3800 da Varian (Figura 27). Estão em destaque as separações do benzo(a)antraceno e do criseno (Figura 27B), benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno (Figura 27C) e indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno (Figura 27D).

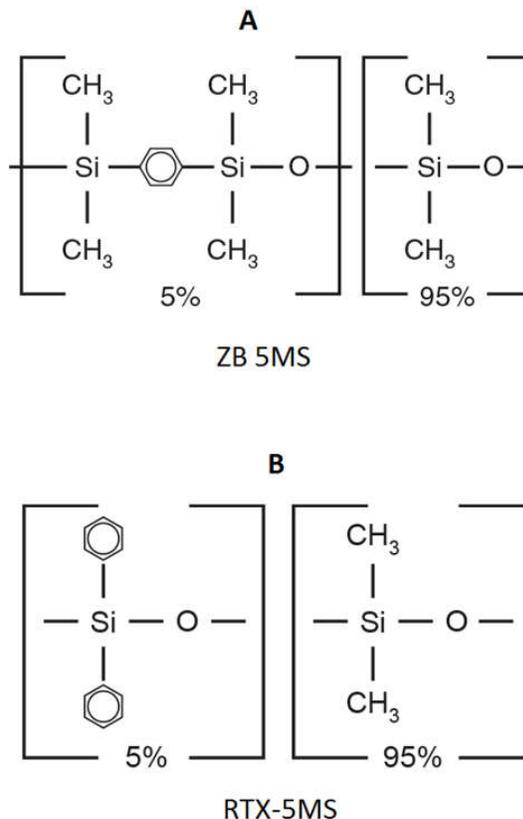
**Figura 27.** Cromatograma solução padrão 2,5 µg mL<sup>-1</sup> (GC-MSQP 2020 Shimadzu método descrito Tabela 10. **A)** cromatograma da aquisição modo SCAN; **B)** BaA+CriD10+Cri; **C)** BbF+BkF e **D)** Ind+Dib



**LEGENDA:** 1: Naf D8; 2:Naf; 3:PI; 4: Acen; 5: AceD10; 6: Ace; 7: Flu; 8: FenD10; 9: Fen; 10: Ant; 11: Fluor; 12: Pir; 13: BaA; 14: CriD10; 15: Cri; 16: BbF; 17: BkF; 18: BaP; 19: PerD12; 20: Ind; 21: Dib; 22: BghiP

A melhora da resolução é atribuída as diferentes colunas cromatográficas utilizadas, apesar de ambas serem indicadas para compostos semi voláteis como os HPAs, formadas por sílica fundida e possuírem 95% de dimetilpolissiloxano em sua composição (Figura 28) a coluna RTX-5MS (Figura 28B) possui anéis aromáticos (difenil) em suas cadeias laterais que melhoram a seletividade da separação de compostos como o benzo(b)fluoranteno e o benzo(k)fluoranteno. Informações do fabricante também corrobora essa afirmação.

**Figura 28.** Estruturas das fases estacionárias das colunas ZB-5MS (1,4-bis(dimetilsiloxi)fenileno dimetil polissiloxano) e RTX-5MS (difênil dimetil polissiloxano).



FONTE: [www.restek.com/en/technical-literature-library/articles/GC-column-cross-reference/](http://www.restek.com/en/technical-literature-library/articles/GC-column-cross-reference/)

Para o estudo da linearidade do método de separação e quantificação foram injetadas soluções padrão diluídas com concentrações de 5,0 a 2000 ng mL<sup>-1</sup>. De acordo com os limites e o coeficiente de determinação o método foi considerado adequado para as análises pretendidas, uma vez que os coeficientes apresentaram valores iguais a 0,99 e os limites de detecção e quantificação 5,0 ng mL<sup>-1</sup>. Os valores de limites e as curvas analítica podem ser observados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Valores obtidos no método de separação e quantificação por GC-MS SHIMADZU, concentrações em ng mL<sup>-1</sup>.

HPAs	Curva Analítica	CD	LD	LQ	Faixa de trabalho
<b>Naftaleno</b>	$y = 149,6x - 6435,1$	0,99	5,0	5,0	5,0-2000
<b>Acenaftileno</b>	$Y = 96,955x - 2170,1$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Acenafteno</b>	$y = 90,022x - 4533,4$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Fluoreno</b>	$y = 87,583x - 4699,6$	0,99	5,0	5,0	5,0-2000
<b>Fenantreno</b>	$y = 117,34x - 3486,5$	0,99	5,0	5,0	5,0-2000
<b>Antraceno</b>	$y = 107,4x - 3002,4$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Fluoranteno</b>	$y = 110,2x - 3092,2$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Pireno</b>	$y = 118,76x - 3513,6$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Benzo(a)anraceno</b>	$Y = 130,57x - 4298,6$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Criseno</b>	$y = 105,49x - 2988,6$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	$y = 122,11x - 3600,8$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	$y = 130,0x - 4535,0$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Benzo(a)pireno</b>	$y = 111,49x - 4823,6$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	$y = 127,96x - 4430,7$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Benzo(g,h,i)perileno</b>	$y = 115,73x - 3364,3$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300
<b>Indeno(1,2,3-cd)pireno</b>	$Y = 139,5x - 5568,5$	0,99	5,0	5,0	5,0-1300

LEGENDA: CD-Coeficiente de Determinação

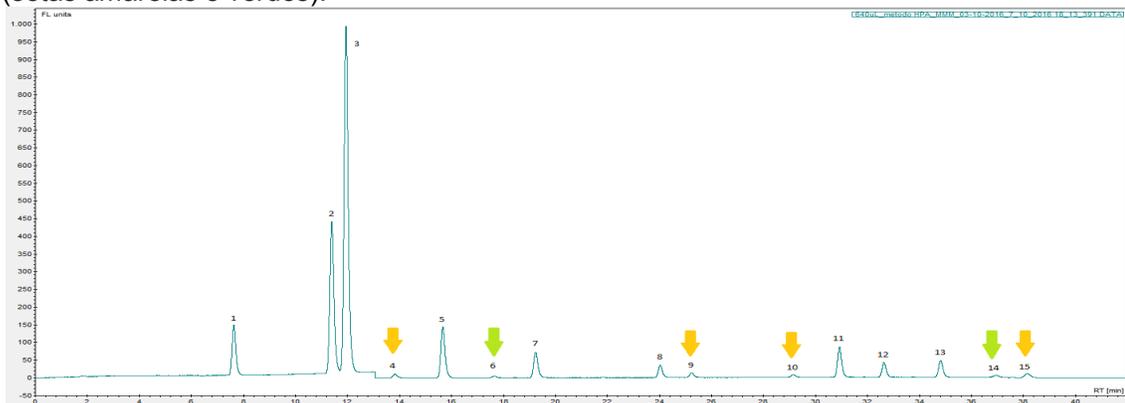
#### 4.1.3. HPLC- FLUVarian LC 920

O método analítico de quantificação dos HPAs utilizando cromatografia líquida, foi baseado em método desenvolvido neste grupo de pesquisa para análise de extrato de hortaliças (SUGAUARA, 2013). O método está descrito na Tabela 14 no item 3.2.3(pag. 89). O acenaftileno não foi quantificado nesta etapa do trabalho, pois

apresenta baixa fluorescência, sendo necessária uma concentração elevada e não aplicável às amostras em estudo.

Alguns dos compostos estudados na fase inicial, apresentaram baixo sinal de fluorescência, sendo insatisfatórios para estudos em amostras ambientais, entre estes compostos estão, fenantreno, criseno, benzo(b)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno em destaque setas amarela ( ↓ ) na Figura 29 e fluoranteno e benzo(ghi)perileno em destaque, setas verde ( ↓ ) na Figura 29, sinal bastante baixo muito próximo ao ruído.

**Figura 29.** Cromatograma obtido na análise em HPLC-FLU de solução mista de padrões de HPAs de concentrações 256 a 5,12 ng mL<sup>-1</sup> com destaque aos compostos de baixa resposta (setas amarelas e verdes).

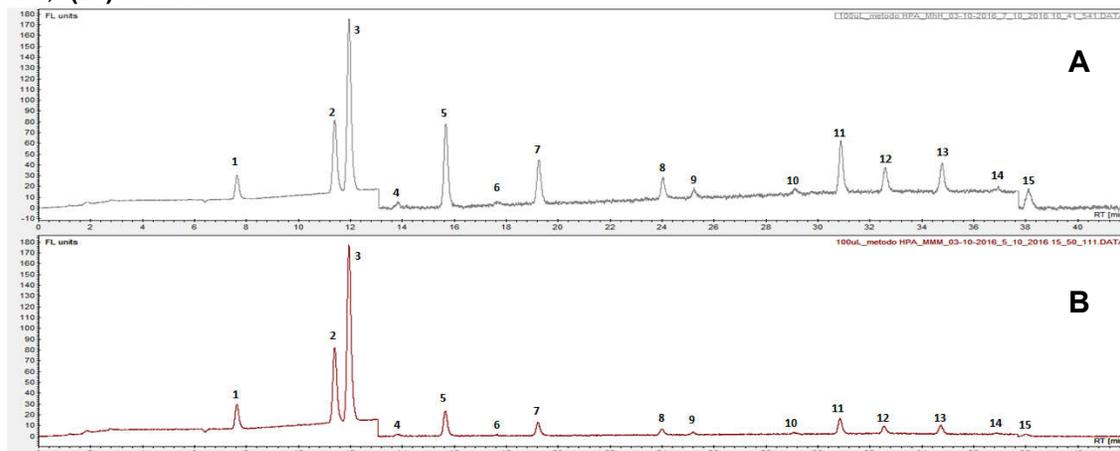


**LEGENDA:** 1: Naf; 1: Ace; 3: Flu; 4: Fen; 5: Ant; 6: Fluo; 7: Pir; 8: BaA; 9: Cri; 10: BbF; 11: BkF; 12: BaP; 13: Dib; 14: BghiP; 15: Ind

Com intuito de se obter valores de limites comparáveis aos encontrados na literatura, na faixa de ng mL<sup>-1</sup>, alterou-se algumas configurações no sistema de detecção do PMT (*Photomultiplier Tube*).

Os PMTs são responsáveis pela amplificação do sinal que ocorre devido a mudança de tensão nos *dynodes*. No HPLC-FLU utilizado, é possível escolher cinco modos de operação do PMT, denominadas "muito baixa, baixa, média, alta e muito alta". Avaliando-se as condições "alta" Figura 30A e "média", Figura 30B, foi possível notar que houve aumento do sinal, o que era desejado, no entanto, o ruído também aumentou.

**Figura 30.** Cromatogramas HPLC-FLU obtidos na análise da mistura de padrões de HPAs (concentração 0,8~40,0 ng mL<sup>-1</sup>) com a utilização de diferentes intensidades de PMT; **(A)** alta; **(B)** média.



**LEGENDA:** 1: Naf; 1: Ace; 3: Flu; 4: Fen; 5: Ant; 6: Fluó; 7: Pir; 8: BaA; 9: Cri; 10: BbF; 11: BkF; 12: BaP; 13: Dib; 14: BghiP; 15: Ind

Observou-se após os cálculos de novos limites que o aumento do sinal obtido com essa modificação não era favorável. Apesar do considerável aumento no sinal dos compostos o ruído também obteve aumento significativo não mostrando comportamento linear. Desta maneira, optou-se por utilizar a condição “média” para o PMT em todo o tempo de análise e iniciou-se o estudo de melhores comprimentos de onda de excitação e emissão para os compostos com baixa resposta.

Para melhorar a intensidade do sinal e a sensibilidade do método, vários comprimentos de onda individuais e em grupo foram testados, adicionou-se intervalos separados para cada HPAs ou para um conjunto de HPAs com tempo de retenção próximo e melhores comprimentos de onda de excitação e emissão. Os 3 intervalos de comprimento de onda do método inicial e os 9 intervalos do método final podem ser observados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Comprimentos de onda do método inicial e do método final com PMT fixo em médio.

Tempo (min)	Método inicial		Método final	
	$\Lambda_{\text{excitação}}$	$\Lambda_{\text{emissão}}$	$\Lambda_{\text{excitação}}$	$\Lambda_{\text{emissão}}$
0,0	260	320	275	325
13,0	240	398	252	370
15,0	-	-	240	398
17,0	-	-	290	460
18,5	-	-	240	389
24,5	-	-	260	380
27,0	-	-	369	446
30,0	-	-	290	430
35,5	-	-	300	419
37,6	300	466	302	503

**LEGENDA:**

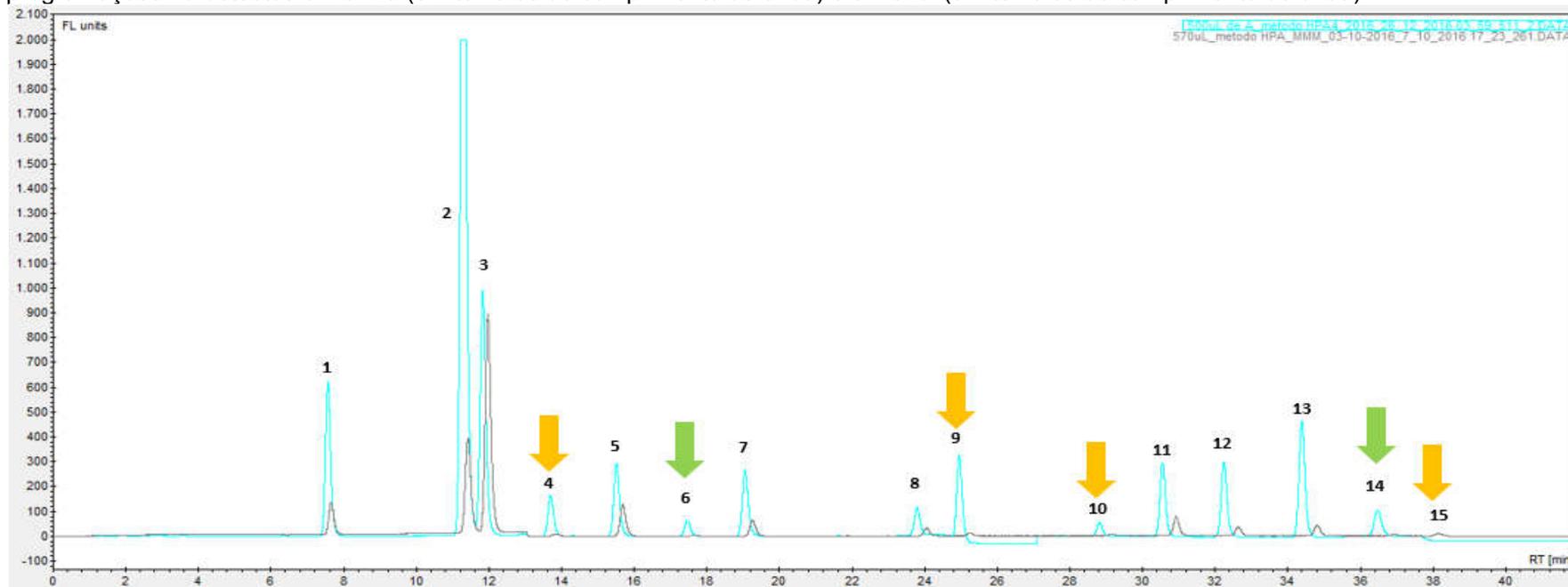
- sem alteração do comprimento de onda

Na Figura 31, pode-se observar que o novo método com 9 intervalos de comprimento de onda (cromatograma em azul), apresentou melhora no sinal de todos os compostos quando comparado ao método inicial de 3 intervalos (cromatograma cinza) principalmente os compostos que não mostraram sinais suficientemente altos para que houvesse a diferenciação com o ruído em destaque com setas amarelas na Figura 31, pico 4 (fenantreno), 9 (criseno), 10 (benzo(f)fluoranteno) e 15 (indeno(1,2,3-cd)pireno).

Os picos em destaque (Figura 31 em azul), setas verdes, 6 e 14 referentes ao fluoreno e benzo(g,h,i)perileno respectivamente apresentaram sinal analítico que pode ser diferenciado do ruído, o que não ocorreu quando aplicado o método com apenas 3 intervalos de comprimentos de onda (cromatograma cinza Figura 31).

Os demais picos da Figura 31 que não foram destacados também apresentaram melhora do sinal analítica quando comparados os dois métodos descritos na Tabela 22.

**Figura 31.** Cromatogramas HPLC-FLU referentes as análises de solução padrão de concentração 4,56 a 228 ng mL<sup>-1</sup> com diferentes programações no detectores em cinza (3 intervalos de comprimento de onda) e em azul (9 intervalos de comprimento de onda).



**LEGENDA:**1: Naf; 1: Ace; 3: Flu; 4: Fen; 5: Ant; 6: Fluor; 7: Pir; 8: BaA; 9: Cri; 10: BbF; 11: BkF; 12: BaP; 13: Dib; 14: BghiP; 15: Ind

Com os pontos pertencentes a faixa linear estabeleceram-se a faixa de trabalho, curva analítica para cada HPA e coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Os valores de todos estes parâmetros estão apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23.** Parâmetros das curvas analíticas obtidas para HPAs, determinados por HPLC-FLU, concentrações em  $\text{ng mL}^{-1}$

HPAs	Curva Analítica	CD	LD	LQ	Faixa de trabalho
Naftaleno	$y = 0,3556x + 0,1687$	0,99	4,0	8,0	8,0-340
Acenafteno	$y = 1,06x + 0,4638$	0,99	8,0	16,0	16,0-294
Fluoreno	$y = 3,8171x + 1,0214$	0,99	3,2	5,2	5,2-68,0
Fenantreno	$y = 1,2464x + 0,2304$	0,99	1,0	1,3	1,3-27,2
Antraceno	$y = 5,3622x + 0,1295$	0,99	0,8	1,0	1,0-13,6
Fluoranteno	$y = 0,4577x + 0,1051$	0,99	2,6	3,2	3,2-34,0
Pireno	$y = 0,7028x + 0,5051$	0,99	4,0	5,2	5,2-4,1
Benzo(a)anraceno	$y = 0,6409x + 0,1944$	0,99	2,6	3,2	3,2-34,0
Criseno	$y = 2,119x + 0,4637$	0,99	0,4	0,8	0,8-34,0
Benzo(b)fluoranteno	$y = 0,9903x + 0,078$	0,99	0,3	0,5	0,5-13,6
Benzo(k)fluoranteno	$y = 5,4285x + 0,3703$	0,99	0,3	0,5	0,5-13,6
Benzo(a)pireno	$y = 1,94x + 0,4227$	0,99	1,6	2,0	2,0-34,0
Dibenzo(a,h)antraceno	$y = 0,8126x + 0,3666$	0,99	1,6	3,2	3,2-136
Benzo(g,h,i)perileno	$y = 0,5329x + 0,036$	0,99	3,2	4,2	4,2-54,5
Indeno(1,2,3-cd)pireno	$y = 0,3531x + 0,0004$	0,99	2,0	2,5	2,5-34,0

LEGENDA: CD-Coeficiente de Determinação

## 4.2. MÉTODO DE EXTRAÇÃO

A extração do analito é a etapa mais importante do processo de preparo de amostra que pode incluir outras etapas como, pré tratamento, limpeza da amostra (*clean up*), enriquecimento do analito e derivatização, dependendo da complexidade da matriz, compatibilidade do método instrumental disponível, forma que o analito se encontra na matriz, dentre outras.

Para delinear como serão os testes para otimização da extração do analito, o estudo do analito e da matriz são essenciais. Conhecer a dinâmica entre eles, afinidades, tempo de vida e as diferentes maneiras encontradas na literatura de se efetuar a extração da forma mais eficiente e representativa possível.

### 4.2.1. Testes Preliminares

Os métodos de extração foram escolhidos de acordo com o que já se conhecia da eficiência do ultrassom quando aplicado em material vegetal (SUGAUARA, 2013), presumindo que não há muitas diferenças entre as hortaliças e a *Spartina alterniflora*. Iniciou-se os testes verificando a eficiência do método em extrair HPAs em *Spartina alterniflora* e sedimento. Caso a eficiência se confirmasse os testes para otimização seriam iniciados. Se a eficiência não fosse comprovada outros métodos seriam investigados.

#### 4.2.1.1. TESTE da eficiência de extração de HPAs em amostras de *Spartina alterniflora* e sedimento pelo método de ultrassom

Devido ao alto teor de matéria orgânica no sedimento, foi necessário a utilização de solvente mais polar, ou mistura de solventes com maior polaridade, acetona:diclorometano (1:1) resultando em maior poder de extração necessário para que a quebra da interação entre analito e matéria orgânica da matriz fosse possível.

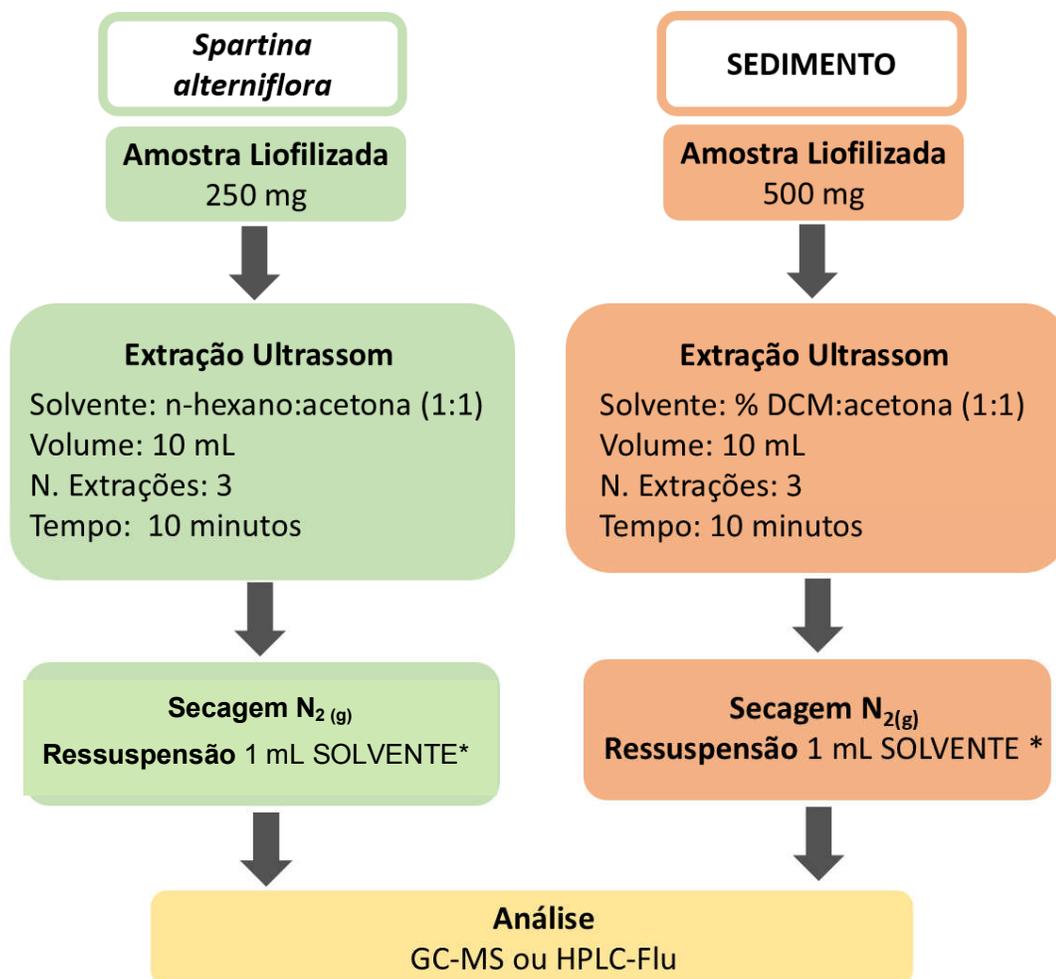
Amostras de sedimento e *Spartina alterniflora* em duplicata foram pesadas (500 mg e 250 mg, respectivamente) e fortificadas com solução padrão preparada de acordo com o descrito na seção 3.2.3 (Tabela 12, pag 86). A concentração final em cada matriz pode ser observada na Tabela 24.

**Tabela 24.** Valores de concentrações nas matrizes estudadas, após a fortificação e no extrato obtido após o processo explicitado na figura 32 (pag 118)

HPAs	Concentração no extrato obtido ng mL <sup>-1</sup>	Concentração nas amostras fortificadas (ng g <sup>-1</sup> )	
		<i>Spartina alterniflora</i>	Sedimento
Naftaleno	20	80	40
Acenafteno	40	160	80
Fluoreno	4,0	16	8,0
Fenantreno	1,6	6,4	3,2
Antraceno	0,8	3,2	1,6
Fluoranteno	2,0	8,0	4,0
Pireno	4,0	16	8,0
Benzo(a)antraceno	2,0	8,0	4,0
Ciseno	2,0	8,0	4,0
Benzo(b)fluoranteno	0,8	3,2	1,6
Benzo(k)fluoranteno	0,8	3,2	1,6
Benzo(a)pireno	2,0	8,0	4,0
Dibenzo(ah)antraceno	8,0	32	16
Benzo(ghi)perileno	3,2	12,8	6,4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2,0	8,0	4,0

O processo de extração diferenciou-se apenas pela mistura de solvente extrator, os demais parâmetros foram mantidos de acordo com o observado na Figura 32.

**Figura 32.** Teste de eficiência do método de extração de HPAs por ultrassom em amostras de sedimento e *Spartina alterniflora*



\*n-hexano para GC-MS e acetonitrila para HPLC-FLU

Fonte: A autora

Os extratos em acetonitrila foram analisados em HPLC com detector de fluorescência (VARIAN LC920) de acordo com o método detalhado na Tabela 13 pag. 87 com as modificações dos comprimentos de onda mostrados na Tabela 22 pag. 113. Os resultados de recuperação estão sumarizados na Tabela 25, em destaque na cor vermelha os valores fora do intervalo aceitável preconizado pela ANVISA, recuperações entre 70 e 120% e coeficiente de variação menor que 20%.

**Tabela 25.** Recuperação e CV, em porcentagem, dos HPAs em amostras fortificadas de sedimento e *Spartina alterniflora*. Análise por HPLC-FLU (n=2)

HPAs	SEDIMENTO	CV	<i>Spartina alterniflora</i>	CV
Naftaleno	44	119	12	18
Acenafteno	25	144	38	232
Fluoreno	155	92	102	230
Fenantreno	93	28	64	20
Antraceno	52	22	68	35
Fluoranteno	121	27	92	8
Pireno	109	22	103	26
Benzo(a)antraceno	106	45	101	10
Criseno	105	17	82	24
Benzo(b)fluoranteno	-8	20	91	5
Benzo(k)fluoranteno	64	20	70	18
Benzo(a)pireno	98	19	79	16
Dibenzo(a,h)antraceno	57	10	83	26
Benzo(g,h,i)pireno	-52	6	85	6
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-4	1	40	1

LEGENDA: número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA

A recuperação dos HPAs nas duas matrizes, sedimento e *Spartina alterniflora*, foram menores de 50%. Além da baixa recuperação os dados apontam alta variabilidade demonstrado pelos altos valores de coeficiente de variação (CV>20%). Para o naftaleno e acenafteno, foram observados os valores mais discrepantes, de recuperação 44; 25% e 12; 38% respectivamente em sedimento e *Spartina alterniflora* e CV, 119, 144% e 18 e 232% respectivamente, que pode ser explicado e até esperado por possuírem as maiores pressões de vapor, favorecendo a volatilização. Desta observação surgiu a necessidade de investigar em qual etapa poderíamos estar perdendo os HPAs mais voláteis.

As etapas possíveis de ocorrer perdas, são as etapas de acondicionamento e etapa de secagem do solvente da solução padrão usada na fortificação.

Para o sedimento, que apresentou baixa recuperação e altos valores de CV, optou-se por investigar outros métodos observados na literatura.

#### **4.2.1.2. TESTE ETAPA DE SECAGEM influência da utilização de fluxo de nitrogênio na etapa de secagem, em amostras de *Spartina alterniflora* (HPLC-FLU)**

Para verificar se as baixas de concentrações dos HPAs recuperados anteriormente estão relacionadas com perdas durante o processo de secagem do solvente da solução padrão na etapa de fortificação, optou-se por efetuar um experimento de secagem do solvente sob fluxo de nitrogênio e sob condições normais onde só o fluxo de ventilação da capela age. As amostras de *Spartina alterniflora* foram pesadas e fortificadas da mesma forma que o descrito em 3.3.1 (pag. 88).

Quatro amostras do material vegetal foram fortificadas, duas replicatas foram submetidas a secagem sob fluxo de nitrogênio; as duas outras replicatas foram deixadas em frasco aberto, na capela com o fluxo de exaustão ligado. O processo de secagem foi considerado completo quando, visualmente, não era possível ver o solvente na amostra. O tempo de secagem foi de 1 hora sob fluxo de  $N_{2(g)}$  e de 15 horas para a secagem natural, na capela.

Para obtenção do branco, adicionou-se solvente (acetonitrila) a quatro amostras do material vegetal, sendo o mesmo volume utilizado para o padrão nas amostras fortificadas. Duas replicatas de branco foram submetidas a secagem sob fluxo de  $N_{2(g)}$ , e as outras duas foram secas naturalmente na capela. Os brancos acompanharam as amostras fortificadas no processo de secagem. Para comparação foi exposto a mesma alíquota de padrão em vial âmbar juntamente com as amostras de matrizes fortificadas. Totalizando 9 experimentos, 4 *Spartina alterniflora* para secagem sob fluxo de  $N_{2(g)}$  (2 fortificadas + 2 branco); 4 *Spartina alterniflora* para secagem na capela (2 fortificadas + 2 branco) e 1 apenas contendo o a alíquota de solução padrão.

Após o processo de secagem, aguardou-se 24 horas e as amostras foram submetidas ao processo de extração dos HPAs de acordo com o descrito na Figura 32 (pag. 118). Os resultados de recuperação e os coeficientes de variação podem ser observados na Tabela 26.

**Tabela 26.** Recuperação e CV (n= 2 ), em porcentagem, na avaliação da influência da estratégia de secagem das amostras

HPAs	Secagem com N <sub>2</sub>		Secagem ao ar (capela)	
	REC	CV(%)	REC	CV(%)
Naftaleno	nq	-	9	65
Acenafteno	9	84	nq	-
Fluoreno	33	51	nq	-
Fenantreno	77	13	9	27
Antraceno	71	7	1	33
Fluoranteno	83	9	81	2
Pireno	90	5	56	2
Benzo(a)anraceno	100	nc	74	1
Criseno	88	6	86	2
Benzo(b)fluoranteno	96	2	102	2
Benzo(k)fluoranteno	95	2	88	1
Benzo(a)pireno	91	5	57	nc
Indeno(1,2,3-cd)pireno	89	4	80	1
Dibenzo(a,h)antraceno	93	4	89	nc
Benzo(g,h,i)perileno	92	6	88	1

**LEGENDA:**

REC: recuperação

número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA

nq: não quantificável

nc: não calculado (dados insuficientes)

Observou-se que ambos os métodos de secagem podem ocasionar perdas de alguns compostos, sendo o método de secagem em nitrogênio o que proporciona menores perdas de HPAs e valores de CV na faixa considerada aceitável ( $CV < 20\%$ ). O padrão que foi exposto da mesma maneira que as amostras fortificadas, para fins de comparação, também apresentou grande perda, maior ainda que os apresentados no experimentos anterior. Esta perda pode ser explicada pela ausência de uma superfície que tenha afinidade com os compostos estudados, o que dificultaria a volatilização, fazendo com que esta ocorresse mais lentamente, mostrando que a volatilização dos compostos é um processo presente e que a perda de HPAs ocorre nesta etapa. A partir dessas observações foi decidido que as amostras seriam fortificadas com o menor volume possível de padrão e não seriam secas após a fortificação, seriam homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e depois de no mínimo 24 horas, poderiam ser submetidas ao processo de extração.

### **4.2.1.3. TESTE da influência da temperatura de acondicionamento na etapa de fortificação (*Spartina alterniflora* e sedimento)**

Com o intuito de investigar as baixas recuperações apresentadas na Tabela 26, principalmente dos compostos mais voláteis de menor massa molar, foi conduzido o teste de acondicionamento das amostras. As amostras foram pesadas, 250 mg de *Spartina alterniflora* e 500 mg de sedimento e fortificados com solução de padrões de acordo com a Tabela 27.

**Tabela 27.** Concentrações nominais para as amostras fortificadas e nos extratos obtidos, de acordo com a Figura 32 (pag. 118)

HPAs	Concentração do extrato obtido (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentração das amostras fortificadas (ng g <sup>-1</sup> )	
		<i>Spartina alterniflora</i>	Sedimento
Naftaleno	20	80	40
Acenafteno	40	160	80
Fluoreno	4,0	16	8,0
Fenantreno	1,6	6,4	3,2
Antraceno	0,8	3,2	1,6
Fluoranteno	2,0	8,0	4,0
Pireno	4,0	16	8,0
Benzo(a)antraceno	2,0	8,0	4,0
Ciseno	2,0	8,0	4,0
Benzo(b)fluoranteno	0,8	3,2	1,6
Benzo(k)fluoranteno	0,8	3,2	1,6
Benzo(a)pireno	2,0	8,0	4,0
Dibenzo(ah)antraceno	8,0	32	16
Benzo(ghi)perileno	3,2	12,8	6,4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2,0	8,0	4,0

O solvente do padrão foi seco em fluxo de N<sub>2(g)</sub>, as matrizes fortificadas em duplicata e as amostras do branco, também em duplicata foram acondicionadas em temperatura ambiente 25°C, sob refrigeração a 5°C e em freezer a -20°C.

As amostras fortificadas foram extraídas de acordo com a Figura 28. Os resultados de recuperação estão sumarizados a seguir na Tabela 28, os valores que não atendem as especificação da ANVISA de intervalo de recuperação de 70-120% e CV abaixo de 20% estão destacados em vermelho.

**Tabela 28.** Recuperações em porcentagem no teste de acondicionamento das amostras em diferentes temperaturas. n=2

HPAs	Sedimento						<i>Spartina alterniflora</i>					
	-20°C		5°C		25°C		-20°C		5°C		25°C	
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
<b>Naftaleno</b>	<b>0</b>	<b>83</b>	<b>8</b>	<b>101</b>	<b>10</b>	<b>69</b>	<b>34</b>	<b>77</b>	<b>17</b>	<b>65</b>	<b>25</b>	<b>75</b>
Acenaftileno	15	6	16	53	46	6	82	7	67	9	86	6
Acenafteno	20	2	36	47	52	7	81	7	67	8	85	6
Fluoreno	42	8	46	35	61	8	84	5	72	5	91	3
Antraceno	61	8	55	24	63	19	90	5	79	4	96	2
Fenantreno	56	8	38	24	61	9	92	7	78	4	97	2
Fluoranteno	68	9	59	17	62	10	84	4	69	5	87	2
Pireno	69	8	59	17	64	10	85	5	69	4	88	2
Benzo(a)antraceno	94	7	69	26	86	12	134	4	117	5	144	5
Ciseno	77	35	70	22	76	9	103	4	89	6	109	5
Benzo(b)fluoranteno	67	7	52	17	57	6	119	6	104	5	120	7
Banzo(k)fluoranteno	69	6	60	18	67	6	102	3	88	3	104	2
Benzo(a)pireno	63	8	41	16	56	7	114	6	100	5	114	4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	70	8	42	24	42	9	287	6	-	-	290	6
Dibenzo(ah)antraceno	74	16	45	29	47	12	223	5	185	7	217	7
Benzo(ghi)perileno	31	50	34	77	45	16	17	65	42	11	25	75

LEGENDA: número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA

Nas amostras de sedimento observou-se baixa recuperação para o naftaleno, acenafteno e acenaftileno em todas as temperaturas testadas, esse resultado pode ser explicado pela alta volatilidade destes compostos. Em baixas temperaturas (-20°C) observou-se boas recuperações (entre 60 e 120%) e valores de coeficientes

de variação abaixo de 20% para os compostos de maior massa molar, com exceção do benzo(ghi)perileno.

Em temperaturas de acondicionamento de 5 °C e 25°C verificamos baixas recuperações, também para os compostos de alta massa molar como o benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno. A etapa de fortificação consiste em replicarmos de maneira grosseira a interação analito-matriz que ocorre naturalmente na natureza, para posteriormente verificar a eficiência do processo de extração. O resultado de baixas recuperações de HPAs de massa molar elevada pode ser atribuído a ineficiência do método de extração testado frente a maior interação analito-matriz favorecida em temperaturas de acondicionamento menos elevadas. No sedimento a temperatura que apresentou piores resultados de recuperação foi a temperatura testada de 5°C, seguida da temperatura ambiente 25°C. Nas amostras de *Spartina alterniflora* observamos o mesmo desempenho para o naftaleno obtido em amostras de sedimento, mostrando que este comportamento pode ser atribuído a alta volatilidade do composto. Para os demais compostos do acenaftileno até o benzo(a)pireno, com exceção do benzo(a)antraceno, observou-se valores de recuperação e CV satisfatórios para um método de extração, neste nível de concentração. Para as amostras de *Spartina alterniflora* com exceção do naftaleno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(ghi)perileno, foram obtidos valores de recuperação e de CV adequados para um método de extração em amostras ambientais.

Os resultados apresentados mostram que o método precisa de ajustes para ser aplicado e que a melhor temperatura de acondicionamento, segundo os dados de recuperação é a de -20°C. Esta conclusão somente é atribuída as amostras de sedimento pois as amostras de *Spartina alterniflora* não apresentaram diferença significativa entre as temperaturas de acondicionamento testadas. Para saber se há diferença estatística entre as temperaturas de acondicionamento, ou grupos de teste, os gráficos (Figuras 33 e 34) foram plotados com as médias das amostras e os intervalos de confiança (IC), com nível de confiabilidade de 0,05.

Os IC possibilitam a comparação dos resultados experimentais do teste de temperaturas de acondicionamento, com significância estatística. Se houver sobreposição dos intervalos de confiança dos 3 experimentos conduzidos em

temperaturas diferentes para o mesmo HPA, significa que não há diferença estatisticamente significativa entre eles, ou seja, as amostras acondicionadas à -20 °C, 5 °C e 25 °C apresentam resultados semelhantes.

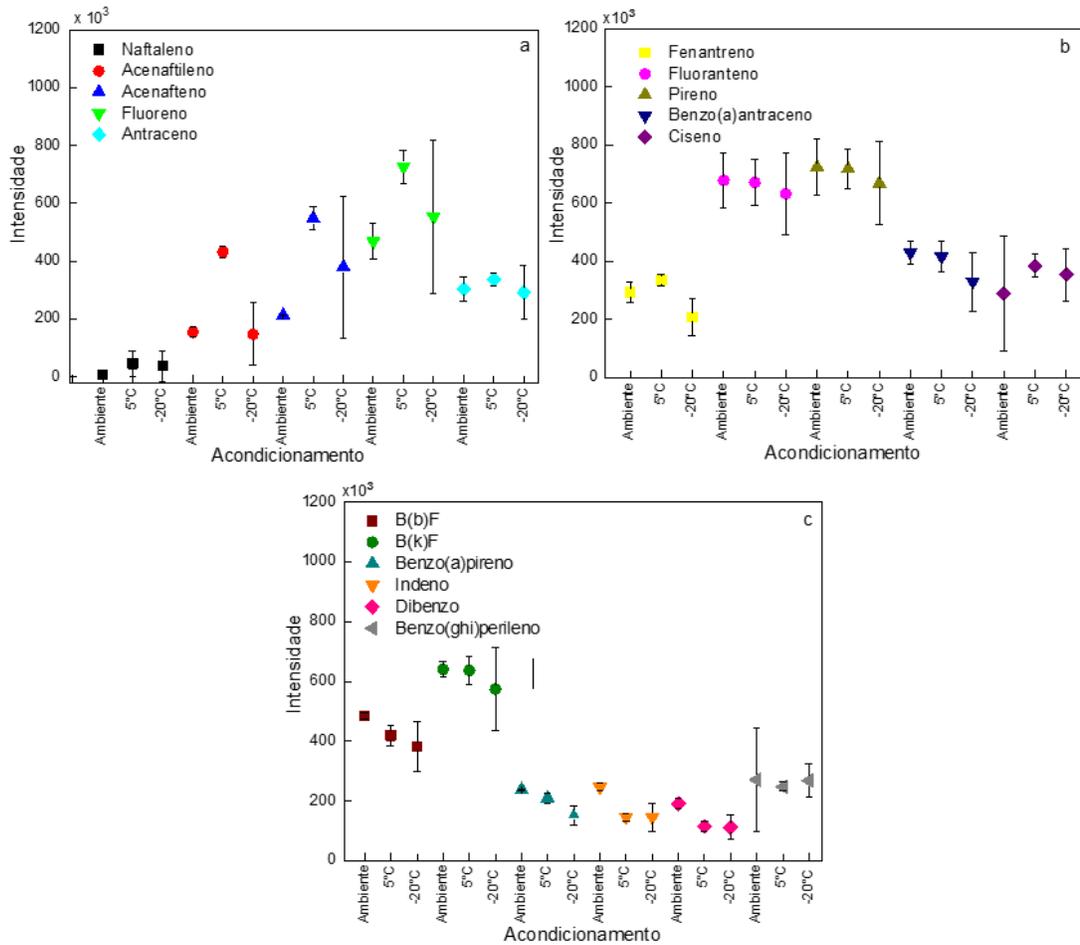
O intervalos de confiança foi calculado de acordo com a equação 4.

$$\text{Equação 4: } IC = \bar{X} \pm z \frac{s}{\sqrt{n}}$$

onde:

- X : média das amostras,
- z : nível de confiabilidade,
- s : desvio padrão e
- n : tamanho da amostra.

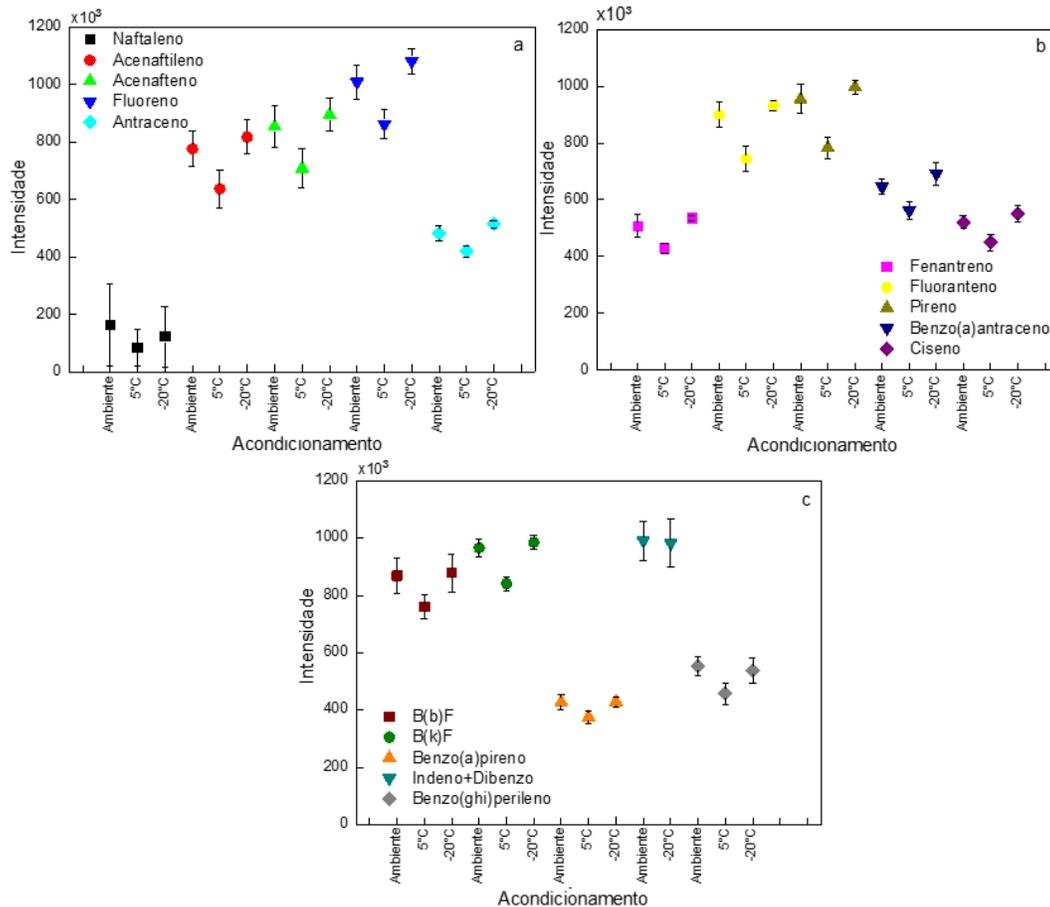
**Figura 33.** Comparativo entre os intervalos de confiança das recuperações do teste de diferentes temperaturas de acondicionamento para amostras de sedimento.



Verificou-se no gráfico da Figura 34 a influência da temperatura de acondicionamento em amostras fortificadas, que as amostras fortificadas

acondicionadas à temperaturas de 25 e 5 °C pertencem a grupos estatisticamente diferentes, mas ambos se encontram no mesmo grupo de -20°C, ou seja, possuem diferença significativa entre eles (25 e 5 °C) mas não há diferença quando comparamos cada um separadamente com o grupo de -20°C. Esta comparação se aplica ao naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno. Comportamento diferente se observou para o criseno e para o benzo(g,h,i)perileno, o acondicionamento a 5°C não mostrou diferença para as amostras acondicionadas à -20°C e ambos se encontram dentro do intervalo de confiança das amostras acondicionadas à 25°C. Não há diferença estatística entre os 3 grupos acondicionados em diferentes temperaturas, para os dois compostos. O indeno(1,2,3-cd)pireno e o dibenzo(a,h)antraceno apresentaram mesmo comportamento, diferença apenas para o acondicionamento a 25°C. Para o benzo(a)pireno observou-se diferença estatística para todos os três grupos testados.

**Figura 34.** Comparativo entre as temperaturas de acondicionamento para amostras de *Spartina alterniflora*



Em amostras de *Spartina alterniflora*, acondicionadas em diferentes temperaturas, observamos para todos os HPAs, valores de IC menores para a temperatura de 5 °C, sendo essa medida estatisticamente diferente das demais para quase todos os HPAs, com exceção do naftaleno e do ind+dib que não possuem as 3 medidas. Para a grande maioria dos HPAs não foi observado diferença significativa entre as temperaturas de acondicionamento de 25 °C e -20 °C.

Para sedimento, concluiu-se que a melhor temperatura de acondicionamento é a menor temperatura (-20°C), apesar de não mostrar diferenças significativas quando comparamos os IC deste grupo com os grupos acondicionados à 5 e 25 °C, foi o grupo que apresentou melhores recuperações.

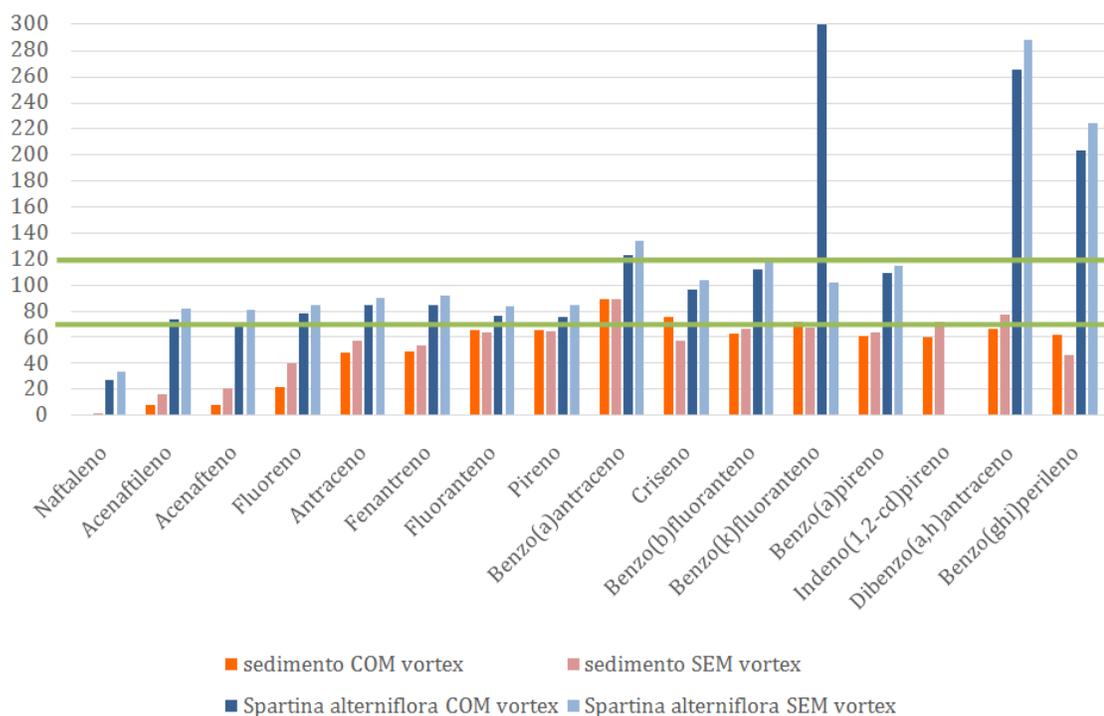
Para a *Spartina alterniflora* a mesma temperatura seria aplicada, de -20 °C, apesar de observarmos que há diferença significativa entre as temperaturas de acondicionamento, a Tabela 28 (pag 125) mostrou valores de recuperação entre 81 e 134% para 15 dos 16 HPAs analisados e CV abaixo de 20% para 14 HPAs, sendo exceções apenas o naftaleno e o benzo(g,h,i)perileno que apresentaram valores de 65 e 77% respectivamente.

#### **4.2.1.4. TESTE influência do uso de vórtex durante a extração de HPAs em amostras de sedimento e *Spartina alterniflora* (GC-MS Varian)**

Investigou-se durante o processo de extração a utilização de vórtex que pode potencializar a dispersão do solvente extrator, resultando em aumento da eficiência durante o processo. As amostras foram fortificadas da mesma maneira que a descrita no item 3.1.1 (pag. 88), acondicionadas em freezer (-20 °C) e extraídas após mínimo de 24 horas. Amostras do branco foram testadas e os valores encontrados de concentração de HPAs descontados.

Na Figura 35 observamos o resultado de recuperação das amostras de sedimento e *Spartina alterniflora*, com e sem o uso de vórtex. A faixa verde indica a região de recuperação ideal para o método, de 70 a 120% de recuperação.

**Figura 35.** Porcentagem de recuperação dos HPAs em amostras de *Spartina alterniflora* e sedimento, extraídos com e sem o uso de vórtex.



Observando o gráfico de forma geral, nota-se que as amostras de *Spartina alterniflora* (coloração azul) apresentam valores mais altos de recuperação quando comparamos com os valores do sedimento em alaranjado, para os métodos com e sem utilização de vórtex.

Ao analisarmos as extrações de HPAs apenas em *Spartina alterniflora*, observa-se boa recuperação (intervalo em verde) entre os compostos acenaftileno e pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno, sendo exceções os resultados apresentados pelo benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno. Observa-se também que os resultados sem a utilização de vórtex, apresentaram maiores valores de recuperação, observação contrária ao esperado.

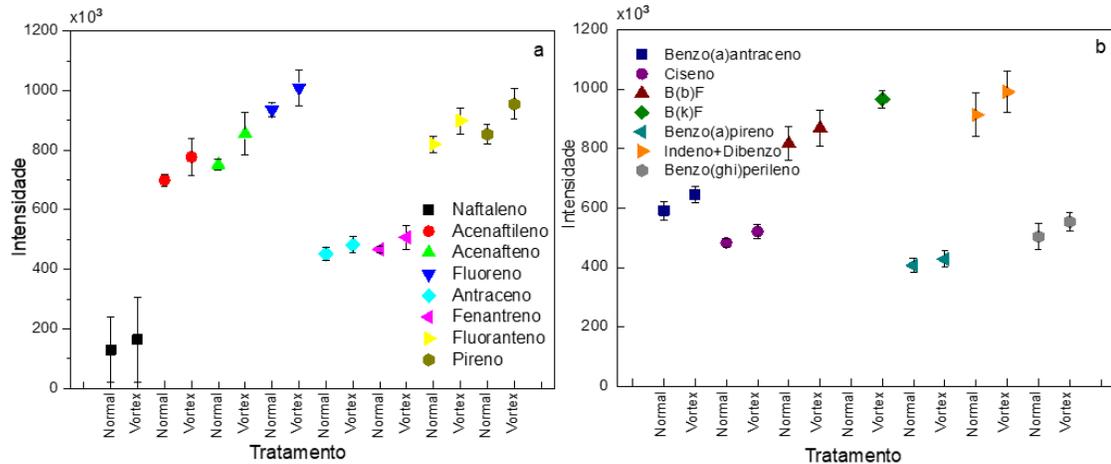
Para as amostras de sedimento, como já esperado, observamos menores porcentagens de recuperação para todos os HPAs quando comparamos as recuperações em *Spartina alterniflora*. Apesar deste fato as recuperações apresentaram valores que não ultrapassaram a faixa de 120% desejada.

Quanto a comparação dos métodos com e sem vórtex observamos pouca diferença entre os resultados de recuperação. Os gráficos com os resultados sumarizados mostram que para as amostras de *Spartina alterniflora* houve pouca diferença entre os HPAs de menor massa molar como o acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fluoranteno e o pireno, para o naftaleno, antraceno e fenantreno essa diferença não se manteve. Para os HPAs de maior massa molar observamos comportamento semelhante, com pouca diferença entre as extrações com e sem uso de vórtex.

Da mesma forma que o exposto anteriormente foram plotados gráficos (Figura 36 e 37) com as médias das amostras e os intervalos de confiança (IC), com nível de confiabilidade de 0,05. Se observarmos a sobreposição dos intervalos de confiança significa que não há diferença estatisticamente significativa entre eles, ou seja, as amostras são iguais.

Para as amostras de *Spartina alterniflora*, que apresentaram melhores resultados de recuperação quando comparados com os resultados de sedimento, observamos que há pequena diferença entre os grupos analisados.

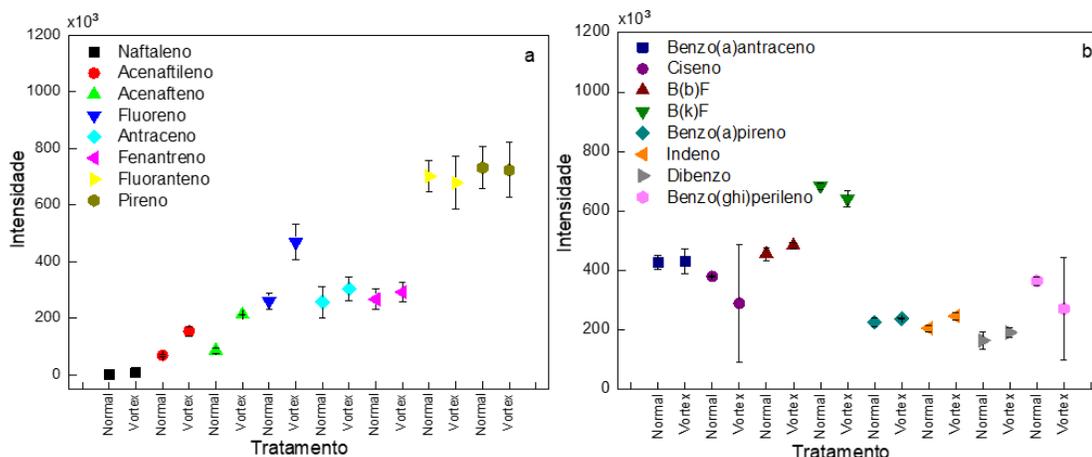
**Figura 36.** Intervalo de confiança do teste da utilização de vórtex na extração de HPAs em amostras de *Spartina alterniflora*.



Na figura 33, observamos os dados de IC referentes ao sedimento, onde observamos que há diferença entre os grupos testados apenas para alguns HPAs como o acenafteno, acenaftileno, fluoreno, antraceno e benzo(a)pireno, para os

demais não foi observado diferença estatística significativa, levando a conclusão que para os demais HPAs não há diferença na utilização de vórtex durante o processo de extração.

**Figura 37.** Intervalo de confiança do teste de utilização de vórtex na extração de HPAs em amostras de sedimento.



A utilização do vórtex forneceu recuperações e CV melhores somente para as amostras de *Spartina alterniflora*, mostrando que houve diferença significativa entre os métodos testados. Para o sedimento a melhora da recuperação com a utilização de vórtex não foi confirmada, pois para o sedimento as recuperações sem a utilização do vórtex mostraram maiores valores de recuperação e para esta matriz os IC dos grupos testados não apresentaram diferenças estatísticas para a maioria dos HPAs.

Espera-se que os HPAs estejam mais fortemente retidos no sedimentos, principalmente pelo teor de matéria orgânica (MO), assim sendo a extração destes compostos pode demandar um sistema de extração mais enérgico, o que não foi alcançado com o uso apenas de solvente e agitação em vórtex.

No intuito de manter a simplicidade e agilidade nos trabalhos de extração e como não houve diferença estatisticamente significativa entre os processos, a utilização do vórtex foi desconsiderada, pois resultaria no aumentando do tempo de extração das análises deste estudo sem aumento significativo da eficiência.

#### 4.2.1.5. Extração de HPAs em amostras de sedimento com aquecimento

O sedimento é uma amostra ambiental bastante complexa, com grande concentração de matéria orgânica que retém mais fortemente os compostos orgânicos, como os HPAs dificultando assim a extração destes compostos nesta matriz. Durante o desenvolvimento do trabalho verificou-se nos testes preliminares de extração, a necessidade de melhoria do método por ultrassom para as amostras de sedimento. De acordo com propostas de JIANWANG, ZHAO e TANGUAY (2010) o aumento de temperatura durante a extração aumenta a eficiência, uma vez que a temperatura influencia na solubilidade dos analitos e, portanto no processo de partição entre duas fases (LANÇAS, 2004). A partir deste embasamento teórico testou-se a influência do aumento da temperatura durante a extração. O maior problema foi a falta de um aparelho de ultrassom com controle de temperatura, a partir desta necessidade efetuou-se o monitoramento da variação da temperatura da água do banho de ultrassom inserindo um termômetro de vidro de líquido (Hg) com escala entre -10 a 110 °C fixado com garra de metal. O experimento foi efetuado em três dias consecutivos e verificou-se que após ~2 horas em funcionamento a temperatura de 35°C era atingida e após 4 horas a temperatura era de 42 °C, tendo um aumento muito lento após atingir os 42°C, levando cerca de 5 horas para que a temperatura aumentasse em 3°C, de 42 a 45°C (Tabela 29).

**Tabela 29.** Variação de temperatura do banho de ultrassom conforme o tempo de uso.

Tempo ligado	Temperatura atingida
2 horas	35 °C
6 horas	42 °C
11 horas	45 °C

O método a ser testado consiste apenas em acrescentar aquecimento no banho de ultrassom, as análises foram feitas por HPLC com detector de fluorescência.

Para este teste amostras foram fortificadas de acordo com o descrito na Tabela 27(pag. 123), após 24 horas foram extraídas três replicatas e três brancos com acetona e outras três com uma mistura de acetona:diclorometano (1:1). O tempo de

extração em banho de ultrassom foi fixado em 10 minutos. As extrações ocorreram com o monitoramento da temperatura do banho de ultrassom, que variou entre 35-42 °C. Os resultados destes experimentos (Tabela 30) mostraram recuperações entre 60 e 130% para a maioria dos compostos, próximo aos valores preconizados pela ANVISA, porém elevados coeficientes de variação das amostras extraídas com acetona foram observados, chegando a valores próximo a 50% enquanto as amostras extraídas com mistura de solventes obtiveram CV entre 1 e 18%. Após este teste optou-se por seguir a otimização do método utilizando a mistura de solventes (acetona:diclorometano). Na tabela 30 em destaque na cor vermelha são mostrados os valores fora da faixa desejada, recuperação entre 70 e 120% e CV menor que 20%.

**Tabela 30.** Recuperações das extrações (n = 3, banho de ultrassom, 10 minutos) de HPAs em sedimento efetuadas com aquecimento monitorado.

HPAs	SOLVENTE EXTRATOR			
	ACETONA: DCM(1:1)		ACETONA	
	REC%	CV	REC%	CV
Naftaleno	nd	-	nd	-
Acenaftileno	72	18	9	46
Acenafteno	74	16	11	41
Fluoreno	81	9	40	1
Fenantreno	91	6	92	20
Antraceno	84	6	94	23
Fluoranteno	88	4	99	20
Pireno	87	4	101	21
Benzo(a)antraceno	91	3	107	25
Benzo(b)fluoranteno	105	5	129	35
Benzo(k)fluoranteno	89	4	106	26
Benzo(a)pireno	105	4	135	36
Dibenzo(a,h)antraceno+Indeno(1,2,3-cd)pireno	98	6	128	36
Benzo(ghi)perileno	98	5	119	30

**LEGENDA:** número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA  
DCM: diclorometano-nd não detectado

#### 4.2.2. Extração de HPAs em amostras de sedimento por dispersão em fase sólida (GC-MS Varian)

Este teste foi conduzido paralelamente ao teste de extração com monitoramento de temperatura, com o intuito de se encontrar outro método de extração de HPAs nas amostras de sedimento. A dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), ou em inglês *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD), foi introduzida por BARKER e colaboradores em 1989 (BARKER et al., 1989), e auxiliou na resolução de muitos problemas de extração de compostos orgânicos em baixas concentrações de matrizes sólidas e semi-sólidas.

A técnica DMFS consiste basicamente em adicionar a amostra em um recipiente contendo um suporte sólido (adsorvente), submetendo a mistura à massagem até homogeneização. O suporte sólido ou dispersante serve para várias funções, primeiro atua como abrasivo, promovendo o rompimento da estrutura física da amostra; segundo, como adsorvente de compostos da matriz. O método convencional tem como próxima etapa o empacotamento, que é a transferência e empacotamento do material homogeneizado (matriz e adsorvente) para uma coluna de vidro e subsequente eluição com solvente apropriado, promovendo assim uma separação de grupos de compostos com maior afinidade ao solvente de eluição (BARKER et al., 1989).

O intuito do teste era verificar se o método de masserar a matriz (sedimento) com o suporte adsorvente romperia a estrutura física do sedimento, aumentando a área superficial. Partindo da premissa de que os HPAs devem possuir maior afinidade com o adsorvente do que com os constituintes da matriz (sedimento), o que possibilitaria melhor extração dos HPAs que estariam no adsorvente e não mais fortemente retidos à matriz.

Oito amostras de sedimento foram fortificadas, obtendo a concentração final de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Pesou-se em vial âmbar de 40 mL 1,000 grama de sedimento liofilizado, a este sedimento foi adicionado uma alíquota de 125  $\mu\text{L}$  de solução padrão estoque B, mostrada na Tabela 9 (pag.83). Duplicatas destas amostras foram maceradas em almofariz com pistilo de cerâmica utilizando diferentes adsorventes na proporção de 1:4, de acordo com as recomendações de LANÇAS (2004). O mesmo procedimento foi efetuado com os brancos, (somente o adsorvente) e com o sedimento sem

adsorvente, também em duplicata. A extração seguiu com sucessivos banhos de ultrassom e separação do sobrenadante como o detalhado na Figura 28.

Ao analisar os cromatogramas verificou-se que o sistema utilizado apresentava grandes variações dos sinais obtidos para a mesma concentração de analito em dias consecutivos. O equipamento foi monitorado por 8 dias com a injeção de solução padrão de concentração de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em quintuplicata. A solução padrão testada foi feita tomando-se uma alíquota de  $625 \mu\text{L}$  de solução estoque B (concentração  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) descrita na Tabela 9, página 56 em um balão volumétrico de  $5,0 \text{ mL}$  previamente limpo e seco. Ao observar a discrepâncias dos resultados utilizou-se a normalização (resposta modificada) em função do maior valor obtido nas análises de cada HPA. Assim sendo podemos comparar os resultados no experimento entre si sem a interferência da variação do sinal analítico.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

**Tabela 31.** Resultados do estudo da extração por DMFS: resposta modificada (recuperação normalizada) e coeficientes de variação. São apresentados os valores para cada HPA e para a somatória.

	ALUMINA		FLORISIL		SILICA		SEM ADSORVENTE	
	RESP MOD	CV	RESP MOD	CV	RESP MOD	CV	RESP MOD	CV
<b>Naftaleno</b>	11	2	6	100	100	7	15	19
<b>Acenaftileno</b>	51	3	92	12	82	0	100	10
<b>Acenafteno</b>	49	2	65	9	58	20	100	7
<b>Fluoreno</b>	83	36	29	25	57	4	100	12
<b>Fenantreno</b>	100	48	nd	-	58	5	23	100
<b>Antraceno</b>	100	78	12	100	33	33	78	5
<b>Fluoranteno</b>	100	67	28	38	27	13	70	6
<b>Pireno</b>	100	61	39	28	39	7	58	34
<b>Benzo(a)antraceno</b>	100	89	11	23	14	12	21	10
<b>Criseno</b>	100	90	12	52	10	16	21	10
<b>BbF+BkF</b>	100	67	nd	-	34	23	65	2
<b>Benzo(a)pireno</b>	100	90	40	28	39	13	56	9
<b>Ind+Dib</b>	100	70	32	32	30	9	55	-
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	100	80	47	27	40	10	62	4
<b>SOMATÓRIO RECUPERAÇÃO MODIFICADA</b>	<b>1194</b>		<b>413</b>		<b>621</b>		<b>824</b>	

**LEGENDAS:** resp mod: resposta modificada

nd: não detectado

nq: não quantificado

número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA

Os resultados mostram que o maior valor da somatória das respostas dos HPAs extraídos foi obtida com o uso de alumina (1194), porém esta extração forneceu valores elevados de coeficientes de variação, de 36 a 90% para 12 HPAs, (exceções Naf 2%, Ace 3% e Anf 2%) diminuindo a precisão do método. Considerando-se que a extração do sedimento sem o adsorvente, representa o método de extração por ultrassom, este foi o segundo método com maior somatório (824), apesar de apresentar baixas recuperações para os compostos de alta massa molar (21-65%), contendo no mínimo 4 anéis aromáticos, apresentou coeficientes de variação menores que o anterior (2-19%, com exceção de Fen 100% e Pir 34%).

Considerando o aumento de etapas no método de extração por dispersão da matriz em fase sólida e conseqüentemente o aumento dos erros embutidos nestas etapas, aumento de custos e tempo, foi decidido manter somente a extração por ultrassom e dentro desta técnica pesquisar o que poderia ser modificado para obter maior eficiência.

### **Após todos os testes preliminares concluiu-se que:**

- 1) o solvente de fortificação não seria evaporado;
- 2) após a extração, o solvente extrator seria seco sob fluxo de  $N_{2(g)}$ ;
- 3) não seria utilizada agitação em vórtex no processo de extração;
- 4) a extração seria feita em banho de ultrassom, sem auxílio de um adsorvente;
- 5) o aquecimento no banho de ultrassom seria utilizado como aliado nas extrações de HPAs em sedimento.

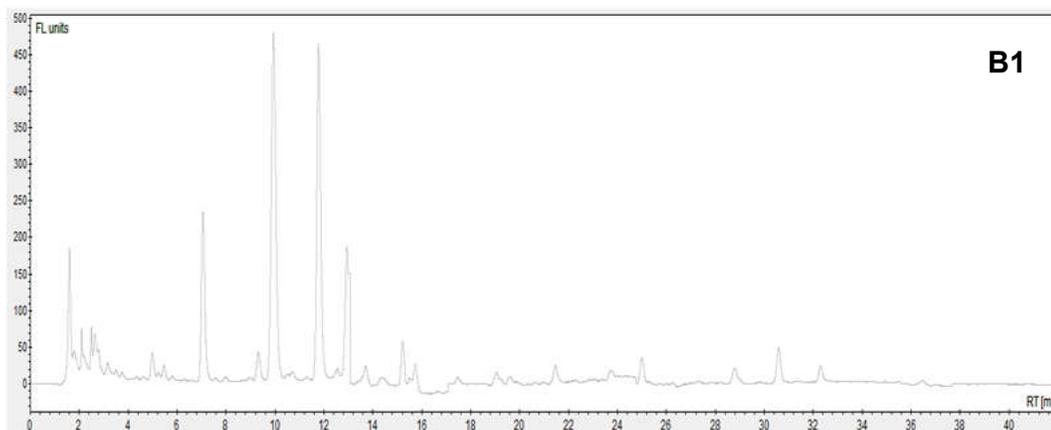
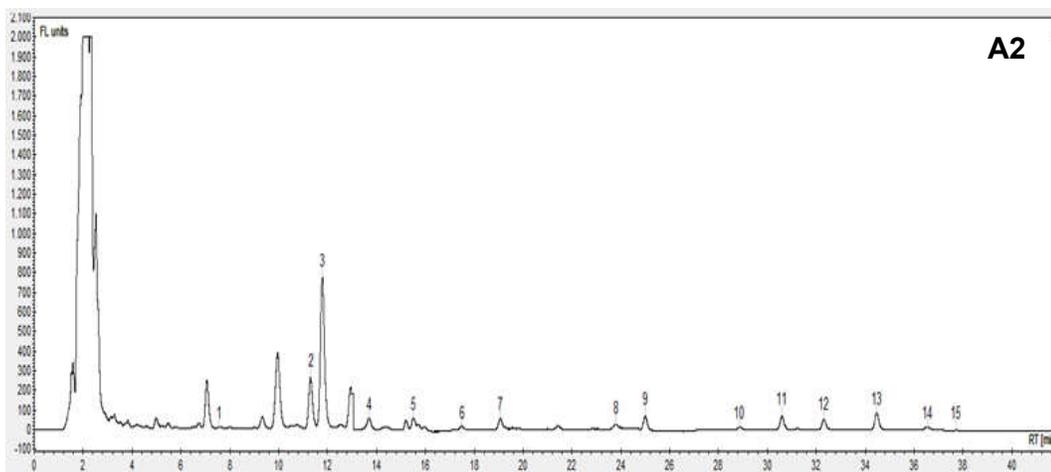
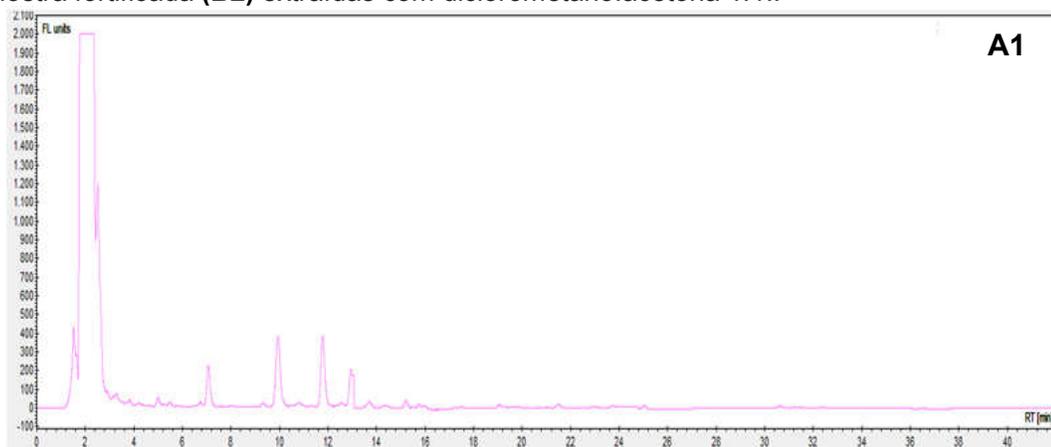
#### **4.2.2.1. Escolha do solvente de extração para amostras de *Spartina alterniflora* e sedimento, extração por ultrassom (HPLC-FLU)**

Para a escolha do solvente extrator, amostras de *Spartina alterniflora* e sedimento foram fortificadas utilizando a solução estoque descrita em 3.2.3 (Tabela 12, pag. 86), sendo que as concentrações das amostras fortificadas estão explicitadas na Tabela 24.

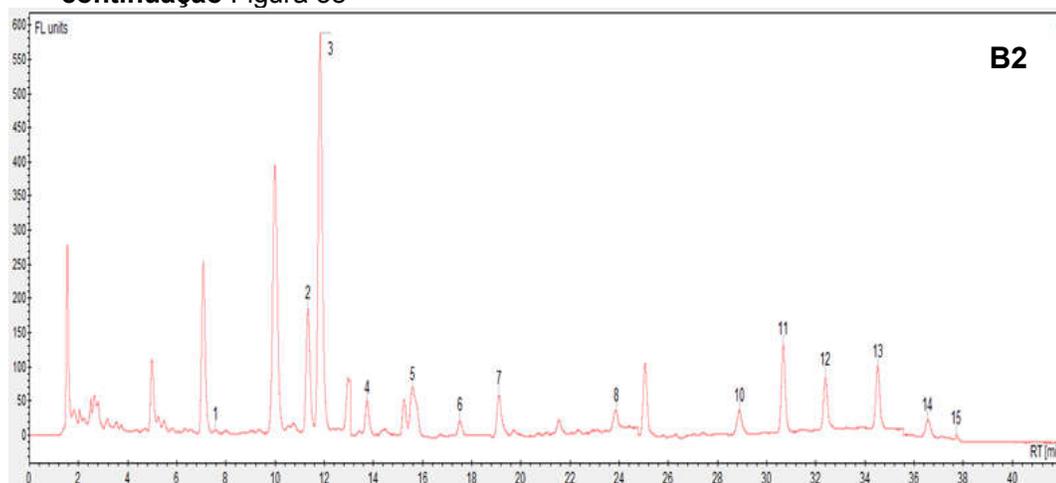
Os solventes foram escolhidos para a *Spartina alterniflora* e sedimento de acordo com os testes em amostras vegetais (SUGAUARA, 2013), extraídas duas replicatas de cada amostra fortificada e de cada branco para cada mistura de solvente testada, resultando em 12 amostras de sedimento e 12 amostras de *Spartina alterniflora*. Os

cromatogramas das amostras do branco e fortificadas de *spartina alterniflora* e sedimento podem ser observadas na Figura 38.

**Figura 38.** Cromatogramas (HPLC-FLU) para *Spartina alterniflora*: amostra branco (A1) fortificada (A2) extraída com n-hexano:acetona 1:1 .Para sedimento: amostra branco (B1) e amostra fortificada (B2) extraídas com diclorometano:acetona 1:1..



continuação Figura 38



**LEGENDA:** 1: Naf; 2: Ace; 3: Flu; 4: Fen; 5: Ant; 6: Flt; 7: Pir; 8: BaA; 9: Cri; 10: BbF; 11: BkF; 12: BaP; 13: Dib; 14: BghiP; 15: Ind (ÍNDICE DE ABREVIACÕES)

Assim como as amostras de hortaliças (SUGAUARA, 2013) a *Spartina alterniflora* apresentou melhores valores de recuperação para a mistura de n-hexano e acetona. Para amostras de sedimento o solvente de extração que obteve melhores valores de recuperação foi a mistura diclorometano:acetona. Na Tabela 32 observa-se os resultados sendo os valores em vermelho valores fora dos limites aceitáveis tanto para recuperação quanto para o coeficiente de variação.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

**Tabela 32.** Resultados de recuperação obtidos, valores em porcentagem de recuperação (REC) e coeficientes de variação (CV), utilizando diferentes misturas de solventes no processo de extração por ultrassom e analisados por HPLC-FLU.

HPAs	SEDIMENTO						<i>Spartina alterniflora</i>					
	HEX:DCM		AC:HEX		DCM:AC		HEX:DCM		AC:HEX		DCM:AC	
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
Naftaleno	4	67	1	33	3	22	10	18	8	16	16	10
Acenafteno	28	56	13	57	23	13	40	11	38	3	36	11
Fluoreno	46	26	-31	53	116	2	47	6	168	3	92	7
Fenantreno	69	13	337	68	78	1	33	29	112	15	47	8
Antraceno	-43	7	110	8	82	20	53	4	95	33	57	14
Fluoranteno	78	5	113	22	98	9	89	2	104	15	83	10
Pireno	90	10	198	55	86	5	106	4	140	8	63	5
Benzo(a)antraceno	18	65	141	31	86	4	126	27	98	14	79	9
Criseno	56	12	193	121	95	4	102	5	100	9	45	11
Benzo(b)fluoranteno	-206	2	164	24	107	3	128	6	96	5	49	8
Benzo(k)fluoranteno	21	1	97	8	96	1	103	8	83	6	24	10
Benzo(a)pireno	124	6	86	4	85	3	93	4	83	1	60	8
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-4	13	33	19	26	20	33	38	35	32	52	13
Dibenzo(a,h)antraceno	78	2	80	3	87	5	94	3	85	1	70	11
Benzo(ghi)perileno	-138	62	66	4	89	11	104	2	91	2	60	39

LEGENDA:DCM: diclorometano HEX: n-hexano AC: acetona número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pela ANVISA

Na maioria dos experimentos, os três primeiros compostos (naftaleno, acenafteno e fluoreno) não obtiveram valores de recuperação próximo ao desejado (70~120%), com exceção das extrações efetuadas com DCM:acetona para ambas as amostras 116 e 92% para o fluoreno em sedimento e *Spartina alterniflora*, respectivamente. Pode-se observar valores mínimos de 2% e máximos de 167% apresentando também valores negativos de recuperação -31% para o sedimento (acetona:n-hexano). Apesar destes resultados iniciais, o método de extração por solventes em banho de ultrassom é bastante simples e se mostrou eficiente em estudos anteriores deste grupo de pesquisa, assim, optou-se por otimizá-lo para este estudo.

Sabendo que os compostos de menores massas molares são mais voláteis (naftaleno e acenafteno) a possível perda no processo de secagem e a influência da temperatura em que as amostras são acondicionadas foram questionadas. Para o seguinte teste apenas amostras de *Spartina alterniflora* foram analisadas para conclusões conjuntas pois esta matriz apresentou valores de recuperação e coeficientes de variação adequados para que o método fosse considerado confiável

### 4.3. OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

#### 4.3.1. Otimização dos Método de Extração de HPAs em *Spartina alterniflora*

A otimização do método de extração de HPAs em *Spartina alterniflora* por ultrassom foi iniciada com a seleção das variáveis consideradas relevantes e posterior aplicação de planejamento experimental. A mistura de solventes extratores (n-hexano:acetona) foi previamente definida e a melhores proporções destes solventes seriam incluídos na otimização juntamente com o volume, o tempo e a quantidade de extrações.

##### 4.3.1.1. Planejamento Completo (GC-MS Varian)

Visando a otimização do método de extração optou-se por efetuar planejamento completo ( $2^k$ ) onde k representa o número de variáveis a serem otimizadas, resultando em um total de 16 experimentos aos quais foram acrescentados mais 4

pontos médios. As variáveis foram selecionadas, os níveis estudados e os códigos, podem ser observados na Tabela 33.

**Tabela 33.** Fatores estudados no planejamento completo e os níveis estabelecidos.

FATORES	MENOR NÍVEL (-1)	CENTRAL (0)	MAIOR NÍVEL (+1)
<b>A) Solvente de Extração</b>	50% n-hexano:acetona	75% n-hexano	100% n-hexano
<b>B) Volume de Solvente (mL)</b>	10	15	20
<b>C) Tempo de Extração (min)</b>	10	20	30
<b>D) Número de Extrações Consecutivas</b>	1	2	3

Alguns valores devem ser considerados para que os experimentos fossem executados, como por exemplo o volume mínimo necessário para que a amostra seja totalmente imersa, assim como o volume de solvente e tempo de experimento, pois um longo período de execução aliado a um elevado volume de solvente, aplicado a um grande número de amostras, acarretaria maiores custos ao processo de extração.

Os experimentos referentes ao planejamento completo pode ser observado na Tabela 34 juntamente com os resultados de recuperação para cada composto. A soma normalizada foi efetuada com o intuito de expressar em um único número os resultados de cada experimento.

**Tabela 34.** Planejamento fatorial completo 2<sup>k</sup> para extração de 16 HPAs prioritários em amostras de *Spartina alterniflora* e porcentagem de recuperação de cada HPA.

	A	B	C	D	Naf.	Acen	Ace	Flu	Fen	Ant	Fluor	Pir	Cri	B(a)A	B(b)F	B(k)F	B(a)P	Indeno	Dibenzo	B(ghil)P	Σ <sub>16HPA</sub>
1	1	1	1	-1	7	74	90	81	80	73	81	78	86	77	95	89	93	98	85	92	11,389
2	1	-1	-1	1	3	73	90	79	85	77	86	82	88	81	97	96	87	101	89	101	11,323
3	1	-1	1	-1	5	63	75	67	67	61	70	68	73	65	78	79	79	79	65	76	11,747
4	-1	1	1	-1	14	74	88	72	74	68	77	75	80	72	88	82	88	87	73	84	11,736
5	-1	1	-1	1	2	59	73	71	79	72	83	80	85	78	104	82	94	96	84	96	10,483
6	-1	-1	-1	1	9	75	91	80	84	77	86	83	92	82	95	94	96	101	87	95	11,492
7	1	1	1	1	68	92	110	84	85	79	89	86	94	86	100	97	107	114	98	109	11,523
8	-1	1	1	1	5	77	92	83	90	82	91	89	94	82	101	95	106	105	89	75	11,169
9	-1	1	-1	-1	39	83	94	80	77	71	76	74	80	71	85	80	88	89	76	84	11,526
10	1	1	-1	-1	39	80	92	78	71	64	73	71	78	72	83	81	85	86	76	84	11,487
11	1	-1	-1	-1	1	55	66	68	65	59	67	63	66	63	83	68	76	59	60	73	10,482
12	-1	-1	1	1	1	58	73	76	83	76	85	83	89	79	92	81	96	93	82	92	11,359
13	-1	-1	-1	-1	12	69	82	69	65	58	67	65	69	64	76	69	78	79	70	77	11,450
14	1	1	-1	1	2	51	67	76	84	77	87	85	92	85	112	90	106	110	98	108	10,664
15	1	-1	1	1	0	49	65	71	84	76	87	84	94	82	100	93	106	59	21	99	7,021
16	-1	-1	1	-1	4	63	74	66	72	65	73	70	74	69	83	75	82	82	72	78	11,745
M1	0	0	0	0	5	79	98	85	86	78	87	83	90	81	96	86	102	100	87	96	11,561
M2	0	0	0	0	2	62	79	80	83	77	84	82	89	80	93	86	97	98	64	92	11,284
M3	0	0	0	0	19	89	107	88	92	85	91	88	94	84	101	89	105	105	91	99	11,703
M4	0	0	0	0	23	91	109	92	92	84	90	87	95	85	102	93	105	108	97	99	11,742

Legenda:

A: tipo de solvente  
 B: volume de solvente  
 C; tempo de extração no ultrassom  
 D; número de replicatas  
 M: experimento nos níveis médios

Naf: Naftaleno  
 Acen: Acenaftileno  
 Ace: Acenafteno  
 Flu: Fluoreno

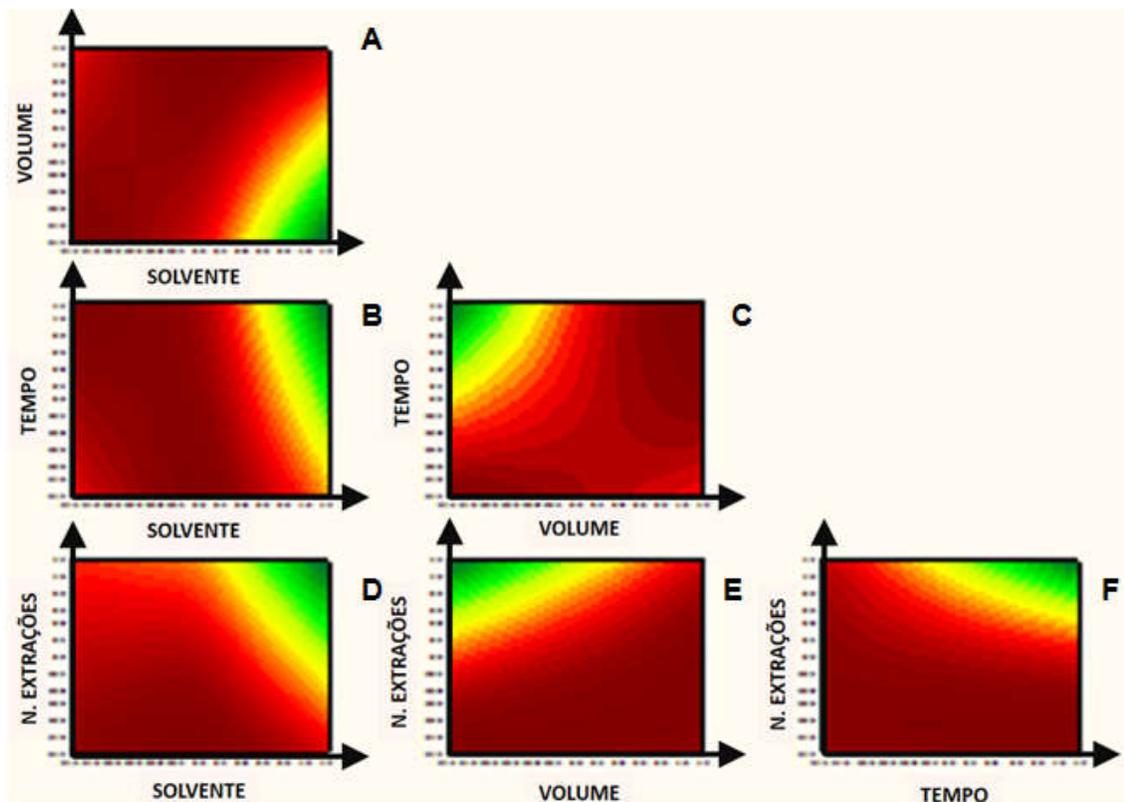
Fen: Fenantreno  
 Fluor: Fluoranteno  
 Pir: Pireno  
 Cri: Criseno  
 B(a): Benzo(a)antraceno

B(b)F: Benzo(b)fluoranteno  
 B(k)F: Benzo(k)fluoranteno  
 B(a)P: Benzo(a)pireno  
 Indeno: Indeno(1,2-cd)pireno  
 Dibenzo: Dibenzo(a,h)perileno  
 B(ghil)P: Benzo(ghi)pireno

Em um método de extração é desejável obter recuperações na faixa de 70-120% (BRITO et al., 2003), os programas de tratamento de dados são limitados, a associação de melhores resultados deve ser efetuada com a escolha de maiores ou menores valores, não um intervalo. Devido a esta limitação, ajustes foram efetuados nos valores de recuperação (normalização), valores acima de 130% foram convertidos em valores fora da faixa desejada, abaixo de 70%.

O programa Statistc<sup>MR</sup> 7 forneceu gráficos de superfície de resposta que mostram os resultados dos níveis estudados. Podemos observar as regiões onde as melhores respostas foram obtidas pela diferença de coloração do gráfico, coloração verde para respostas ruim, amarela para médias e vermelho para altas respostas, tons mais escuros acentuam a resposta, vermelho escuro corresponde a resposta muito alta e verde escuro resposta muito baixa. A Figura 39 mostra as superfícies de resposta para a somatório de HPAs.

**Figura 39.** Gráfico de superfície resposta da somatória de concentrações de HPAs:



Na Figura 39A, composição de solvente x volume, observou-se os melhores resultados no intervalo de baixo a médios níveis para composição dos solventes, ou seja, de 50 a 75% n-hexano em todo o intervalo de volume estudado, de 10 a 30 mL de solvente extrator. Porém quando a composição de solvente se aproxima de 100% n-hexano observou-se uma piora do resultado no menor nível de volume estudado, próximo a 10 mL.

Comportamento semelhante, pode ser observado na Figura 39 B e D, os melhores resultados no intervalo de composição de solvente de 50 a 75% de n-hexano, em todos os níveis do número de extração e do tempo, mas quando a composição do solvente se aproxima do maior nível (100% n-hexano) os melhores resultados se restringem aos maiores níveis de número de extrações (3 vezes) e do tempo (30 minutos).

As Figuras 39 C e E também apresentam comportamento semelhante entre si, quando o número de extrações e o tempo são estabelecidos entre o nível baixo e médio o volume mostrou melhores respostas em todo o intervalo estudado, de 10 a 30 mL. Porém quando estes dois fatores, número de extrações e o tempo são observados no maior nível estudado, as piores respostas são mostradas quando o volume do solvente é baixo, de 10 a 15 mL.

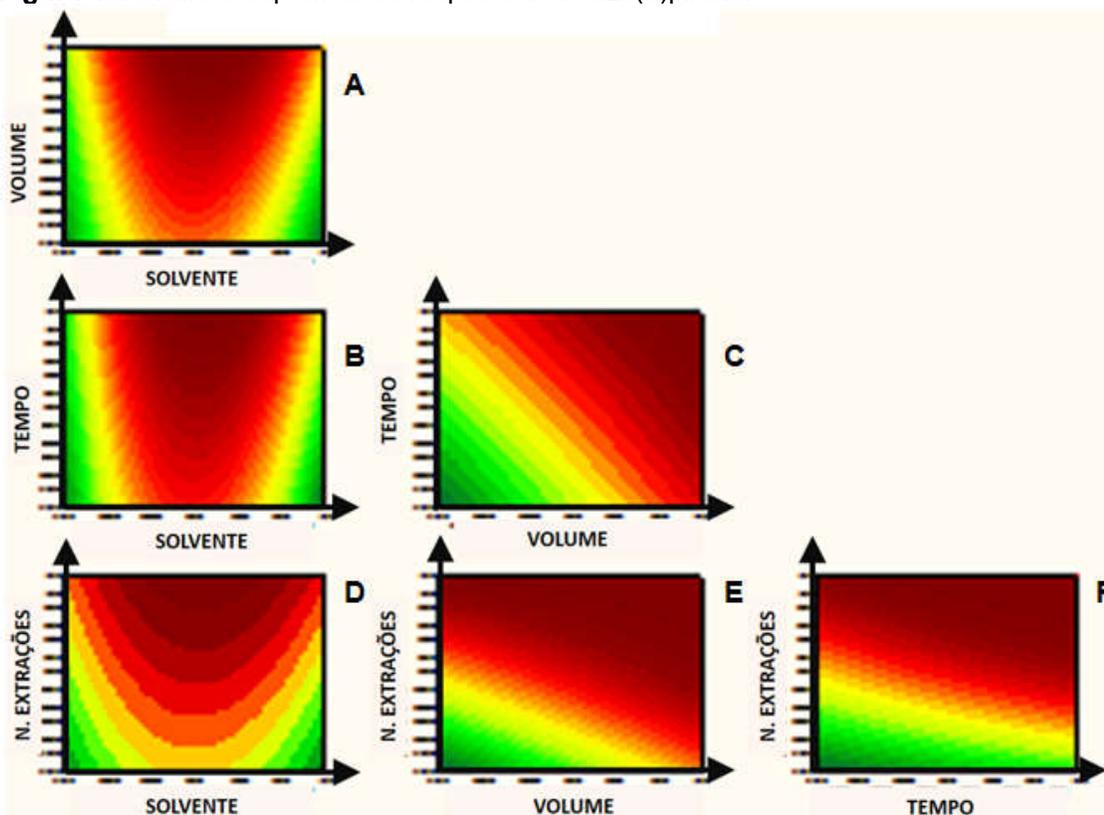
Na figura 39 F observou-se que o maior número de extrações quando aplicado de 20 a 30 minutos resulta em piores respostas.

Quando consideramos a somatória de HPAs e a economia de recursos os melhores níveis dos fatores estudados, ou seja, as melhores condições para extração seriam:

- volume de solvente alto (20 mL);
- tempo médio (20 minutos),
- número de extrações média (2) e
- composição (média) de 75% n-hexano.

Em análises ambientais com HPAs é importante focar no grupo de substâncias, sem ignorar o fato de que o benzo(a)pireno é o mais estudado por apresentar comprovadamente maiores efeitos adversos à saúde como citados anteriormente, por este motivo gráficos de superfície respostas foram elaborados para observar o comportamento de recuperação apenas do benzo(a)pireno Figura 40.

**Figura 40.** Gráficos superfície de resposta do benzo(a)pireno.



Na Figura 40 A e B observou-se comportamento semelhante, onde as melhores respostas são obtidas quando a composição de solvente é média (75% de n-hexano) o tempo e o volume de solvente mostram boas respostas em todo o intervalo estudado, com melhores respostas em nível médio e alto, de 20 a 30 minutos e de 20 a 25 mL de solvente.

Na figura 40D resposta semelhante é obtida, melhores respostas quando a composição do solvente é média (75% n-hexano), mas neste caso a resposta é mantida boa quando o número de extrações são de 2 a 3 (nível médio e alto).

A figura 40E e 40F mostra que em números de extrações altos (3 extrações) o intervalo de volume e tempo avaliados não influencia. Quando o número de extrações muda para 1, o volume em menor nível (10 mL) e tempo em menor nível (10 minutos) apresenta as piores respostas.

Na Figura 40C, observou-se um comportamento mais acentuado, melhor resposta somente quando o volume e o tempo estão em maior nível, 20 mL e 30

minutos e pior resposta quando ambos se encontram em menores níveis, 10 mL e 10 minutos.

Quando consideramos apenas a resposta do benzo(a)pireno, as melhores condições de extração são: solvente 75% n-hexano (nível médio), número de extrações 3 (maior nível), tempo de 30 minutos (maior nível) e volume de 20 mL (maior nível).

Após imprevistos com o fornecimento de solvente e atraso na entrega da acetona, adequações foram necessárias e o método teve que ser otimizado com a utilização apenas de n-hexano. Com esta modificação o método otimizado não foi o melhor dentro das condições estipuladas anteriormente e sim o melhor utilizando-se 100% n-hexano (Tabela 35) e considerando os resultados não somente da somatória dos HPAs mas também do benzo(a)pireno.

Os dados sumarizados das melhores condições de extração segundo os gráficos de superfície de respostas para a soma dos HPAs para o benzo(a)pireno e as condições definidas para a validação se encontram na Tabela 35.

**Tabela 35.** Comparativo das melhores condições segundo resultados para  $\Sigma$ HPA, benzo(a)pireno e as condições do método validado.

FATORES	Soma HPA	B(a)P	VALIDADO
Volume de Solvente (mL)	20	20	20
Tempo de Extração (min)	20	30	30
Número de Extrações Consecutivas	2	3	2
Composição do Solvente (n-hexano:acetona)	75%	75%	100%

Apesar da análise gráfica não demonstrar a possibilidade de validação de um método de extração nas condições apresentadas como sendo as melhores, de acordo com os parâmetros definidos na Tabela 35, os valores de recuperação mostrados na Tabela 34, nos indicam que há a possibilidade de variação desses níveis fora da região adequada mostrada graficamente (vermelho escuro Figura 39 e 40), com a obtenção de valores de recuperação e CV adequados para que o método validado e aplicado seja confiável aos estudos ambientais previstos.

**4.3.1.2. Teste de aplicação do método de extração em amostras de *Spartina alterniflora***

O método foi aplicado em amostras de *Spartina alterniflora* partes aéreas (caule e folhas) e raízes coletadas no início deste estudo e preparadas de acordo com o descrito em 3.3.1 (pag 88). Três replicatas de cada amostra foram pesadas, cerca de 1,000 grama em vial âmbar de 40 mL que foram submetidas a extração conforme parâmetros descritos na Tabela 35.

De acordo com os valores encontrados na amostra coletada na região em estudo, o método seria considerado aplicável, pois as concentrações encontradas estariam dentro da faixa de trabalho validada (Tabela 36).

**Tabela 36.** Valores de limites de detecção e quantificação e faixa de trabalho do método de extração de HPAs em amostras de *Spartina alterniflora* validado, os valores são expressos em ng g<sup>-1</sup>

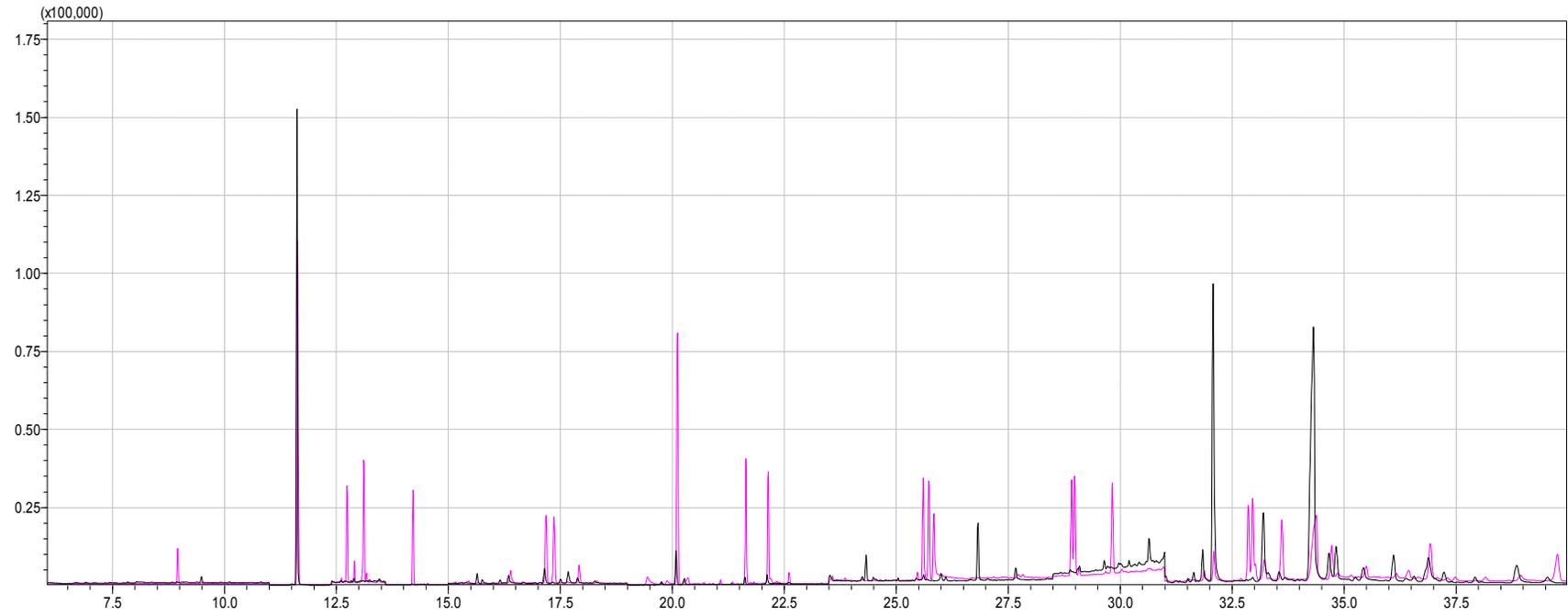
<b><i>Spartina alterniflora</i></b>					
<b>HPAs</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>Faixa de trabalho</b>	<b>APLICAÇÃO FOLHAS</b>	<b>APLICAÇÃO RAÍZES</b>
<b>Naftaleno</b>	NV	NV	NV	-	-
<b>Acenaftileno</b>	3,7	15,0	15,0-1300	<b>22</b>	-
<b>Acenafteno</b>	3,7	15,0	15,0-1300	<b>50</b>	<b>59</b>
<b>Fluoreno</b>	3,0	15,0	15,0-1300	<b>54</b>	<b>58</b>
<b>Fenantreno</b>	3,0	20,0	20,0-1300	<b>30</b>	<b>123</b>
<b>Antraceno</b>	5,5	15,0	15,0-1300	<b>28</b>	<b>36</b>
<b>Fluoranteno</b>	11,9	20,0	20,0-1300	<b>28</b>	<b>58</b>
<b>Pireno</b>	14,8	20,0	20,0-1300	<b>30</b>	<b>60</b>
<b>Benzo(a)antraceno</b>	3,0	20,0	20,0-1300	<b>29</b>	<b>34</b>
<b>Criseno</b>	8,0	20,0	20,0-1300	<b>33</b>	<b>39</b>
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	4,5	15,0	15,0-1300	<b>30</b>	<b>39</b>
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	3,4	15,0	15,0-1300	<b>35</b>	<b>42</b>
<b>Benzo(a)pireno</b>	2,9	15,0	15,0-1300	<b>43</b>	<b>60</b>
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	5,9	20,0	20,0-1300	<b>29</b>	<b>40</b>
<b>Indeno(1,2,3-c,d)pireno</b>	18,1	20,0	20,0-1300	<b>31</b>	<b>48</b>
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	4,7	20,0	20,0-1300	<b>40</b>	<b>47</b>

LEGENDA: NV: não validado

O cromatograma comparativo da injeção do extrato de planta (caule e folhas) e extrato das raízes pode ser observado na Figura 41. O sinal observado em cor de rosa corresponde a análise do extrato de raízes, este sinal é bem mais intenso do que o sinal do cromatograma sobreposto em preto, correspondente à análise do extrato das folhas e caule.

A constatação de que os HPAs estão mais concentrados na raiz quando comparado as partes aéreas, folhas e caule está de acordo com o reportado por WANG et al., 2012, que afirmou que as concentrações dos HPAs na espécie *Spartina alterniflora*, quando analisadas individualmente as partes, observa-se que há uma diminuição da concentração no sentido raiz, caule e folhas, o inverso do que foi encontrado para outras espécies de gramíneas, *phragmites* e *scirpus*.

**Figura 41.** Comparativo entre análises do extrato de *Spatina alterniflora* folhas e caule (preto) e de raíz (pink), aplicação do método validado, análise em GS-MS Shimadzu.



### 4.3.2. Otimização do Método de Extração de HPAs em sedimento

#### 4.3.2.1. Planejamento Experimental Fracionado ( $2^{k-2}$ )(GC-MS Varian)

A otimização das variáveis do método de extração de HPAs em sedimento por ultrassom foi iniciada com a aplicação do planejamento experimental fracionado para verificarmos a eficácia do método frente a esta matriz e para estabelecer quais fatores apresentam relevância para a extração, a mistura de solventes com melhores recuperações previamente definido foi a acetona e diclorometano (DCM) e essa porcentagem foi otimizada no planejamento.

Três níveis foram estabelecidos (baixo, intermediário e alto) para cada variável testada, estes níveis foram definidos de acordo com os experimentos anteriores, Tabela 37.

**Tabela 37.** Variáveis estabelecidas para a otimização de método de extração de HPAs das amostras de sedimento.

FATORES	MENOR NÍVEL	Nível intermediário	MAIOR NÍVEL
<b>A) Solvente de Extração (acetona:DCM*)</b>	50% acetona	70% acetona	90% acetona
<b>B) Volume de Solvente (mL)</b>	10	20	30
<b>C) Tempo de Extração (min)</b>	10	20	30
<b>D) Número de Extrações Consecutivas</b>	1	2	3
<b>E) Massa da Amostra (g)</b>	1,000	1,500	2,000

LEGENDA: \* diclorometano

As amostras foram pesadas e fortificadas a uma concentração de  $1000 \text{ ng g}^{-1}$  para cada HPA, foram extraídas amostras do branco para cada um dos experimentos descrito, seus valores foram descontados antes de cada tratamento gráfico. Os resultados de recuperação e a descrição deste planejamento podem ser observadas na Tabela 38.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

**Tabela 38.** Descrição do planejamento fatorial fracionado  $2^{k-2}$ , os resultados de recuperação para cada HPAs estudado e o valor da soma normalizado.

A	B	C	D	E	Naf	Ace	Acef	Flu	Fen	Ant	Flt	Pir	Cri	BaA	BkF	BbF	BaP	Ind	Dib	BghiP	$\Sigma_{NOR}$
-	-	-	+	+	26	67	73	77	96	74	80	82	98	73	76	99	83	80	78	88	13
-	+	+	-	-	28	60	64	76	99	78	83	85	101	82	117	110	93	96	92	105	12
+	-	+	-	+	16	69	71	79	99	74	73	76	121	81	81	55	110	59	68	53	10
+	+	-	+	-	16	65	61	81	93	81	81	81	88	77	80	79	80	80	80	73	13
+	+	+	+	+	30	72	74	84	94	80	81	86	99	78	91	86	90	87	89	84	13
+	-	-	-	-	5	50	71	82	107	85	90	91	116	93	100	66	110	121	122	121	12
-	+	-	-	+	20	76	81	88	109	83	81	84	67	84	87	59	109	58	60	56	11
-	-	+	+	-	33	62	64	77	96	73	76	82	92	72	76	98	83	85	82	94	13
0	0	0	0	0	6	45	44	79	94	81	83	83	103	80	91	95	90	89	97	84	12
0	0	0	0	0	10	60	56	77	91	78	78	85	99	80	93	95	93	90	93	85	13
0	0	0	0	0	12	44	23	70	85	76	75	82	91	76	85	87	84	83	86	78	12
0	0	0	0	0	24	57	50	82	89	80	79	82	91	74	83	83	86	82	87	76	13
0	0	0	0	0	28	77	73	96	95	83	84	88	101	82	94	95	96	95	102	86	13

**LEGENDA:**

$\Sigma_{NOR}$ : somatória normalizada.

A: solvente extrator

B: volume do solvente

C: tempo de extração

D: quantidade de extrações

E: massa da matriz

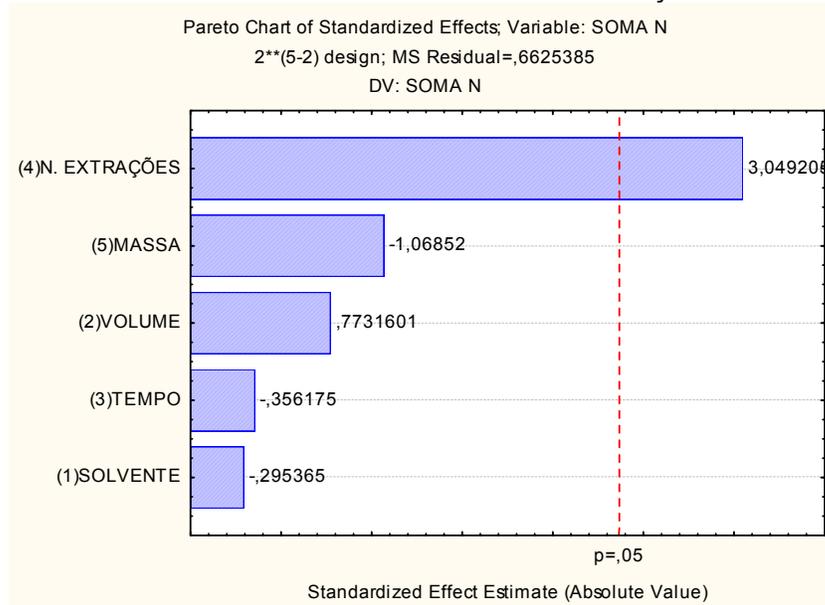
-1: menor nível estudado

+1: maior nível estudado

0: nível médio estudado

De acordo com o gráfico de Pareto, proveniente dos resultados obtidos do planejamento fatorial fracionado, o único fator que possui relevância é o número de extrações que apresenta melhores resultados em maiores valores, o volume também apresentou melhores valores nos maiores níveis estudados, ao contrário da massa e do solvente que apresentaram melhores resultados nos menores níveis (Figura 42).

**Figura 42.** Gráfico de Pareto referente aos resultados das extrações de sedimento



Após esta otimização a troca de equipamento foi necessária, pela diminuição do sinal analítico. Novo planejamento foi efetuado e analisado no GC-MS Shimadzu.

#### 4.3.2.2. Planejamento Experimental do Ponto Central (GC-MS Shimadzu)

Para esta segunda etapa foram fixados alguns fatores como a massa da amostra (1,000 g) e o número de extrações consecutivas, 2. Os demais fatores foram otimizados aplicando-se o planejamento experimental (Tabela 39).

**Tabela 39.**Planejamento experimental do ponto central dos três fatores estudados

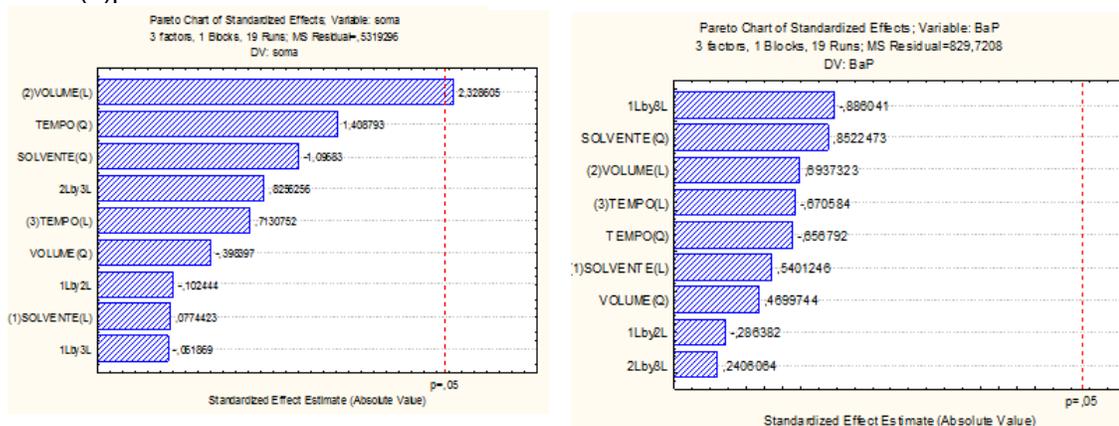
FATORES	-α	-1	0	+1	+α
<b>A) Solvente de Extração (acetona:DCM*)</b>	60%	70%	80%	90%	100%
<b>B) Volume de Solvente (mL)</b>	10	15	20	25	30
<b>C) Tempo de Extração (min)</b>	5	8	12	15	20

LEGENDA: \* diclorometano

As amostras foram pesadas e fortificadas a uma concentração de 1000 ng g<sup>-1</sup> e após 24 horas a extração foi efetuada. O branco para cada um dos experimentos também foi extraído, totalizando 32 experimentos.

Para melhor visualização dos resultados um gráfico de Pareto (Figura 43) foi plotado com a soma normalizada da recuperação de todos os HPAs e com a recuperação do benzo(a)pireno.

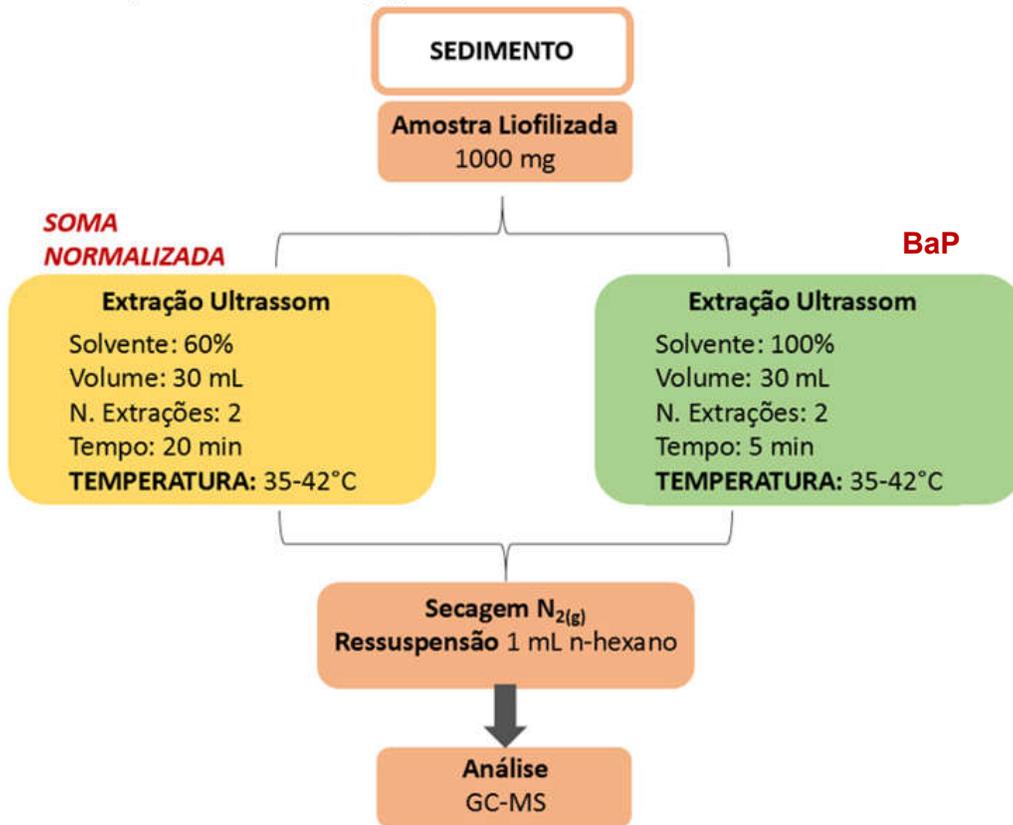
**Figura 43.**Gráficos de Pareto para a soma normalizada e para os dados de recuperação do benzo(a)pireno



Observou-se na Figura 43 que enquanto para a somatório de HPAs o tempo de extração e a composição do solvente extrator, tinham influência positiva na recuperação, para o BaP os melhores resultados são obtidos em menores níveis de ambos os fatores. Para o volume ambos os gráficos mostram melhores resultados em níveis altos.

Com os resultados apresentados, estabelecemos as melhores condições de extração para a soma normalizada e para o benzo(a)pireno. Os métodos sumarizados de acordo com estes resultados podem ser vistos na Figura 44.

**Figura 44.** Fluxograma da extração de HPAs em amostras de sedimento de acordo com dados do planejamento experimental e com base nos resultados de recuperação da soma normalizada de todos os compostos e do benzo(a)pireno.



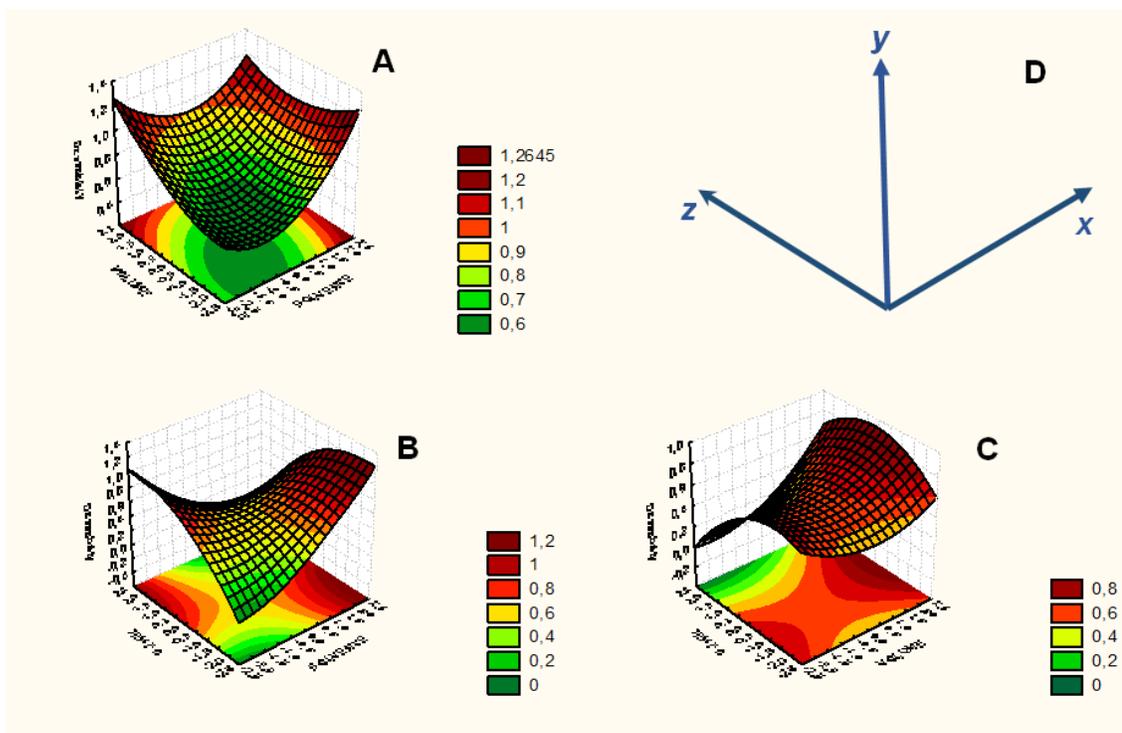
Fonte: A autora

Os HPAs prioritários em amostras provenientes de petróleo são os de menor massa molar (2 e 3 anéis aromáticos), porém os HPAs de maior massa molar são os característicos de combustão, portanto no estudo foram adicionados pontos de coleta decorrentes de efeitos antrópicos de combustão.

Baseado nessas informações a validação do método seguiu o critério de que a soma dos compostos possui maior importância para o objetivo do estudo, ajustando sempre que possível, os níveis para englobar o maior número de HPAs mesmo que as condições não sejam as que forneçam melhores resultados para alguns compostos estudados.

O tempo de 10 minutos foi estabelecido com base nos gráficos de superfície de resposta do BaP (Figura 45) que apresenta grande diminuição na recuperação com o aumento do tempo quando o volume em seu maior nível não é utilizado, este dado pode ser visto na área verde na Figura 45C, com os fatores volume e tempo nos eixos x e y respectivamente (indicado na Figura 45D) quanto maior o tempo de extração, utilizando volumes nos níveis baixos e médio, pior será a resposta. Pode-se observar também que há áreas com boas repostas se o tempo for intermediário e o volume utilizado se encontrar na região de nível alto ou baixo (região vermelho escuro da Figura 45C). Para não haver prejuízos ao processo de extração, com a diminuição da recuperação dos HPA de maior massa molar como o BaP o tempo intermediário foi escolhido.

**Figura 45.** Superfície de resposta dos resultados de recuperação do BaP



O método foi validado de acordo com os seguintes valores e com base nos resultados referente a soma dos HPAs e ao BaP:

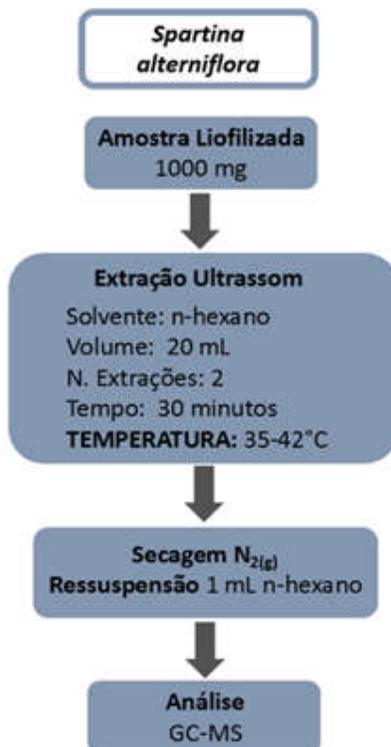
- SOLVENTE: soma normalizada-solvente 60% de acetona (nível -1),
- TEMPO: próximo ao BaP-10 min de banho de ultrassom (entre 0 e -1)
- VOLUME: próximo aos dois-25 mL de solvente extrator (nível +1).

#### 4.4. VALIDAÇÃO

##### 4.4.1. Validação do método de extração de *Spartina alterniflora* (GC-MS Shimadzu)

Amostras de *Spartina alterniflora* previamente liofilizada foram pesadas, aproximadamente 1,0 g e fortificadas em 12 concentrações diferentes em duplicatas e triplicatas depende da concentração, sendo as triplicatas aplicadas as menores concentrações de 30, 40, 50 e 60 ng g<sup>-1</sup> e duplicatas para as maiores concentrações de 100, 300, 625, 700, 900, 1100, 1200 e 1300 ng g<sup>-1</sup>. Amostras do branco foram extraídas também em triplicata seguindo o método descrito na Figura 46.

**Figura 46.** Método validado para extração de HPAs em *Spartina alterniflora*.



Fonte: A autora

O método mostrou-se preciso com valores de coeficiente de variação menor que 20% e exato obtendo recuperações entre 70-120% de acordo com o que preconiza a ANVISA e a ICH (*International Conference on Harmonization*) (BRITO et al., 2003).

O experimento utilizou mais de 3 níveis de concentração com mais de 9 determinações, mínimo estipulado pelos órgãos citados.

Os limites de detecção e quantificação do método foram determinados de acordo com a proposta por THIER & ZEUMER (BRITO, et al. 2003). Segundo THIER teoricamente, nenhum sinal deveria ser obtido para a amostra controle. Entretanto, sinais de “resíduos aparentes” podem ocorrer e são chamados sinais do branco. Estes sinais podem ser atribuídos a coextrativos não removidos no tratamento da amostra; impurezas presentes nos solventes e reagentes utilizados na obtenção do extrato finalou, a ruídos do sistema cromatográfico (THIER & ZEUMER, 1987). O limite de detecção (LD) pode ser estimado a partir dos resultados de um estudo de recuperação de acordo com as Equações 5 e 6.

**Equação 5:**

$$LD = \frac{2 \times t_{f,95} \times \sigma_{com}}{S}$$

**Equação 6:**

$$\sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

**sendo:**

$\bar{\sigma}_A$  - desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.

$\bar{\sigma}_B$  - desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle.

m - número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação.

n - número de repetições da aplicação do método à amostra controle.

f - número de graus de liberdade, estimado por m + n – 2.

S - sensibilidade do aparelho.

Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), assim como a faixa de trabalho do método de extração podem ser observados na Tabela 40.

**Tabela 40.** Valores de limites de detecção e quantificação e faixa de trabalho do método de extração de HPAs validado em amostras de *Spartina alterniflora*, os valores são expressos em ng g<sup>-1</sup>

HPAs	LD	LQ	FAIXA DE TRABALHO
Naftaleno	NV	NV	NV
Acenaftileno	3,7	15,0	15,0-1300
Acenafteno	3,7	15,0	15,0-1300
Fluoreno	3,0	15,0	15,0-1300
Fenantreno	3,0	20,0	20,0-1300
Antraceno	5,5	15,0	15,0-1300
Fluoranteno	11,9	20,0	20,0-1300
Pireno	14,8	20,0	20,0-1300
Benzo(a)antraceno	3,0	20,0	20,0-1300
Criseno	8,0	20,0	20,0-1300
Benzo(b)fluoranteno	4,5	15,0	15,0-1300
Benzo(k)fluoranteno	3,4	15,0	15,0-1300
Benzo(a)pireno	2,9	15,0	15,0-1300
Dibenzo(a,h)antraceno	5,9	20,0	20,0-1300
Indeno(1,2,3-cd)pireno	18,1	20,0	20,0-1300
Benzo(g,h,i)perileno	4,7	20,0	20,0-1300

NV: não validado

#### 4.4.2. Validação e aplicação do método de extração (GC-MS Shimadzu)

O método foi validado de acordo com o exigido pela ANVISA, amostras de sedimento liofilizado foram pesados em vial âmbar, em seguida foram fortificados em cinco níveis, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng g<sup>-1</sup>, todos em duplicata e o branco em triplicata. O método validado apresentou valores de recuperação entre 70-121% e CV entre 1-20%, valores dentro dos limites preconizados.

Para que o método possa ser utilizado nas amostras do estudo, primeiramente devemos testar aplicando-o em amostras de mesma procedência, ou procedência similar, resultando em concentrações dentro da faixa de trabalho validada, com valores acima dos limites determinados.

As amostras provenientes de região da Baixada Santista foram extraídas em duplicata, os resultados de LD e LQ do método validado e as concentrações encontradas nas amostras estão sumarizados na Tabela 41.

**Tabela 41.** Valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método validado para sedimento, valores expressos em ng g<sup>-1</sup>.

HPAs	LD	LQ	SÃO VICENTE MARGEM COM PLANTA	SÃO VICENTE MARGEM COM PLANTA	SÃO VICENTE MARGEM COM PEDRA	LAZARO	QUEIMADA GRANDE	EMISSÁRIO TUPY	SACO DO RIBEIRÃO	MARANDUBA	ILHA DO TAMANDUÁ	MAR VIRADOURO
Naftaleno	NV	NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acenaftileno	NV	NV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acenafteno	28,1	50,0	51	51	51	50	50	51	44	57	44	53
Fluoreno	46,7	50,0	55	55	57	54	54	54	23	23	23	23
Fenantreno	48,0	50,0	87	72	153	31	32	32	51	51	51	51
Antraceno	35,9	50,0	30	39	34	21	30	30	54	54	54	55
Fluoranteno	39,2	50,0	52	51	783	30	30	30	32	31	31	32
Pireno	38,2	50,0	65	66	98	31	32	31	29	28	29	29
Benzo(a)antraceno	35,4	50,0	30	31	42	30	-	29	31	29	29	33
Criseno	39,9	50,0	35	36	46	36	34	34	33	31	32	34
Benzo(b)fluoranteno	32,2	50,0	38	34	45	34	34	33	30	29	30	34
Benzo(k)fluoranteno	34,5	50,0	42	39	50	40	39	36	35	33	35	38
Benzo(a)pireno	32,4	50,0	50	48	59	45	45	45	32	30	32	37
Dibenzo(a,h)antraceno	34,9	50,0	42	33	46	35	32	32	38	36	37	41
Indeno(1,2,3-cd)pireno	31,4	50,0	42	32	37	36	33	34	46	46	46	48
Benzo(g,h,i)perileno	29,8	50,0	52	44	58	46	44	43	33	30	31	36

**LEGENDA:**

NV: não validado

VERMELHO: valores abaixo de LD

AZUL: valores abaixo de LQ

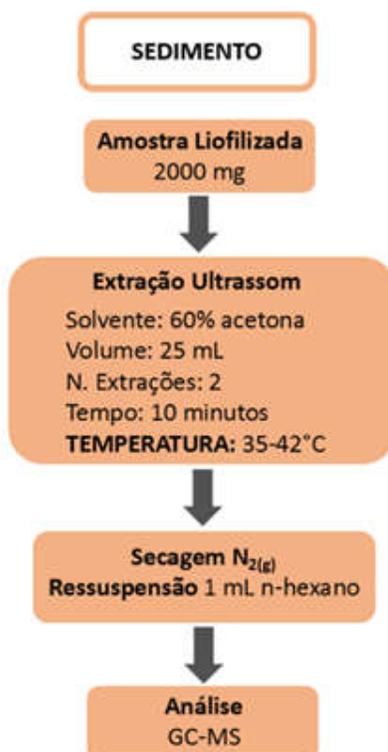
Os valores na Tabela 41 em vermelho são valores abaixo do limite de detecção e os valores em azul são os valores abaixo do limite de quantificação, ou seja, o método não possui limites baixos o suficiente para que essas análises sejam efetuadas, não sendo possível a quantificação de muitos dos HPAs importantes para este estudo.

Com base nessas observações foi decidido que um novo método seria validado para que fosse obtido limites de detecção e quantificação, aplicáveis as amostras estudadas.

#### 4.4.3. Validação do método de extração massa de 2,000 g (GC-MS Shimadzu)

Amostras de sedimento foram pesadas (2,000 g) e fortificadas em 12 diferentes concentrações, sendo as menores concentrações em triplicatas, 15, 20, 25, 30 e 40 ng g<sup>-1</sup> e as maiores concentrações em duplicatas, 60, 100, 200, 300 e 500 ng g<sup>-1</sup>. O método completo de extração pode ser visto na Figura 47.

**Figura 47.** Fluxograma do segundo método de extração de HPAs em amostras de sedimento validado.



Fonte: A autora

Os parâmetros referentes aos dois métodos validados de limites de quantificação e detecção, e a faixa de trabalho estão detalhados na Tabela 42.

Pode-se observar que apesar da faixa de trabalho ser menor no método utilizando 2,000 g de sedimento, os limites de quantificação e de detecção para quase todos os HPAs foram menores, com exceção benzo(g,h,i)perileno que permaneceu o mesmo valor. O método validado utilizando 2,000 g de sedimento se mostrou aplicável as amostras deste estudo.

**Tabela 42.** Dados comparativos entre os métodos de extração validados para amostras de sedimento, valores em ng g<sup>-1</sup>

METODO utilizando 1 g amostra (Figura 46)				METODO utilizando 2 g amostra (Figura 47)		
HPAs	LD	LQ	Faixa de trabalho	LD	LQ	Faixa de trabalho
Naftaleno	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Acenaftileno	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Acenafteno	28,1	50,0	50,0-1000,0	28,7	30,0	30,0-500,0
Fluoreno	46,7	50,0	50,0-1000,0	20,4	25,0	25,0-500,0
Fenantreno	48,0	50,0	50,0-1000,0	15,5	20,0	20,0-500,0
Antraceno	35,9	50,0	50,0-1000,0	10,4	15,0	15,0-500,0
Fluoranteno	39,2	50,0	50,0-1000,0	14,9	20,0	20,0-500,0
Pireno	38,2	50,0	50,0-1000,0	12,2	20,0	20,0-500,0
Benzo(a)antraceno	35,4	50,0	50,0-1000,0	11,2	20,0	20,0-500,0
Criseno	39,9	50,0	50,0-1000,0	23,8	25,0	25,0-500,0
Benzo(b)fluoranteno	32,2	50,0	50,0-1000,0	23,4	25,0	25,0-500,0
Benzo(k)fluoranteno	34,5	50,0	50,0-1000,0	24,7	25,0	25,0-500,0
Benzo(a)pireno	32,4	50,0	50,0-1000,0	19,9	20,0	20,0-500,0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	31,4	50,0	50,0-1000,0	6,0	15,0	15,0-500,0
Dibenzo(a,h)antraceno	34,9	50,0	50,0-1000,0	19,9	20,0	20,0-500,0
Benzo(g,h,i)perileno	29,8	50,0	50,0-1000,0	18,7	50,0	50,0-500,0

NV : não validado

#### 4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE HPAS EM AMOSTRAS DE *Spartina alterniflora*

As amostras de *Spartina alterniflora* (SA) analisadas neste estudo, foram coletadas em locais próximo aos pontos de coleta de sedimento onde havia a presença de SA. As coletas foram efetuadas no mesmo diadas coletas de sedimento porém em diferente período, enquanto o sedimento foi amostrado na parte da manhã (período de maré baixa Figura 48A), iniciando as 5:30, a coleta de SA foi possível apenas após as 13 horas (maré alta Figura 48B) quando a maré atingiu nível suficientemente alto para que a embarcação se aproximasse do local pretendido.

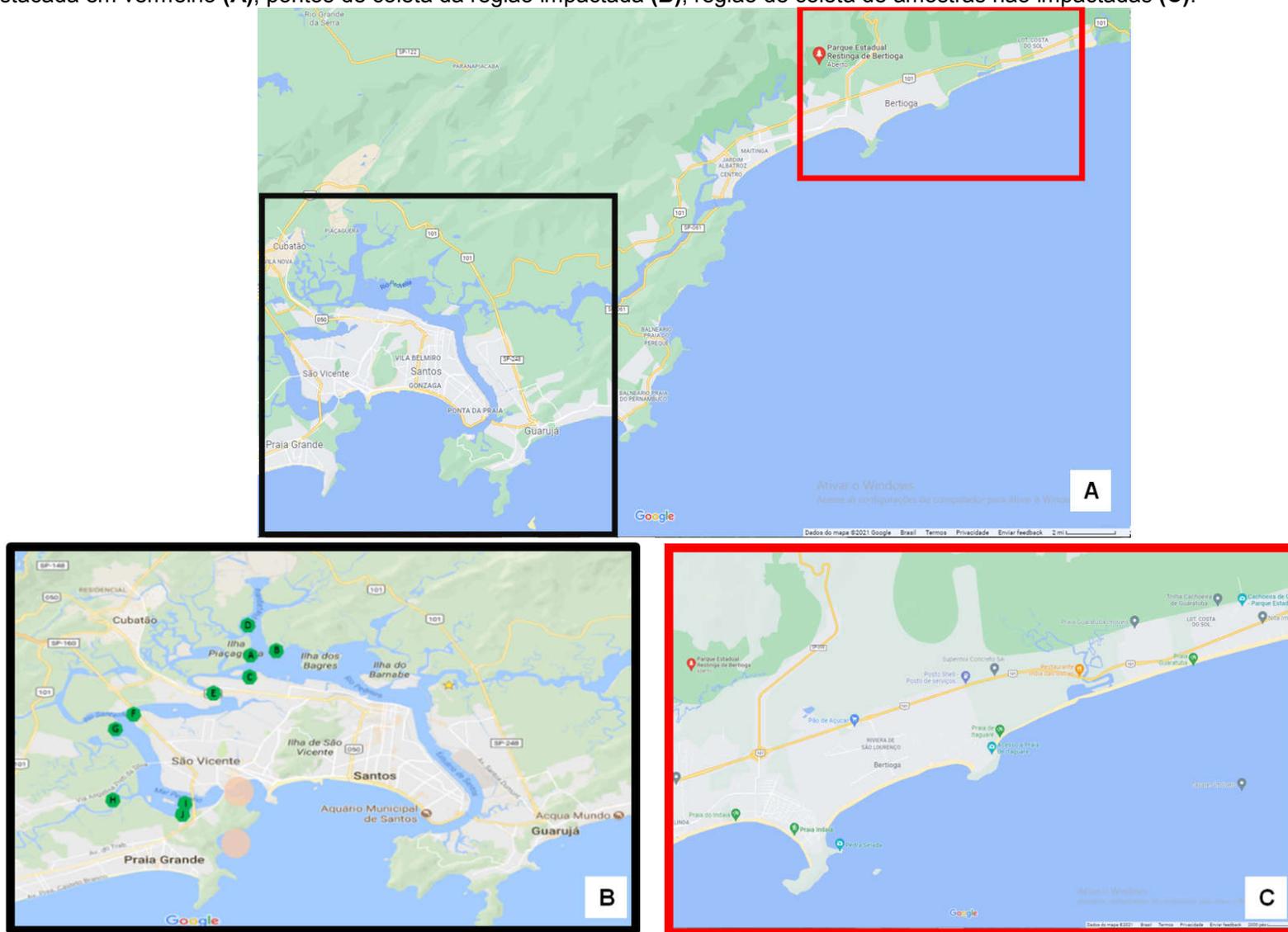
**Figura 48.** *Spartina alterniflora* **A)** maré baixa; **B)** maré alta.



Fonte: google imagens

A retirada da *Spartina alterniflora* foi efetuada manualmente através da parte folhosa imersa na água, sendo que para a amostra **F** não foi obtido quantidade de raiz suficiente para a análise, pois não seria possível escavar o sedimento para obter as raízes. A localização estimada dos pontos de amostragem podem ser observados na Figura 49, em 49A podemos observar a região entre a Baixada Santista (destaque em preto), local de coleta de amostras impactadas e a região de Bertioga (destaque em vermelho), coleta de amostras pouco impactadas. Na Figura 49B em verde, são mostrados os pontos onde foram coletadas SA e na Figura 49C podemos observar os pontos de coleta das amostras com pouca influência antrópica. As amostras foram codificadas com a mesma letra de identificação do local de amostragem. O método de extração descrito na Figura 46 (pag. 158) foi aplicado as amostras de *Spartina alterniflora*, folhas e caule separados da raiz. Os resultados estão sumarizados na Tabela 43, logo após a Figura 49.

**Figura 49.** Pontos de coleta da *Spartina alterniflora*: região de coleta de amostras impactadas destacada em preto e não impactadas destacada em vermelho (A); pontos de coleta da região impactada (B); região de coleta de amostras não impactadas (C).



Fonte: googlemaps modificado pela autora

Tabela 43. Concentrações de HPAs (ng g<sup>-1</sup>) encontradas em amostras de *Spartina alterniflora* (SA) (n=3).

PONTOS DE AMOSTRAGEM(FIGURA 49B)								
HPAs	PONTO A		PONTO B		PONTO C		PONTO D	
	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ
Naftaleno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19±3	41±4
Acenafteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18±1	29±1
Fluoreno	14±4	nq	12±2	nq	14±3	nq	29±4	28±2
Fenantreno	57±5	27±6	71±6	160±4	102±18	47	62±5	388±31
Antraceno	16±4	16±0,6	59±5	20±6	22±1	13	251±15	32±2
Fluoranteno	19±1	14±3	nd	42±3	34±2	nd	40±3	68±5
Pireno	17±2	15±1	18±3	61±0,1	28±2	nd	68±5	96±2
Banzo(a)antraceno	10±2	12±2	14±6	nq	nq	nq	96±9	nq
Criseno	16±1	nq	20±3	nd	25±1	nd	13±2	13±3
Benzo(b)fluoranteno	12±2	27±4	14±2	17±3	12±2	14	23±4	16±2
Benzo(k)fluoranteno	nq	19±3	nq	12±4	30±7	8	11±4	12±4
Benzo(a)pireno	12±3	22±5	10±2	22±2	nq	14	33±2	20±3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	22±5	23±7	142±18	101±6	82±7	25	27±2	95±6
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	nd	nd	27±7	nd	nd	37±4	20±4
Benzo(ghi)perileno	nq	10±4	13±4	28±4	nq	nq	nq	nq
$\sum_{\text{HPA15}}$	<b>195±29</b>	<b>185±35</b>	<b>373±50</b>	<b>490±39</b>	<b>336±43</b>	<b>112,152</b>	<b>722±64</b>	<b>859±69</b>
$\sum_{\text{HPA3 anéis}}$	87±12	43±6	142±12	180±10	138±22	59	374±29	518±40
$\sum_{\text{HPA4 anéis}}$	62±7	42±6	52±11	102±3	88±5		217±20	177±10
$\sum_{\text{HPA5 anéis}}$	24±5	68±13	24±4	79±16	42±9	36	104±1	69±13
$\sum_{\text{HPA6 anéis}}$	22±5	33±11	155±22	129±10	82±7	25	27	95±6
$\sum_{\text{HPA5 anéis sem dib}}$	24	68	2	52	42	36	67	49
$\sum_{\text{HPA6 anéis com dib}}$	22	33	155	156	82	25	65	115

Tabela 43: continuação

HPAs	PONTOS DE AMOSTRAGEM (FIGURA 49B)							
	PONTO E		PONTO F		PONTO G		PONTO H	
	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ
Naftaleno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
Acenafteno	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
Fluoreno	17±3	7±2	12,7±0,6	-	16±3	nq	16±5	nq
Fenantreno	19±3	187±15	21±3	-	28±4	25±4	43±4	162±19
Antraceno	23±1	22±1	58±2	-	12±1	15±2	14±6	23±1
Fluoranteno	23±3	73±7	nq	-	nq	23±2	nd	49±2
Pireno	nd	74±3	nd	-	nd	19±2	nd	49±1
Banzo(a)antraceno	67±9	nq	nq	-	10±2	15±2	nq	nq
Criseno	49±3	12±2	21±3	-	26±4	10,9±0,8	32,0±0,1	12,5±0,8
Benzo(b)fluoranteno	11±2	22±4	10±3	-	nq		13±4	13,0±0,6
Benzo(k)fluoranteno	11±4	16±4	nq	-	nq	15±3	nq	nq
Benzo(a)pireno	48±8	22±5	33±6	-	21±5	24±4	nq	15±3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	178±21	26±5	24±2	-	36±5	24±5	31±6	19±3
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	27±3	25±8	-	nd	28±4	nd	22±1
Benzo(ghi)perileno	12±4	20±5	15±2	-	14±4	19±3	17±3	98±1
$\sum_{\text{HPA15}}$	<b>457±61</b>	<b>501±56</b>	<b>209±30</b>	-	<b>163±29</b>	<b>239±32</b>	<b>166±27</b>	<b>462±33</b>
$\sum_{\text{HPA3 anéis}}$	58±7	216±19	92±6	-	56±9	41±6	74±14	185±21
$\sum_{\text{HPA4 anéis}}$	139±15	159±11	21±3	-	36±7	68±7	31,1±0,1	110±4
$\sum_{\text{HPA5 anéis}}$	70±13	86±16	69±18	-	21±5	89±11	13±4	50±4
$\sum_{\text{HPA6 anéis}}$	190±25	46±10	40±3	-	50±9	42±8	49±9	117±4
$\sum_{\text{HPA5 anéis sem dib}}$	70	59	44	-	21	60	13	28
$\sum_{\text{HPA6 anéis com dib}}$	190	73	65	-	50	71	49	139

Tabela 43: continuação

HPAs	PONTOS DE AMOSTRAGEM (FIGURA 49B)					
	PONTO I		PONTO J		BERTIOGA MANGUE	
	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ	FOLHAS+CAULE	RAÍZ
Naftaleno	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acenafteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoreno	14±3	14±3	12±5	10,0±0,8	10,0±0,7	13±3
Fenantreno	22±4	28±4	28,±4	23±4	17±3	20±4
Antraceno	13,4±0,5	17±2	14±3	13±1	14±1	21±1
Fluoranteno	nd	nq	nd	nd	21±4	nd
Pireno	19±5	nd	nd	nd	18±2	nd
Banzo(a)antraceno	nq	10,3±0,5	20,7±0,8	12±2	nq	nq
Criseno	20±5	nd	48±3	Nd	nd	nd
Benzo(b)fluoranteno	nq	16±4	11±2	18±3	nq	nq
Benzo(k)fluoranteno	nq	12±4	15±3	14±3	nq	nq
Benzo(a)pireno	26±4	12±3	13,1±0,2	Nq	nq	nq
Indeno(1,2,3-cd)pireno	25±6	22±5	23±1	23±6	16,06±5	17,4±0,8
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	23±4	nd	24±3	nd	nq
Benzo(ghi)perileno	nq	21±5	nq	26±4	nq	100±5
$\sum_{HPA15}$	<b>139±28</b>	<b>177±33</b>	<b>185±21</b>	<b>163±27</b>	<b>97±16</b>	<b>171±14</b>
$\sum_{HPA3}$ anéis	50±8	60±8	55±11	46±6	42±5	54±8
$\sum_{HPA4}$ anéis	39±11	10±0,5	68±3	12±2	39±6	0,000
$\sum_{HPA5}$ anéis	26±4	63±14	39±5	56±9	-	0,000
$\sum_{HPA6}$ anéis	25±6	43±10	23±1	49±10	16±5	117±6
$\sum_{HPA5}$ anéis sem dib	26	40	39	32	-	-
$\sum_{HPA6}$ anéis com dib	25	66	23	74	16	117

LEGENDA: nd não detectado nq não quantificado nv: não validado

Observou-se maior concentração nas raízes quando comparado as partes aéreas de *Spartina alterniflora*, o que era esperado de acordo com o observado nas amostras utilizadas para testar o método de extração validado Tabela 36 (pag. 149). O estudo de HONG e colaboradores (2015) corroboram essa afirmação, para o fenantreno e pireno em plantas expostas por 70 dias em sedimento fortificado nas concentrações de 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 44) mostram que as raízes e folhas apresentaram as seguintes concentrações ao final do experimento.

**Tabela 44.** Valores informados por HONG et. al. (2015) de incorporação de HPAs em *Spartina alterniflora* após 70 dias de exposição

	10 ng g <sup>-1</sup>		100 ng g <sup>-1</sup>	
	Raiz	Folhas	Raiz	Folhas
<b>Fenantreno</b>	6,20±0,50	0,83±0,09	10,7±0,89	1,71±0,24
<b>Pireno</b>	4,30±1,43	0,79±0,04	6,97±0,44	1,20±1,57

Estes valores evidenciam que esta espécie apresenta a característica de acumular mais HPAs nas raízes em comparação as partes aérea. WANG e colaboradores (2012), reforçam esta afirmação mostrando as seguintes concentrações reportadas em ng g<sup>-1</sup> p.s.; **C<sub>folhas</sub>: 95,3; C<sub>raiz</sub>: 162,6 ng g<sup>-1</sup>p.s.** Estas amostras foram coletadas no maior e mais antigo estuário da China localizado ao leste da praia na Ilha de Chongming em Shanghai convertido em área de Reserva Nacional Natural, ou seja, uma área considerada preservada, sendo estes valores compatíveis com a amostra obtida em Bertioga, próximo a Reserva da Restinga **C<sub>folhas</sub>: 97; C<sub>raiz</sub>: 171 ng g<sup>-1</sup>p.s.**(Tabela 45).

**Tabela 45.** Concentrações médias encontradas nas folhas e raízes de *Spartina alterniflora* em  $\text{ng g}^{-1}$  p.s. (peso seco) e respectivos desvios padrão.

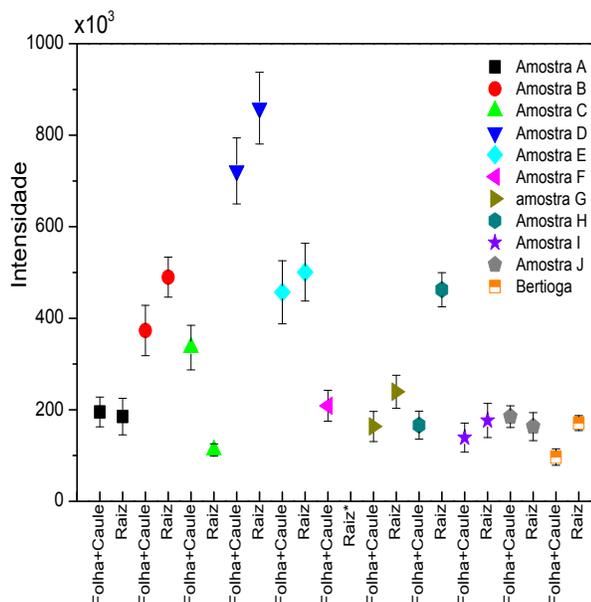
AMOSTRA	FOLHA	RAIZ	SOMA
A	195±29	185±35	381±64
B	373±50	490±39	863±88
C	336±43	112*	448±43
D	722±64	859±69	1581±133
E	457±61	501±56	958±117
F	209±30	-	209±30
G	163±29	239±32	403±61
H	166±27	462±33	629±60
I	139±28	177±33	316±61
J	<b>185±21</b>	<b>163±27</b>	<b>348±48</b>
BERTIOGA	97±16	171±14	268±30

\*amostra sem replicata

O contrário foi observado por WANG (2012) em outras espécies de gramíneas como a *phragmites*:  $C_{\text{folhas}}$ : 170,1;  $C_{\text{raiz}}$ : 79,1 e para *scirpus*  $C_{\text{folhas}}$ : 86,2;  $C_{\text{raiz}}$ : 89,6 (concentrações em  $\text{ng g}^{-1}$  p.s.).

Para saber se há diferença estatística significativa entre as concentrações encontradas nas partes aéreas (caule+folhas) e nas raízes das amostras, novamente utilizou-se os gráficos de intervalo de confiança e média das análises com nível de confiabilidade de 0,05. Concentrações maiores nas raízes e menores nas partes aéreas foram observada em quase todas as amostras, com exceção da amostra C (Figura 50 marcador verde).

**Figura 50.** Gráficos de intervalo de confiança (IC) e média das análises de HPAs em amostras de *Spartina alterniflora* folhas+caule e *Spartina alterniflora* raízes, com nível de confiabilidade de 0,05.



Para duas amostras, **A** (marcador preto) e **J** (marcador cinza) as concentrações entre as partes aéreas e raízes, não mostraram diferenças significativas como pode ser visto na Figura 50.

A amostra **C** apresentou comportamento diferente das demais, ou seja, a concentração na parte aérea foi significativamente maior do que nas raízes. Para explicar o resultado diferenciado do ponto **C** deve-se considerar a localização deste ponto. Além destes fatores temos que ressaltar que o experimento de HONG e colaboradores (2015), possui limitações pois foi delineado no intuito de simular condições de contaminação apenas via sedimento, não levando em conta as outras vias de exposição como a de origem atmosférica que ocorre naturalmente e que segundo TREMOLADA e colaboradores (1996) resulta na maior fonte de incorporação destes contaminantes nas cutículas da vegetação exposta devido a hidrofobicidade dos HPAs. Não há dúvidas de que esta espécie possui maior acúmulo nas raízes quando comparado as folhas. A exceção observada pode ser explicada pela influência de uma grande descarga de contaminantes atmosféricos próximo à região amostral **C**, ponto próximo ao Porto de Santos que expõe a amostra estudada à grande quantidade de material particulado em suspensão

proveniente dos navios e outras embarcações, que pode ocasionar maior incorporação via deposição seca, além da proximidade com a Alemoa onde ocorreu o incêndio em 2015 nos tanques de granel líquidos da USIMINAS, e com o Dique da Gilda, onde ocorreu em 2017 o incêndio na comunidade de palafita.

Outras amostras que apresentaram concentrações relativamente altas foram as amostras coletadas nos pontos **B**, **C** e **E** ( $C_{\text{folhas}}$ : 373; 336 e 457 e  $C_{\text{raiz}}$ : 490; 112 e 501 ng g<sup>-1</sup> p.s. respectivamente), pontos próximos ao Porto de Santos, dos tanques de armazenamento da USIMINAS e do Dique da Gilda, local este sem saneamento básico, sem coleta de lixo que faz com que a comunidade perpetue a cultura de queima de lixo.

#### 4.5.1. Concentração de HPAs nas folhas de *Spartina alterniflora*

O alto valor observado 722 ng g<sup>-1</sup> p.s. obtido no ponto **D** é compatível com valores observados na literatura (SUN et al., 2014) em amostras de gramíneas coletadas em locais altamente impactados próximo a indústrias do petróleo (651 ng g<sup>-1</sup>) e indústria de alumínio (795-980 ng g<sup>-1</sup>), este ponto amostral em questão é próximo da USIMINAS, local que se espera obter os maiores níveis de contaminantes em todas as matrizes estudadas. Porém os valores observados neste estudo se mostram bem menores que valores de folhas e raízes de *Spartina alterniflora* coletadas nos Estados Unidos (New Hampshire) Rio Cocheco (WATTS et al., 2006)  $C_{\text{raiz}}$ : nd-22000 ng g<sup>-1</sup> (Fenantreno) e  $C_{\text{folhas}}$ : 1,45-200 ng g<sup>-1</sup> (Acenaftileno e Pireno). Somente o valor de Fenantreno encontrado nas raízes supera o total de concentração de HPAs encontrados em todas as amostras estudadas, mostrando que comparativamente os locais amostrados possuem menor contaminação quando observamos o Rio Cocheco. Um documento da *EPA New England*, 2012 reporta medidas para conter uma possível contaminação proveniente de um aterro sanitário próximo ao Rio Cocheco, este aterro pode ser o contribuinte das altas concentrações de HPAs encontradas no estudo de WANG e colaboradores.

Os valores encontrados no Rio Winnicut, considerado local não impactado  $C_{\text{raiz}}$ : nd e  $C_{\text{folhas}}$ : nd-4,0 ng g<sup>-1</sup> (Naftaleno), mostrando que os resultados não se assemelham a nenhum dos ambientes estudados.

No presente trabalho, as concentrações de HPAs encontradas nas amostras foram variadas e apresentaram as seguintes faixas:  $\Sigma$ HPA 97– 722 ng g<sup>-1</sup> p.s.;  $\Sigma$ HPA<sub>3 anéis</sub>: 42–374 ng g<sup>-1</sup> p.s.;  $\Sigma$ HPA<sub>4 anéis</sub>: 21 – 62 ng g<sup>-1</sup> p.s.;  $\Sigma$ HPA<sub>5-6 anéis</sub>: 16 – 260 ng g<sup>-1</sup> p.s.

Amostra coletada no ponto **D** apresentou maior concentração para a soma dos HPAs de 3, 4 e 5 anéis e para a soma total respectivamente (374, 217, 104 e 722 ng g<sup>-1</sup>), este resultado já era esperado pois o ponto D se encontra próximo à Cubatão onde se localizam as várias indústrias que podem contribuir para o aumento de HPAs no ambiente como Dow Química, Petrocoque, Hidromar dentre outras.

As concentrações totais de HPA em folhas são consistentes com a localização dos pontos de coleta que se encontram entre o Porto de Santos e área industrial de Cubatão. O ponto de coleta **A** se encontra no centro dos pontos de maior concentração e apresentou valores baixos ( $C_{folhas}$ : 195 ng g<sup>-1</sup>;  $C_{raiz}$ : 185 ng g<sup>-1</sup>) de cerca da metade a um terço do valor encontrado nos pontos ao entorno (**B**, **C** e **D**), o que pode ser causado por barreiras naturais relativas à exposição atmosférica entre este ponto e as áreas de fonte de contaminação podendo ser observado os pontos **D**, **C** e **B** como sendo exemplos de parte destas barreiras.

As amostras coletadas em **F**, **G**, **H** e **J** (209, 164, 166 e 177 ng g<sup>-1</sup>) apresentaram concentrações intermediárias, comparáveis a **A**. A amostra do ponto **I** foi a que apresentou menor concentração nas folhas dentre as amostras de área impactada 139 ng g<sup>-1</sup>, cerca de 40% maior que o valor obtido em Bertiooga 97 ng g<sup>-1</sup>, área considerada não impactada. O ponto de coleta da amostra **I** é localizado no Portinho, próximo ao Mar pequeno onde há constante movimentação de embarcações, sem outras influências como indústrias e habitação no local.

#### 4.5.2. Concentração de HPAs em outras espécies de plantas de regiões de mangue

Os estudos de HPAs em plantas proveniente de mangue mostra o comportamento inverso demonstrado pela *Spartina alterniflora*. LI e colaboradores em 2014, mostraram que outras espécies apresentaram concentrações de HPAs maiores em suas partes aéreas quando comparado as suas raízes nas seguintes espécies: *Kandelia obovata*(KO), *Aegiceras corniculatum* (AC) e *Bruguiera gymnorrhiza* (BG) e *Avicennia marina* (AM) na proporção de 1:1:1:1 foram lavadas e

tratadas. Os seguintes valores foram observados para as folhas  $\Sigma$ HPA 3697 ng g<sup>-1</sup> p.s. (1389-7925 ng g<sup>-1</sup> p.s.) e para as raízes as concentrações de 313-5168 ng g<sup>-1</sup> p.s.

Outro estudo de SUN e colaboradores (2013) com as mesmas espécies provenientes de mangue *Kandelia obovata* (KO), *Aegiceras corniculatum* (AC) e *Bruguiera gymnorrhiza* (BG) e *Avicennia marina* (AM) (Figura 51), analisadas apenas para o Fluoranteno indicou o comportamento mostrando as diferenças em cada planta, para BG e AC foi observado que em 180 horas após a depuração, quase todo fluoranteno havia se perdido restando apenas 1,9 e 8,2% respectivamente em contraste para AM e KO ainda restavam 39,9 e 61,2%, mesmo sendo observado uma menor adsorção em BG do que em AC após as 8 horas de depuração.

**Figura 51.** Diferentes tipos de plantas estudadas em mangue para exposição de HPAs (LI et al., 2014)



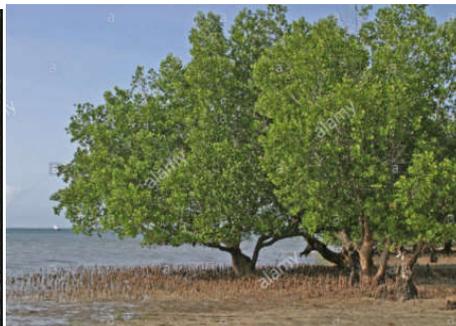
*Kandelia obovata* (KO)



*Aegiceras corniculatum* (AC)



*Bruguiera gymnorrhiza* (BG)



*Avicennia marina* (AM)

Fonte: google imagens

Estes resultados nos mostram a grande variação no comportamento de espécies proveniente do mangue, mesmo suas estruturas físicas não sendo tão diferenciadas observou-se que o fluoranteno é aprisionado mais efetivamente em AM e KO e mais fracamente em BG e AC. Pode-se esperar este comportamento para os demais HPAs de propriedades semelhantes como o pireno e criseno e benzo(a)antraceno, todos constituídos de 4 anéis aromáticos.

As outras espécies de plantas estudadas possuem morfologia totalmente diferenciada e apesar de pertencerem ao mesmo ecossistema estudado possuem estruturas mais altas que permanecem fora da água por todo o tempo, o que favorece uma constante deposição seca atmosférica nestes indivíduos. A idade das folhas também pode ser um atenuante nas altas concentrações, já que podem estar expostas por períodos mais prolongados que a espécie estudada.

Toda a vegetação invasora dos ecossistemas costeiros (manguezais, ervas marinhas e pântanos salgados) é conhecido como “vegetação de carbono azul”, devido a denominação que eles dão ao carbono retirado do meio ambiente por esses ecossistemas, “carbono azul” (HUANG et al., 2022). A *Spartina alterniflora* (SA) é uma das espécie invasoras que mais colonizam esses ecossistemas costeiros, prejudicando a diversidade nativa devido a rápida proliferação e adaptação, apesar disso são observados diversos benefícios dos locais onde a SA é inserida, como a restauração de ecossistemas, melhora nas múltiplas funcionalidades do solo e principalmente a remoção de CO<sub>2</sub> considerada 40% maior que a taxa das florestas tropicais (SYED et al., 2021).

HUANG e colaboradores reportam dados de HPAs em faixas de sedimento separados por período, antes e depois da colonização de *Spartina alterniflora*, tendo sido determinadas concentrações de 69,2±12,2 ng g<sup>-1</sup> e 270,8±16,4 ng g<sup>-1</sup> respectivamente, observando um aumento de concentração de quatro vezes, mostrando a capacidade que esta colonização possui na retenção de contaminantes orgânicos que podem ser de origem natural ou antrópica (HUANG., et al 2022). A SA estando em contato direto a um sedimento com altas concentrações de HPAs pode absorver esses e outros contaminantes que já se encontram aprisionados ao sedimento, ocasionando maiores concentrações nas raízes quando comparada as folhas e caule, além da constante lavagem das folhas pela maré alta, que diminui a contribuição da deposição seca nestes indivíduos.

#### 4.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO

Os sedimentos desempenham um papel importante no ciclo aquático, pois eles são responsáveis por transportar partes significantes de matéria orgânica e contaminantes. Sedimentos superficiais são principalmente derivados da erosão de superfícies e componentes minerais. Os componentes orgânicos são derivados da atividade biológica na água. Logo, a qualidade da água está diretamente relacionada com os sedimentos presentes nela.

Os sedimentos podem ser classificados em depositados ou suspensos. Neste trabalho, foi analisado o sedimento depositado, coletado através de um balde do fundo do leito dos rios. O monitoramento e avaliação dos sedimentos precisa ser constantemente avaliado e os procedimentos de análise refinados.

O processo de transporte de sedimentos é um fenômeno dinâmico e as águas, em especial de rio, são susceptíveis a mudanças constantes. Por isso, as análises de tamanho, polidispersividade (PDI) e análise de carbono orgânico total (TOC) são importantes para entender o perfil dos sedimentos e a relação deles com a qualidade da água.

O método foi aplicado as amostras de sedimento coletados, as concentrações dos HPAs e as somatórias estão sumarizadas na Tabela 46.

**Tabela 46.**Concentrações de HPAs ( $\text{ng g}^{-1}$ ) encontradas nas amostras de sedimento coletadas no pontos de amostragem indicados na Figura 19 (pag. 80) n=3:

HPAs	1	2	3	4	6	7	8	9
Naftaleno	nv	-	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nv	-	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenafteno	nd	-	nd	nd	41±3	71±12	nd	3226±82
Fluoreno	nd	-	46±4	25±4	60±8	147±16	nd	4114±97
Fenantreno	21±8	-	99±8	116±12	264±24	270±27	nd	6316±13
Antraceno	nq	-	40±6	25±7	102±14	72 ±8	nd	3493±17
Fluoranteno	nd	-	325±10	97 ±4	863±7	38±7	nd	881±18
Pireno	nq	-	316±9	109±5	876±21	32±1	nd	77±20
Criseno	nd	-	118±10	41±4	586±34	347±17	nd	14383±64
Benzo(a)Antraceno	nd	-	141±10	40±2	593±21	435±17	nd	902±19
Benzo(b)fluoranteno	nd	-	213±18	76±8	938±32	818±21	nd	81±13
Benzo(k)fluoranteno	nd	-	162±23	47±4	720±18	1567±37	nd	9859±22
Benzo(a)pireno	nd	-	799±5	76±7	928±32	147±8	nd	9307±30
Indeno(1,2,3-cd)pireno	nd	-	159±14	434±27	722±18	450±14	nd	7347±41
Dibenzo(a,h)antraceno	nq	-	35±10	nq	152±12	34±10	nq	572±11
Benzo(ghi)perileno	nd	-	141±20	52,35±5	684±27	537±13	nd	5891±29
$\Sigma$ HPA	<b>20.965</b>	-	<b>2595</b>	<b>1192</b>	<b>7529</b>	<b>4965</b>	-	<b>66451</b>
$\Sigma$ HPA3 anéis	20.965	-	185	166	466	560	-	17149
$\Sigma$ HPA4 anéis	-	-	900	288	2919	852	-	16244
$\Sigma$ HPA5 anéis	-	-	1210	199	2737	2566	-	19819
$\Sigma$ HPA6 anéis	-	-	300	487	1407	987	-	13238

Tabela 46. continuação

HPAs	10	11	12	13	14	15	16	17
Naftaleno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenafteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluoreno	nd	62	nq	nd	nd	nd	nd	nd
Fenantreno	27±8	262	23±1	98±19	70±8	6±7	nq	36±11
Antraceno	nd	64	nd	17±7	19±3	nd	nd	nd
Fluoranteno	nd	714	nd	102±13	nd	42±21	44±5	24±11
Pireno	24,5±0,2	891	116±10	154±15	211±18	54±8	50±1	34±9
Criseno	nd	350	89±16	89±16	49±5	nq	30±3	nd
Benzo(a)Antraceno	nd	62	35 ±4	nd	64±8	nd	nd	nd
Benzo(b)fluoranteno	nd	607	159 ±16	102±16	149±17	32±5	40±6	25±10
Benzo(k)fluoranteno	nd	408	101±25	68±12	115±33	nd	30±4	nd
Benzo(a)pireno	nd	442	121±13	97±13	130±15	nd	nd	24±6
Indeno(1,2,3-cd)pireno	nd	359	115±24	81±15	113±19	28±10	33±13	25±9
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	26	30±16	19±4	16±8	nq	nq	nq
Benzo(ghi)perileno	nd	32	123±14	48±3	nq	nq	nq	nq
∑HPA	<b>52</b>	<b>4,3x 10<sup>3</sup></b>	<b>910</b>	<b>880</b>	<b>940</b>	<b>210</b>	<b>230</b>	<b>170</b>
∑HPA3 anéis	27	390	22	110 x 10 <sup>3</sup>	89	50	nq	36
∑HPA4 anéis	25	2 x 10 <sup>3</sup>	240	350 x 10 <sup>3</sup>	320	96	120	58
∑HPA5 anéis	nd	15 x 10 <sup>2</sup>	410	290 x 10 <sup>3</sup>	410	32	70	49
∑HPA6 anéis	0.000	420	240	130 x 10 <sup>3</sup>	110	28	33	25

Tabela 46. Continuação

HPAs	20	21	22	ARI	CAN	BM	BN
Naftaleno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenaftileno	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Acenafteno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nq
Fluoreno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenantreno	24±7	31±10	nq	52±8	31±15	90±17	87±9
Antraceno	24±10	nd	nd	nd	nd	26±12	17±7
Fluoranteno	32±12	31±7	nd	nd	nd	335±14	nq
Pireno	52±14	27±7	22±1	28±5	nq	292±28	185±11
Criseno	24±9	20±10	nq	nd	nd	159±17	87±10
Benzo(a)Antraceno	28±8	nd	nd	nd	nd	183±22	84±25
Benzo(b)fluoranteno	53±17	nd	nd	nd	nd	189±15	107±12
Benzo(k)fluoranteno	41±11	nd	nd	nd	nd	170±22	81±21
Benzo(a)pireno	nd	nd	nd	nd	nd	123±19	71±25
Indeno(1,2,3-cd)pireno	44±10	nd	20±10	24±4	nd	175±22	88±12
Dibenzo(a,h)antraceno	nq	nq	nd	nq	nd	29±8	nq
Benzo(ghi)perileno	50±13	nd	nq	nq	nd	143±18	76±24
<b>∑HPA</b>	<b>372</b>	<b>109</b>	<b>42</b>	<b>104</b>	<b>31</b>	<b>1913</b>	<b>882</b>
∑HPA3 anéis	47	31	-	52	31	116	104
∑HPA4 anéis	136	78	22	28	-	968	356
∑HPA5 anéis	94	-	-	-	-	511	258
∑HPA6 anéis	94	-	20	24	-	318	164

LEGENDA: nv: não validado nd: não detectado nq: não quantificado;

#### 4.6.1. Comparativo das Concentração de $\Sigma\text{HPA}_{16}$ do atual trabalho com: Valores da CETESB 2001 e Concentrações em outras regiões

Na literatura pode-se encontrar apenas um estudo abrangente (sedimento, água e organismos) sobre a ocorrência de HPAs na Baixada Santista, que foi reportado pela CETESB em 2001, portanto a comparação dos dados obtidos nesta tese será efetuada com os desta publicação. Os dados também serão comparados aos obtidos em outras regiões impactadas em outros países.

Os pontos de maiores concentração de HPAs foram os locais próximos a ex COSIPA, (USIMINAS desde 2009), que foram comparados com os valores apontados no estudo da CETESB publicado em 2001.

A Figura 52, a seguir apresenta os pontos de coleta de sedimento **6** e **9**.

O maior somatório de HPAs encontrado foi de  $66000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ponto **9**), no Canal da Cosipa (Figura 52, pag. 183), mesmo local que em 2001 apresentou concentrações de  $733000 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Esta diferença de 10 vezes pode ser o reflexo de dois fatores:

**1-** Crise econômica do país de 2015 que forçou o encerramento da metalurgia primária na antiga COSIPA, extinguindo o funcionamento relacionado a esta atividades, como pátio de minério, coqueira, sinterização e alto forno, atividades de grande contribuição na liberação de HPAs no ambiente;

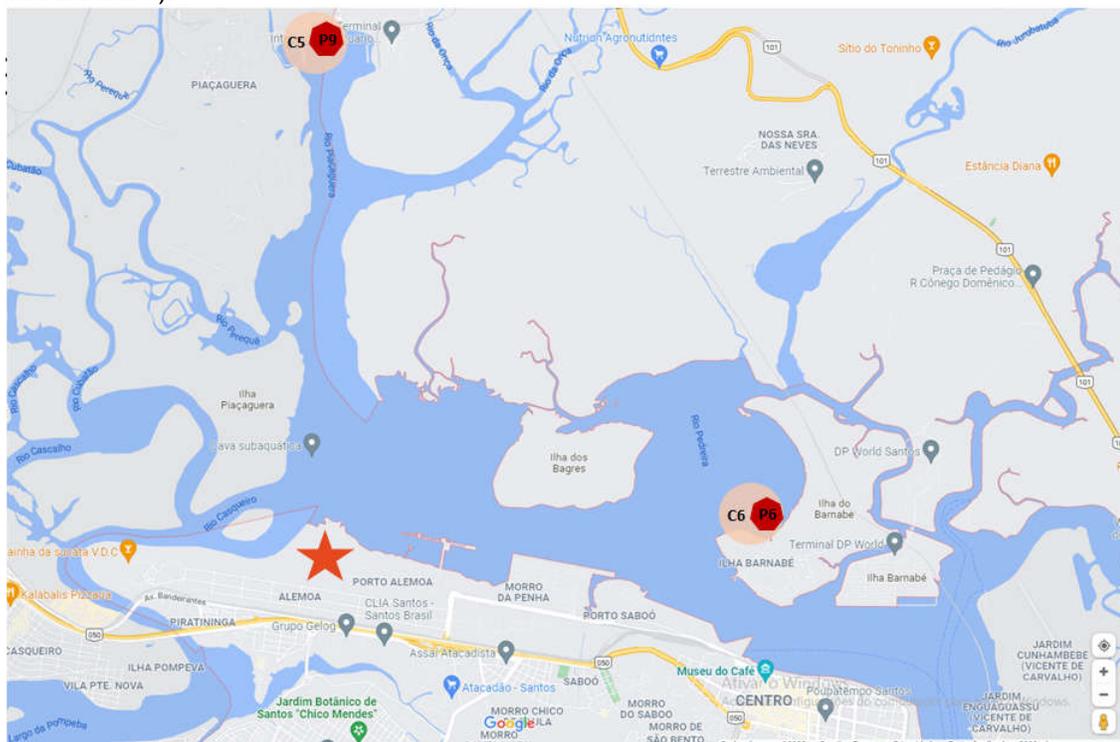
**2-** Criação da Secretaria do Meio Ambiente em 2001, consequência da crescente preocupação e conscientização dos danos que estavam sendo causados ao meio ambiental. No ano de 2005 a USIMINAS investe 1,1 bilhões para sanar os problemas ambientais, dentre os quais R\$ 240 milhões foram gastos em equipamentos de controle ambiental.

Valores comparáveis aos atuais ( $66.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) foram observados por BUELL e colaboradores (2021), em amostras dos Grandes Lagos no lado canadense (Rio São Lourenço) área também de estuário e local estratégico com histórico comercial e transporte de cargas, apresentando em seu entorno próspera região industrial. O rio São Lourenço passa pelas províncias de Ontário e Quebec, no Canadá, e pelo estado americano de Nova Iorque, servindo como fronteira entre os dois países, mostrando que possui perfil semelhante ao da Baixada Santista, também é local de

fácil escoamento de produtos já que o rio é navegável desde seu estuário até sua nascente (lago Ontário). Essas atividades ao longo dos anos contribuíram para a degradação e contaminação destes estuários. Outros locais no Brasil de mesmo perfil estuariano que reportaram concentrações com valores da mesma ordem de grandeza e superiores aos da CETESB de 2001 são: Baia de Guanabara 10 a 240395  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (FARIAS et al., 2008) e Porto de Fortaleza 3040 a 2234760  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (CAVALCANTE et al., 2009).

A segunda maior concentração (7529  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) foi observada no ponto de coleta **6**, no Rio Pedreira na margem da Ilha do Barnabé (Figura 51), local onde a CETESB em 2001 reportou valores bem menores (221-1395  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Este local conhecido como Canal de Navegação da Cosipa, sofre trânsito intenso de grandes embarcações pela proximidade do porto de Santos, além de possuir uma geografia propícia para a retenção de sedimentos provenientes de outros pontos mais impactados, já que a movimentação e transporte, juntamente com os contaminantes se dá no sentido rio → oceano tendo como fatores de influência as forças geradas pelos movimentos oscilatórios das correntes de maré e turbulência dentre outros fenômenos que acabam ocasionando a deposição do material nas margens. Outro fator que pode colaborar para as altas concentrações deste ponto é a proximidade dos tanques de armazenamentos (Porto da Alemoa ) da USIMINAS que em 2015 incendiou por 9 dias seguidos. Na literatura ALVES DE LIMA (2019) reporta valores parecidos encontrado em amostras de sedimento do Porto de Paranaquá (2,72 – 9662  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) localizado no estado do Paraná.

**Figura 52.** Pontos de coleta 9 (próxima USIMINAS) e ponto 6 no Rio Pedreira (margem da Ilha Barnabé).



**LEGENDA**

-  tanques de armazenamento COSIPA
-  ponto de amostragem 10/07/2017
-  ponto amostragem CETESB

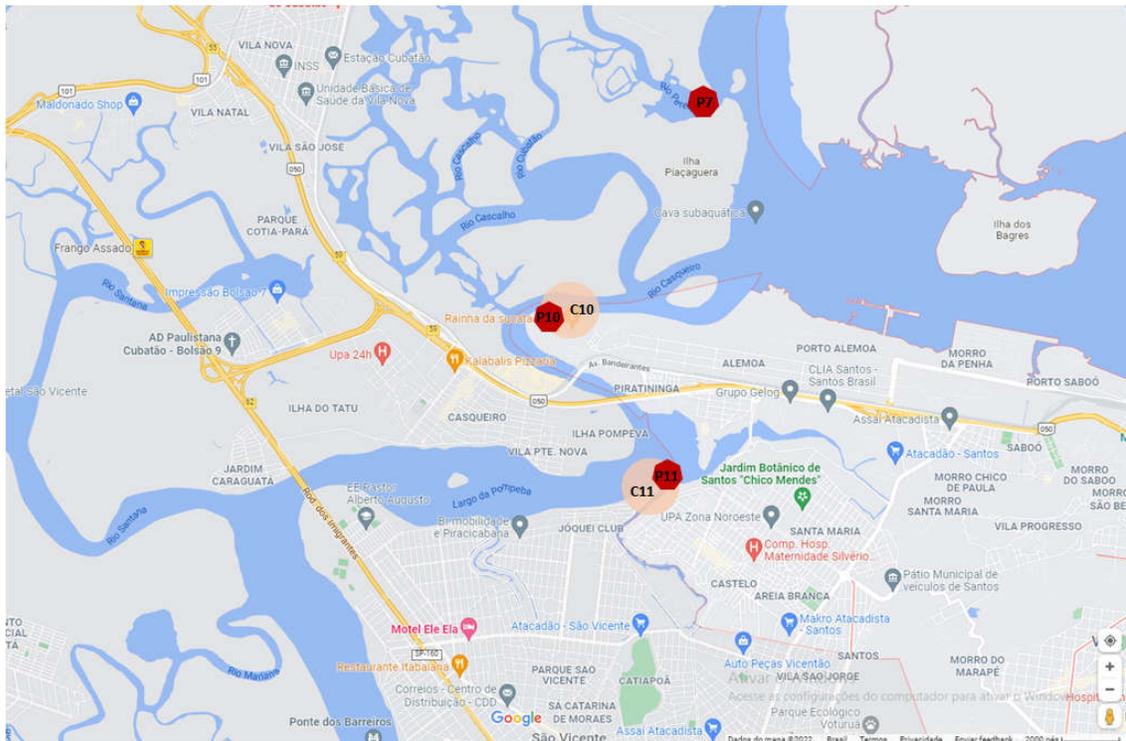
Fonte: googlemaps MODIFICADO

Os pontos 7, no Rio Perequê e 11 no Largo da Pompeba (Figura 53) apresentaram concentrações semelhantes, 4964 e 4300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente, sendo que o ponto 7, localizado no Rio Perequê, não encontra correspondência com nenhum ponto do estudo da CETESB (2001). Estando localizado próximo ao Rio Piaçaguera, onde se encontra o porto da Cosipa, local que apresentou as maiores concentrações de HPAs deste estudo. O ponto 11 é o local onde ocorreu o incêndio na favela de palafitas em 2017, que integra o Dique da Gilda, conhecido como Caminho de São Sebatião. Neste incêndio mais de 200 moradias foram destruídas e demorou mais de 2 horas para ser contido, além do local possuir características de mangue fortemente impactado, pelo crescimento desordenado urbano, não possuir saneamento básico, o descarte de lixo ocorre a céu aberto em terra e nos canais. Na coletada de amostras houve grande dificuldade de locomoção devido ao número abundante de resíduos que se encontravam na água, não permitindo a movimentação

da hélice, ocasionando a pausa do percurso para a remoção do lixo que impedia o funcionamento do motor. Os valores encontrados são próximos ao valor reportado por FENGLAN LI e colaboradores (2014)  $4480 \mu\text{g kg}^{-1}$  em amostras de sedimento de mangue de Futian no sul da China, uma das primeiras cidades a se desenvolver na região da Baía de Shenzhen (China), local populoso e com histórico de industrialização, mesmo cenário dos pontos **7** e **11** deste estudo.

Para o ponto **10** no Rio Casqueira (Figura 53) observamos uma concentração baixa de  $52 \mu\text{g kg}^{-1}$ , apesar da proximidade do Rio Cubatão e do Largo da Pompeba que apresentaram altas concentrações, o Rio Casqueira neste ponto não é influenciado por movimentos que transportam grande quantidade de sedimentos no sentido, Lagoa da Pompeba → Ponto **10** (sentido leste-oeste), recebendo vazão de água e sedimentos vindos do Rio Cascalho e pouca influência do Rio Cubatão que possui maior abertura de vazão para o sentido oeste, direção da Ilha Barnabé. ZANARDI LAMARDO e colaboradores (2019) reportou situação semelhante, no estudo realizado na Índia, em amostras de sedimento provenientes do Estuário do Rio Hooghly, dois pontos de coleta próximos apresentaram valores discrepantes, S7 ( $22^{\circ}52'N$ ,  $88^{\circ}10'E$ )  $1731 \mu\text{g kg}^{-1}$  e S8 ( $22^{\circ}01'N$ ,  $88^{\circ}22'E$ )  $14,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ , diferença de dez vezes entre os pontos. S7 possui influência direta de uma área portuária com intensa atividade náutica e S8 com localização próxima apresenta área de escoamento maior, possibilitando a vazão de contaminantes para o mar.

**Figura 53.** Pontos de amostragem do atual trabalho Rio Perequê P7 sem ponto CETESB correspondente, Rio Casqueira P10 e Largo da Pompeba P11 com respectivos pontos CETESB C10 e C11.



#### LEGENDA

- ponto de amostragem 10/07/2017
- ponto amostragem CETESB

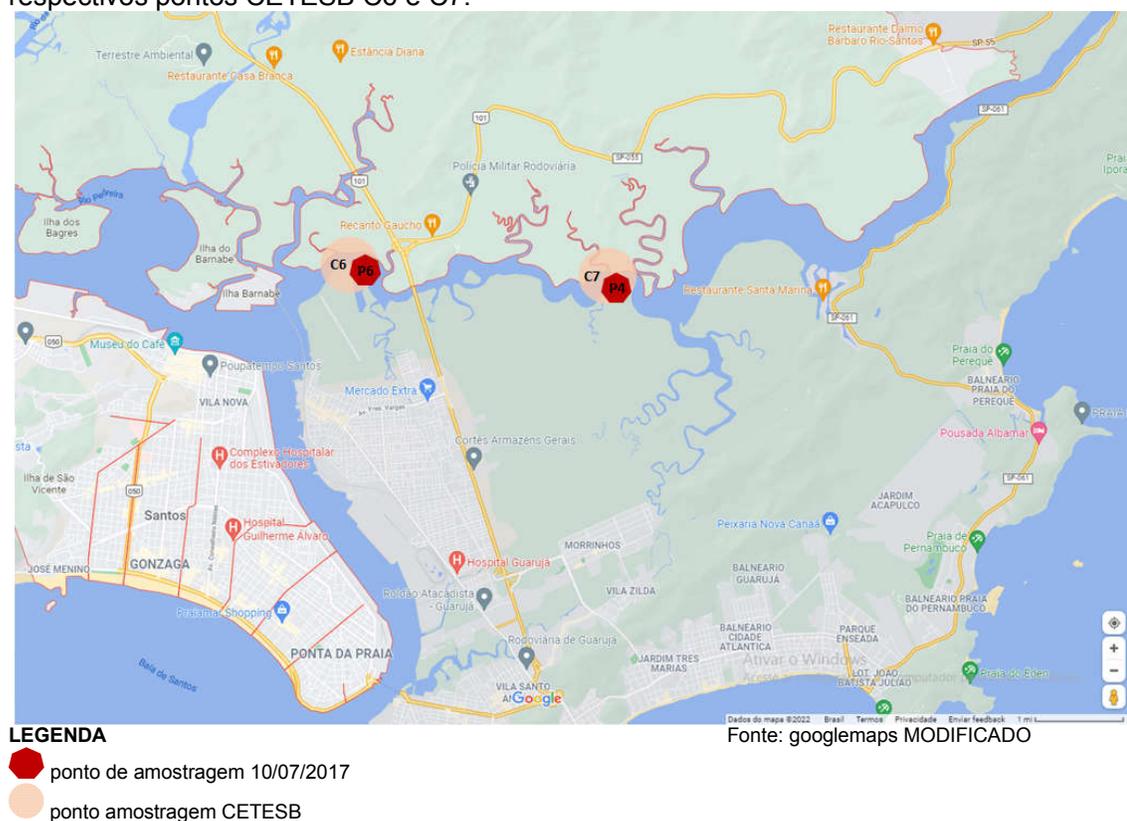
Fonte: googlemaps MODIFICADO

O ponto de coleta 4 (equivalente ponto CETESB 7,  $4794 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) apresentou concentração menor que a reportada em 2001,  $1122 \mu\text{g kg}^{-1}$ , neste ponto se encontra o aeroporto do Guarujá na (Figura 54), possível fonte de HPAs (combustível de avião) além disso, esta região é favorecida com a deposição de sedimentos oriundos das bacias contribuintes de Cubatão. Com a diminuição das atividades da USIMINAS é de se esperar que o sedimento não apresentasse concentrações tão elevadas de HPAs quanto as apresentadas em 2001 época em que a USIMINAS ainda fornecia material para a metalurgia primária. Concentrações desta magnitude foram observadas em amostras de sedimento superficial do Mangue de Guadaloupe, na França em 2012 ( $1065 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) em pontos próximo ao Aeroporto de Raizet (RANDINE et al., 2012) e em amostras provenientes do mangue em Baguang (Baía de Daya) na China,  $1262\text{-}1065 \mu\text{g kg}^{-1}$ , este local apresenta pouco desenvolvimento, poucas fábricas foram estabelecidas das últimas décadas, possuindo em seu entorno um meio ambiente considerado pouco impactado (LI et

al., 2014), porém algumas indústrias petroquímicas se estabeleceram nos últimos anos, o que pode explicar os valores próximos das duas regiões descritas anteriormente com proximidade a aeroportos.

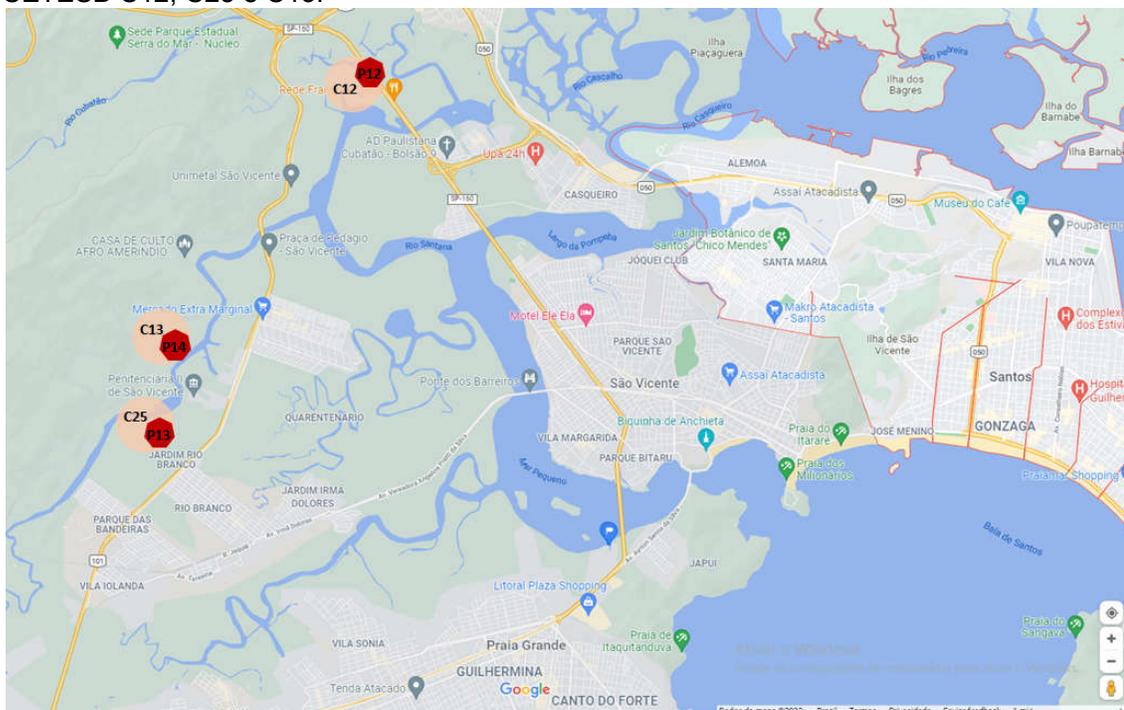
O ponto **3** (Figura 54) apresentou altas concentrações  $2595 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Este ponto está localizado a montante no mesmo canal que o ponto **4**, é correspondente ao ponto CETESB 24, que em 2001 não reportou concentrações consideráveis de HPA. Este local de amostragem está localizado no estuário de Bertioga, maior canal com desembocadura a oeste do Oceano Atlântico e leste possui conexão com o Canal do Porto de Santos, este canal possui limitada troca hídrica com os outros sistemas, segundo o reportado por CARVALHO V.O. (2016) podendo ser esta característica fundamental para acúmulo de HPAs. A concentração encontrada é comparável a concentração reportada por LI e colaboradores (2014) em amostras provenientes de *Waterland* estuário localizado no delta do Rio Zhujiang (Rio das Pérolas) na China em área de grande expansão industrial nos anos 80 e 90 (LI et al., 2014).

**Figura 54.** Canal de Bertioga, pontos de amostragem do atual trabalho P6 e P4 e respectivos pontos CETESB C6 e C7.



Para os pontos de coleta **12** (Rio Santana), **13** e **14** (ambos no Rio Boturoca) (Figura 55) observou-se concentrações semelhantes, 911, 877 e 940  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , os respectivos pontos CETESB são **12**, **25** e **14** com concentrações 37, sem valor reportado e 39  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , concentrações próxima entre si mas bem menores que os encontrados atualmente. Este aumento pode ser explicado pelo incêndio nos tanques da Alemoa, que ocorreu pouco tempo antes da coleta de amostras para o presente estudo e que sendo de grandes proporções pode afetar grandes extensões. Podemos relacionar este aumento com o desenvolvimento industrial, como aponta informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o PIB industrial da cidade de São Vicente passou de R\$ 193 para R\$ 414 milhões entre os anos de 1999 e 2015

**Figura 55.** Pontos de amostragem do atual trabalho P12, P13 e P14 e respectivos pontos CETESB C12, C25 e C13.



#### LEGENDA

- ponto de amostragem 10/07/2017
- ponto amostragem CETESB

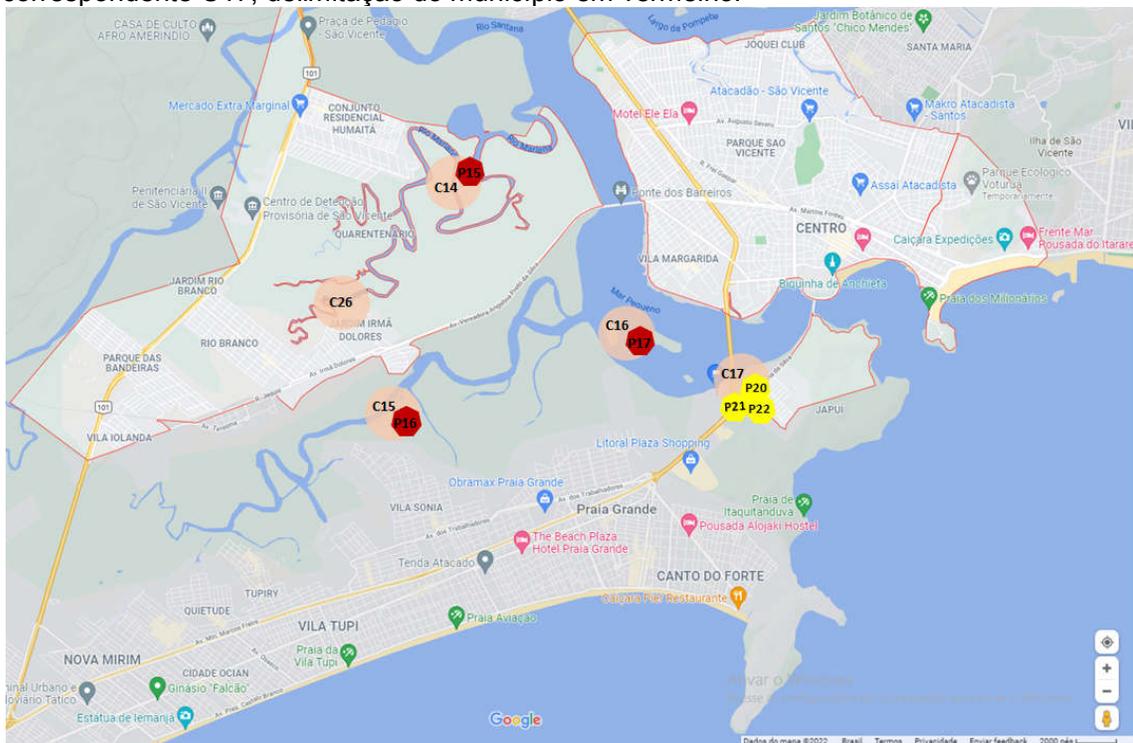
Fonte: googlemaps MODIFICADO

Os pontos **15**, **16** e **17** (Figura 56) apresentaram concentrações de, 210, 230 e 170  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente, sendo que os valores informados pela CETESB foram 39, 35 e 21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Como ocorreu para os pontos **12**, **13** e **14**,

estes pontos também apresentaram aumento nas concentrações quando comparados aos dados de 2001 (CETESB), podendo ser justificado também pelos acontecimentos recentes ou pelo aumento industrial demonstrado anteriormente na região de São Vicente. Os valores de concentrações estão de acordo com o reportado por HUANG e colaboradores (2022) em amostras de sedimento proveniente da região de mangue da Ilha *Ximen* ( $176,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e *Maoyan* ( $143,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) localizadas na Baía de *Yueqing* na China.

Na Figura 56, podemos observar que os pontos de amostragem 16 e 17 supra citados, estão em domínio do Município de São Vicente, justificando o uso dos valores de PIB deste município em específico.

**Figura 56.** Pontos amostragem do atual trabalho P15, P16 e P17 e respectivos pontos CETESB C14, C15 e C16, ponto de amostragens atuais P20, P21 e P22 e ponto CETESB correspondente C17, delimitação do município em vermelho.



**LEGENDA**

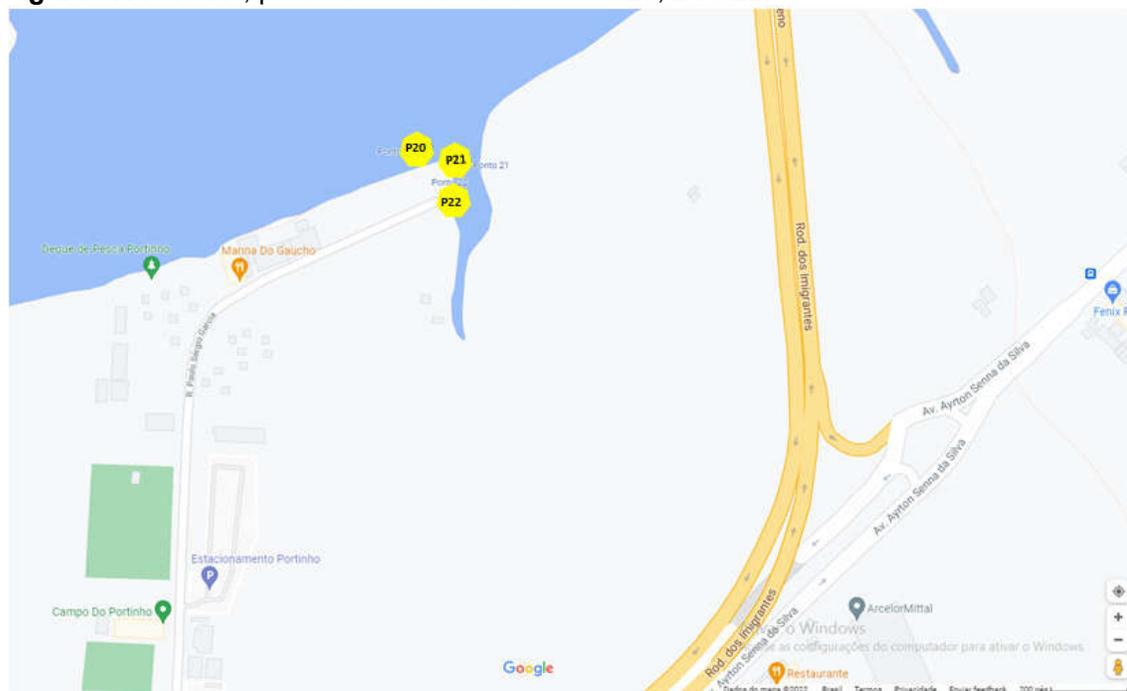
- ponto de amostragem 10/07/2017
- ponto de amostragem 11/07/2017
- ponto amostragem CETESB

Fonte: googlemaps MODIFICADO

As amostras do Portinho, pontos **20**, **21** e **22** (Figura 57) foram coletadas com pouco distanciamento, foram efetuadas desta forma devido as características distintas observadas em cada margem, a amostra **20** foi coletada na margem do Mar Pequeno, em área com vegetação, a amostra **21** e **22** foram coletadas no canal localizado ao final da Avenida Sérgio Garcia (Figura 57), sendo a amostra **21** proveniente da margem com pouca vegetação e a amostra **22** da margem contendo pedras e sem vegetação.

As três amostras podem ser correlacionadas com os pontos CETESB 16 e 17 (25 e 41  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Apêndice 1) estes pontos apresentaram concentrações de 371, 109 e 42  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que os valores obtidos neste estudo foram bem maiores que os observados em 2001, com exceção do ponto **22** que apresentou concentração de 42  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Figura 57.** Portinho, ponto de coleta das amostras 20, 21 e 22.



**LEGENDA**

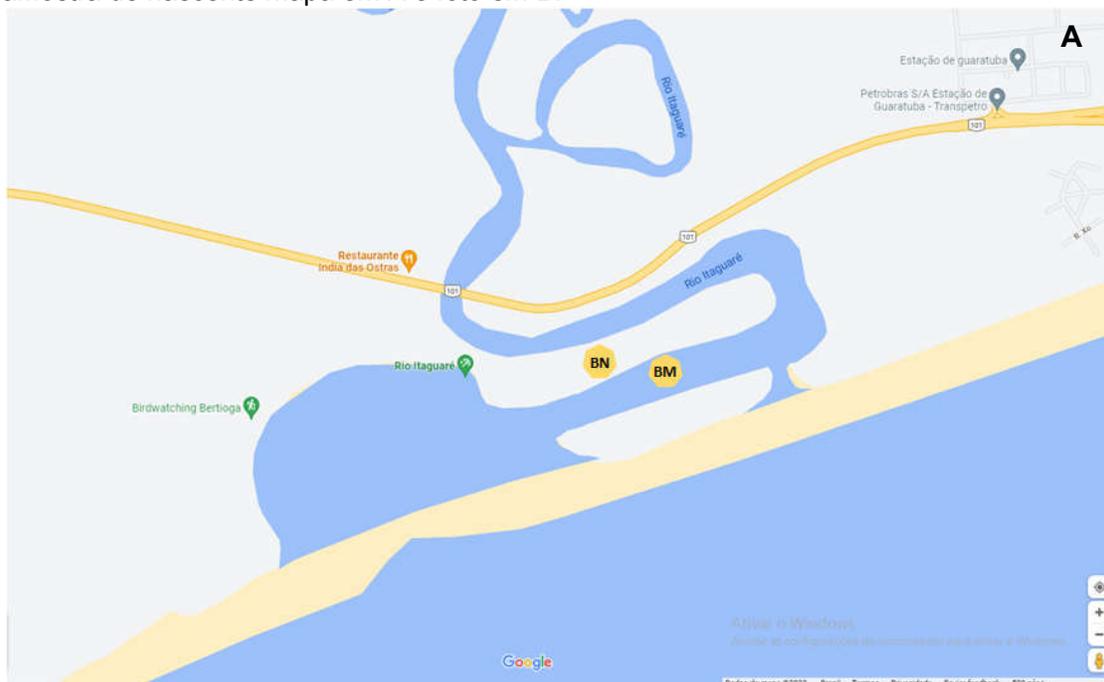
 ponto de amostragem 11/07/2017

Fonte: googlemaps MODIFICADO

#### 4.6.2. Concentrações dos Pontos Controle

Como pontos controle foram coletadas amostras em dois locais na cidade de Bertioga (litoral norte de SP), nas margens do Rio Itaguapé, amostra denominada **BM** e em uma pequena nascente amostra denominada **BN**, dentro de uma propriedade particular (Figura 58) a 20 metros do Rio Itaguapé. Para estes pontos foram obtidas as concentrações de 1913 e 882  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente, valores comparáveis as concentrações de locais impactados como observado neste estudo, ponto **3**, 2595  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e pontos **12**, **13** e **14** que apresentaram respectivamente 911, 877 e 940  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com forte influências antrópicas como discutido anteriormente. Provavelmente se a amostragem ocorresse dentro da Reserva Ecológica de Bertioga, os valores refletiriam uma área bem menos impactada, pois as amostras analisadas de Bertioga estão sob a influência de áreas de camping e proximidade com rodovias.

**Figura 58.** Pontos de coleta das amostras de Bertioga, BM amostra de mangue e BN amostra de nascente mapa em A e foto em B.



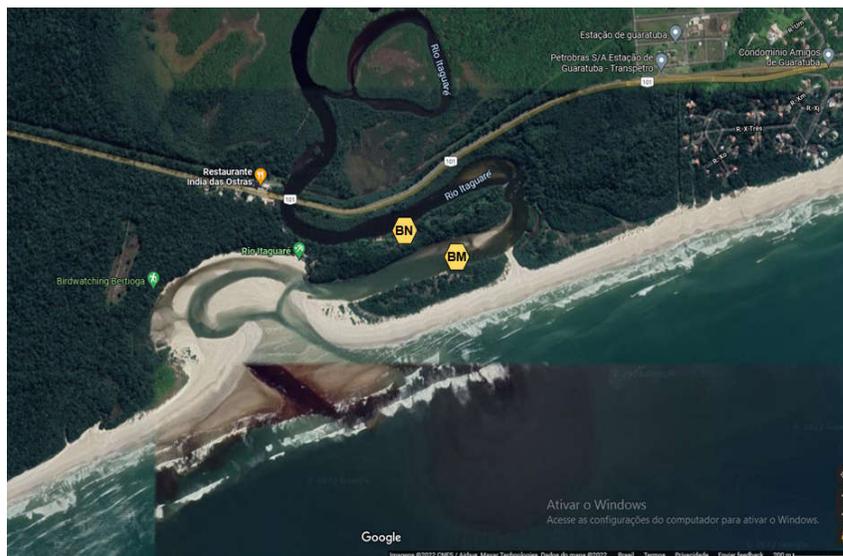
#### LEGENDA



ponto de amostragem Bertioga 13/07/2017

Fonte: googlemaps MODIFICADO

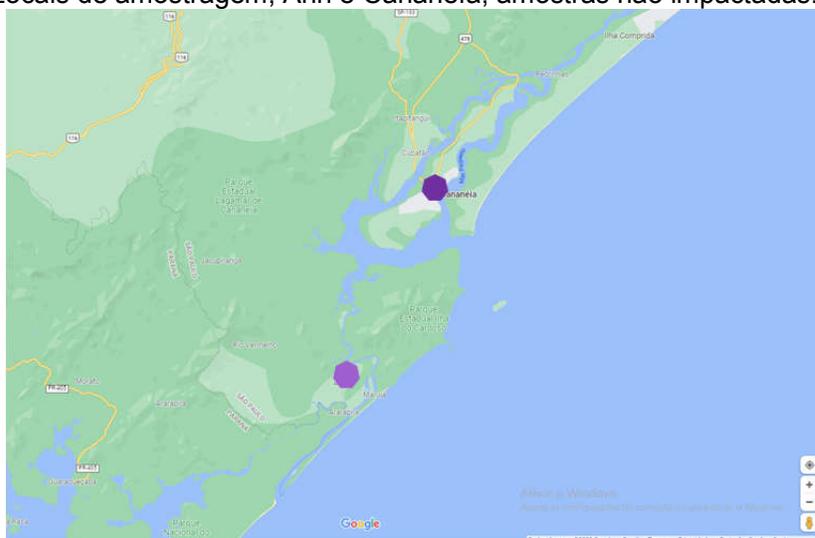
continuação Figura 58B:



Fonte: googlemaps MODIFICADO

Duas amostras provenientes de Cananéia e de Ariri (Figura 59) foram cedidas pela equipe do Professor Dr. Denis Abessa (UNESP, SãoVicente) como sendo exemplares de zonas não impactadas. **Ariri** e **Cananéia** se encontram na Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguapé-Peruíbe área de proteção criada pelo Decreto nº 91892, de 23 de outubro de 1984 com cerca de 202.308,43 hectares. Se localiza no litoral sul do estado de São Paulo na região sudeste do Brasil.

**Figura 59.** Locais de amostragem, Ariri e Cananéia, amostras não impactadas.



**LEGENDA**

-  local de amostragem Cananéia
-  local de amostragem Ariri

Fonte: googlemaps MODIFICADO

Para estes pontos as concentrações obtidas foram 31 e 104  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente, concentrações bem mais baixas que as amostras de Bertioga, denotando tratar-se de região pouco impactada. Na literatura alguns exemplos de locais com níveis de concentrações de HPAs semelhantes, que apesar de serem descritos como impactados, possuem influências de contaminação recentes quando comparadas as influências históricas da região estudada de Santos e São Vicente.

O estudo de SOUZA e colaboradores (2018) mostrou valores de 2,2-28,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para o somatório de HPAs em amostras de sedimento coletadas nas margens do Rio Poxim em Aracajú sendo as maiores concentrações encontradas nas amostras de mangue. O estudo associa estas concentrações ao maior teor de lama (partículas finas) nas amostras. Apesar do local aparentar ser impactado, os resultados não confirmam este fato, na região estudada há várias áreas de preservação permanente sendo uma delas local do estudo no Rio Poxim. RAMDINE e colaboradores (2012) encontraram concentrações de somatória de HPAs semelhantes aos encontrados em **Cananéia** e **Ariri**, 49; 88 e 99  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sendo provenientes de três locais: reserva natural, local com impacto urbano e industrial e local de impactos de zona urbana e plantação de cana de açúcar em Guadaloupe, território Francês, que consiste em um grupo de ilhas na cadeia das Pequenas Antilhas, no leste do Mar do Caribe.

#### 4.6.3. Concentração de de HPAs em sedimentos e Resolução CONAMA

Não há legislação brasileira específica, que estabeleça os limites máximos de HPAs em amostras sedimento. No entanto, a Resolução CONAMA 454 de 2012 estabelece os limites de alguns HPAs em material dragado, de água salobra nível 1 (limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeito adverso à biota) e nível 2 (limiar acima do qual há maior probabilidade de efeito adverso a biota). Para esta comparação usaremos apenas o nível 1 em águas salobras. Na Tabela 47 observamos os pontos de coleta que apresentaram valores acima do especificado pela Resolução, destacados em vermelho.

Das áreas amostradas podemos dividir em quatro grupos:

- 40-499  $\mu\text{g kg}^{-1}$ : não impactada (PONTOS **10, 15, 16, 17, 20, 21 e 22**)
- 500-1200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ : pouco impactada (PONTOS **4, 12, 13 e 14**)

- 1201-5000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ : impactada (PONTOS 3, 6, 7 e 8)
- >5000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ : extremamente impactada (PONTO 9)

**Tabela 47.** Concentração dos HPAs em cada amostra analisada e limites estabelecidos pelo CONAMA 454/2012 em ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e concentrações encontradas nas amostras coletadas, em vermelho os valores acima do determinado para nível 1

AMOSTRA	Acf	Flu	Fen	Ant	Flt	Pir	Cri	BaA	Dib	$\Sigma$ HPAs <sub>16</sub>
1	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	46	99	40	325	316	118	141	35	2595
4	-	25	116	25	97	109	41	40	-	1192
6	41	60	264	102	863	876	586	593	152	7529
7	71	147	270	72	38	32	347	435	34	4964
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	3226	4114	6316	3493	881	77	14383	902	572	66451
10	-	-	27	-	-	25	-	-	-	52
11	-	62	262	64	714	891	350	-	26	4300
12	-	-	23	-	-	116	89	-	30	911
13	-	-	98	17	102	154	89	-	19	877
14	-	-	70	19	-	211	49	64	16	940
15	-	-	6	-	42	54	-	-	-	210
16	-	-	-	-	44	50	30	-	-	230
17	-	-	36	-	24	34	-	-	-	170
20	-	-	24	24	32	52	24	28	-	371
21	-	-	31	-	31	27	20	-	-	109
22	-	-	-	-	-	22	-	-	-	42
ARI	-	-	52	-	-	28	-	-	-	104
CAN	-	-	31	-	-	-	-	-	-	31
BM	-	-	90	26	335	292	159	183	29	1913
BN	-	-	87	17	-	185	87	84	-	882
*ÁGUA SALOBRA NÍVEL 1	16	19	240	85,3	600	335	300	280	43	4000
*ÁGUA SALOBRA NÍVEL 2	500	540	1500	1100	5100	2600	850	690	140	-

LEGENDA: \*RESOLUÇÃO CONAMA 454-2012

número em vermelho: valores em desacordo com o especificado pelo CONAMA

De acordo com os valores preconizados pelo CONAMA 454 (2012) as áreas de amostragem, **6**, **7** e **9** apresentaram concentrações decorrentes de forte impacto ambiental, com valores acima dos permitidos para concentração de pelo menos 5 HPAs. A amostra do ponto **9** apresentou concentrações na faixa preconizada apenas para o pireno, para todos os demais e para a somatório (cerca de de 12 vezes acima) foi observado limite maiores do que o descrito pelo CONAMA.

As amostras **6**, **7** e **8** também extrapolaram os valores de somatório de HPA permitidos, colocando assim em risco a integridade dos seres que vivem nestas regiões, ou indivíduos que eventualmente consomem alimentos provenientes das mesmas.

#### **4.6.4. Relação entre as Concentrações de HPAs e Carbono Orgânico Total**

As amostras de sedimento coletadas neste trabalho foram peneiradas e a fração fina (<0,63  $\mu\text{m}$ ) de cada amostra foi analisada no equipamento TOC-50000A (Shimadzu) com catalisador de sensibilidade normal. Este equipamento mede a quantidade de CT (carbono total) e CI (carbono inorgânico) da amostra. O COT é dado pela subtração de CT e CI medidas foram efetuadas no laboratório LaPOA (Laboratório de Processos Oxidativos Avançados) no Instituto de Química da UNESP.

Em triplicata as amostras, foram pesadas (1,0 g) em falcons de vidro, adicionou-se 10 mL de água destilada em seguida as amostras foram agitadas por 30 segundos com a utilização de vórtex e colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos seguida de centrifugação. O sobrenadante foi retirado e submetido à análise (NOGUEIRA e MODÉ, 2002), as médias dos valores estão sumarizadas na Tabela 48 juntamente com os valores de concentração para  $\Sigma$ HPAs encontrados nas respectivas amostras, os resultados foram normalizados dividindo-se o valor de concentração encontrada pelo valor do de carbono orgânico total medido (Tabela 48).

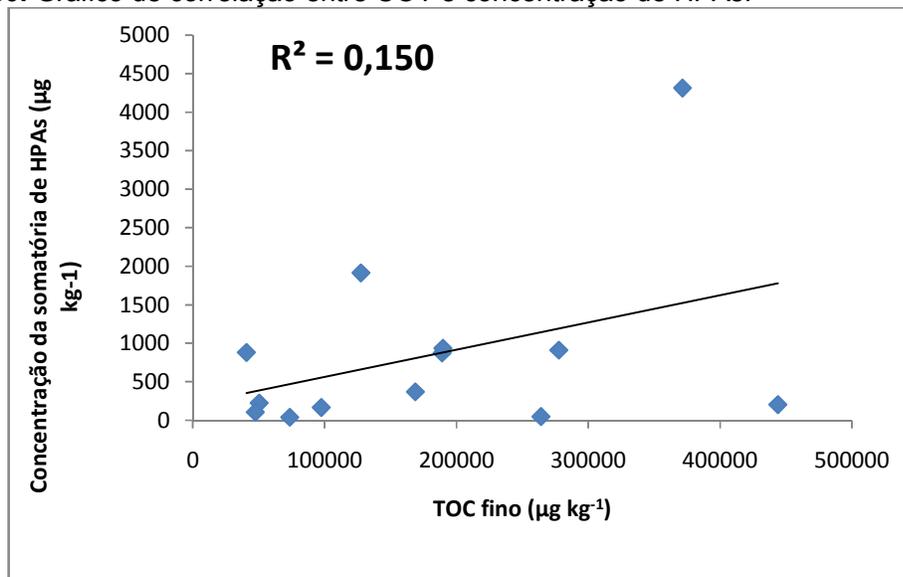
**Tabela 48.** Concentrações de HPAs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), análises de carbono orgânico total do sedimento fração final ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), normalização dos resultados.

AMOSTRA	TOC fino	$\Sigma 16$ HPA	$\Sigma 16$ HPA/TOC fino
1	25600	21	0,001
2	-	-	-
3	387800	2595	0,007
4	459800	1192	0,002
6	-	7529	-
7	48160	4965	0,103
8	-	-	-
9	95160	66451	0,698
10	264000	52	0,0002
11	371400	4309	0,012
12	277600	912	0,003
13	189080	877	0,005
14	189640	937	0,005
15	443800	206	0,0004
16	50180	226	0,005
17	97340	168	0,002
20	168760	372	0,002
21	47300	109	0,002
22	73420	42	0,001
<b>BM</b>	127380	1913	0,015
<b>BN</b>	40540	882	0,022

LEGENDA: -sem resultados

No geral, os dados não apresentam correlação entre o teor de carbono orgânico na amostra e a concentração de HPAs segundo o coeficiente de correlação apresentado 0,150 (Figura 60), este fato está de acordo com o descrito por SILVA (2012) onde também não observou a influência do COT nas concentrações de HPAs.

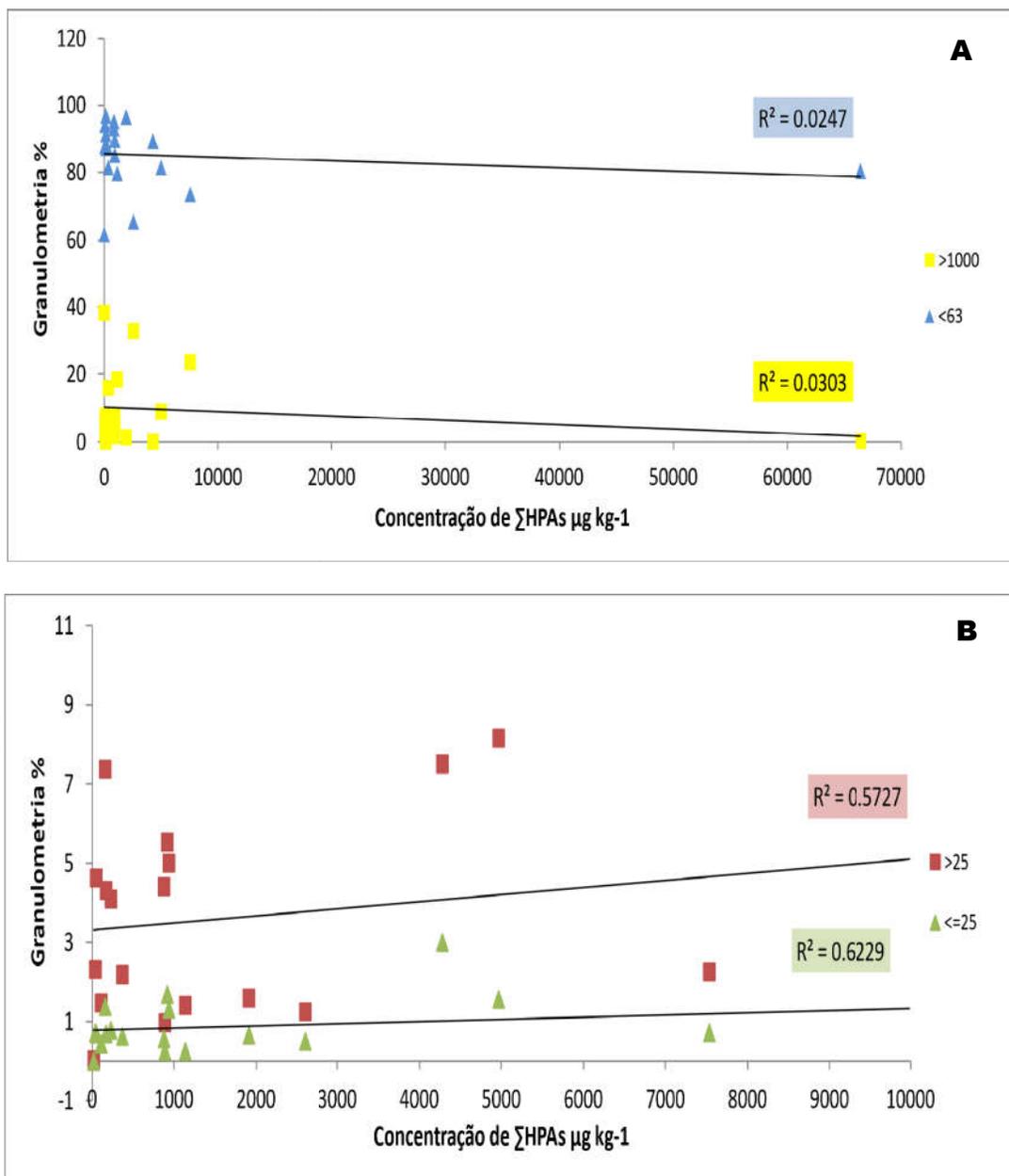
Porém observamos na normalização efetuada que as amostras **7** e **9** apresentaram os maiores valores, indicando e nas amostras a quantidade de HPAs por carbono orgânico presente é maior que nas demais.

**Figura 60.** Gráfico de correlação entre COT e concentração de HPAs.

#### 4.6.5. Relação entre as Concentrações de HPAs e Análise Granulométrica

Considerando-se a análise granulométrica (Apêndice 3) o somatório de concentrações de HPAs apresentou correlação irrelevante, menor do que 0,03 (Figura 61A) com as frações de partículas (>63 µm e >1000 µm) do sedimento. Para as frações mais finas (fração >25 e ≤ 25 µm) as correlações foram mais expressivas, aproximadamente 0,6 (Figura 61B). Esse fato está de acordo com o descrito por SILVA (2012) que observou valores de correlação próximas a 0,6 entre a quantidade de partículas mais finas (argila e silite) e a quantidade de HPAs, indicando que o tamanho das partículas pode influenciar nos processos de absorção ou adsorção de contaminantes. Os dados de correlação se encontram na Figura 61.

**Figura 61.** Gráfico de coeficiente de correlação entre as concentrações de HPAs e os resultados da análise granulométrica das amostras.



#### 4.6.6. RATIOS

Foram calculadas algumas razões de diagnósticos utilizando as concentrações de HPAs encontradas nas amostras de sedimento, para verificar quais as possíveis fontes de contaminação. Todos os valores de ratios e as possíveis fontes estão sumarizadas no Apêndice 2.

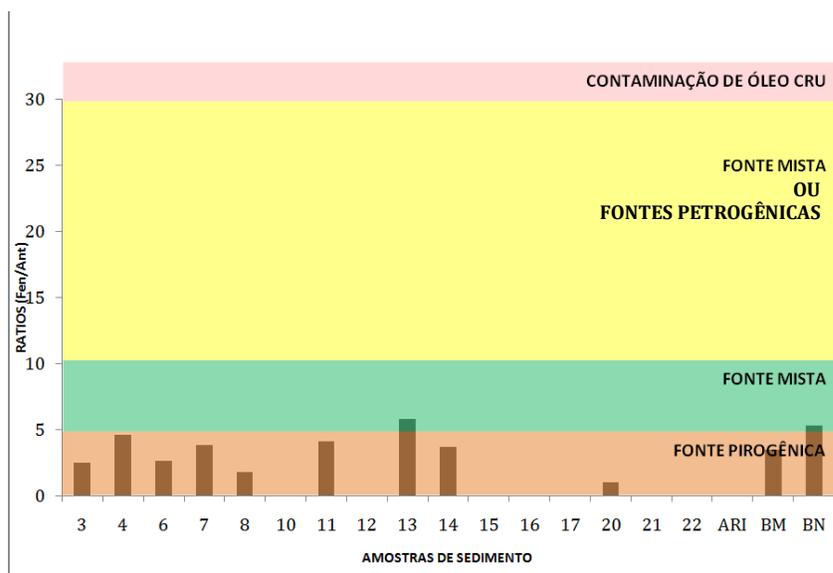
A razão fenantreno e antraceno (Fen/Ant) é baseada na estabilidade termodinâmica, fenantreno é o isômero mais estável, resultando em valores elevados para indicar as fontes petrogênicas e menos elevados para fontes pirogênicas.

Na Figura 62 observamos um gráfico contendo os ratios calculados em cada amostra e as faixas das razões de diagnóstico, separadas por cores de acordo com o provável diagnóstico, laranja para fonte pirogênica, verde e amarelo para fontes mistas e rosa para contaminação de fontes petrogênicas, não havendo praticamente nenhuma indicação de fontes pirogênicas. A região amarela de fonte mista se sobrepõe a fontes pirogênicas distintas como a combustão de carvão, diesel e creosoto (10~30), se estas fontes forem improváveis o diagnóstico é baseado na probabilidade de fonte petrogênica. As razões de quase todas as amostras indicaram possível fonte pirogênica, com exceção da amostra **13** e da amostra da nascente em Bertioga (**BM**), estas duas amostras estão em um intervalo de razão que sobrepõem duas possíveis fontes:

- intervalo de **fonte mista** (5~10): fonte pirogênica de 5 a 9, indicando gasolina combustível, influência de rodovias e carvão de baixo nível (carvão com baixo índice de carbono)

Esta razão é bastante afetada pela mobilidade das moléculas e pela volatilidade dos compostos.

**Figura 62.** Resultados do ratio (Fen/Pir) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.

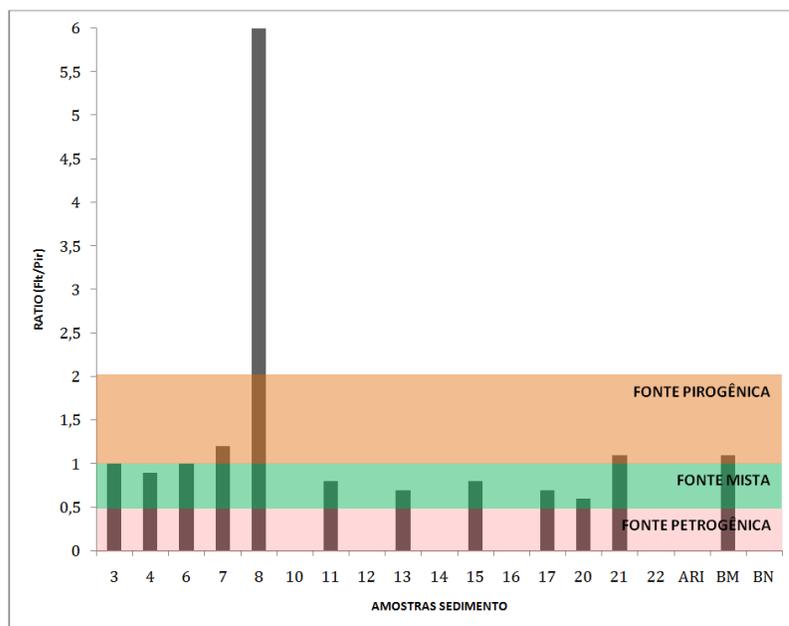


A razão fluoranteno e pireno Flt/Pir também é baseada na estabilidade térmica sendo o pireno termodinamicamente mais estável que o fluoranteno, esta razão é mais sensível na indicação das prováveis fontes de origem quando comparada a anterior (YUNKER et al., 2002). Para as amostras analisadas as prováveis fontes são (Figura 63), fonte mista para as amostras de 3~6 e 11~20 e fontes pirogênicas para as amostras 7, 21 e BM (Bertioga mangue). A amostra 8 apresentou valor muito superior aos valores de razões observados na literatura.

Há algumas sobreposições para esta razão:

- no intervalo de **fontes petrogênicas** ( $\leq 0,5$ ): combustão de diesel e alguns lubrificantes;
- no intervalo de **fontes mistas** ( $0,5 \sim 1,0$ ): emissões de automóveis (YAN et al., 2005).

**Figura 63.** Resultados do ratio (Flt/Pir) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.



Alguns autores descrevem a maior eficiência da razão Flt/Pir quando utilizado em conjunto com a razão Fen/Ant. A vantagem da utilização em conjunto é a maior estabilidade da razão Flt/Pir quando aplicados a uma grande faixa de concentração, pois ambos possuem mesma velocidade de degradação (DE LUCA et al., 2004 e YUNKER et al., 2002).

Outro parâmetro para indicar se a possível fonte é pirogênica ou petrogênica é a razão BaA/Cri. O benzo(a)antraceno é formado preferencialmente durante a combustão, resultando em maiores valores de razão para indicar fontes pirogênicas e menores petrogênicas (YUNKER et al., 2002). Esta razão possui intervalos sobreponíveis, sendo necessário estabelecer os critérios a serem utilizados:

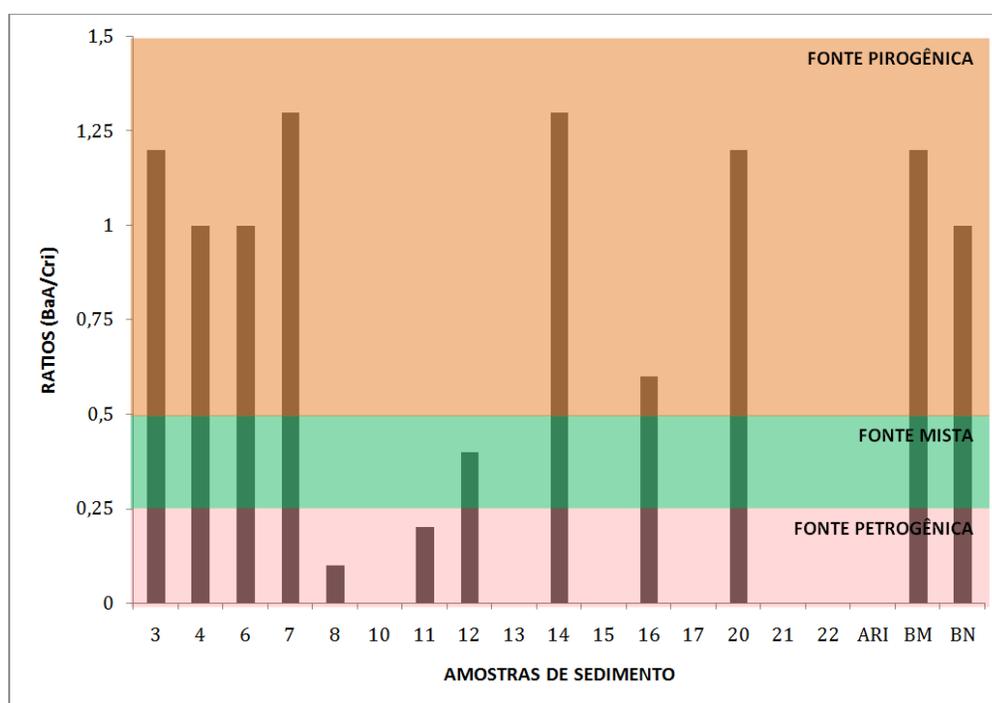
- valor de transição entre as fontes : 1 (BaA/Cri < 1 fonte petrogênica e >1 fontes pirogênicas, porém valores acima de 1 podem indicar gasolina e abaixo de 0,5 creosoto, combustão de gasolina, diesel e carvão (DE LUCA et al., 2004). Outra exceção apontada engloba a combustão de antracinas e alguns tipos de diesel que podem mostrar valores abaixo de 0,25.

Na Figura 64 podemos observar que as amostras com provável fontes pirogênicas são de **3 a 7, 14, 20, BM e BN**, aplicando o critério de que o limiar de

separação é o 1. A amostra **16** está no intervalo que indica fontes pirogênicas, mas que se sobrepõem a outros critérios que consideram o limiar em 0,5. Fontes mistas apenas a amostra **12** e pela primeira vez há um diagnóstico de fonte predominantemente petrogênica para as amostras **8** e **11**.

O ponto **11** se encontra próxima do Dique da Gilda, da Alemoa e do Porto de Santos, local movimentado por embarcações e com possível influência de queima de diesel, sendo englobado nas exceções desta razão. O ponto **8** se encontra mais retirado da rota de embarcações, devendo ser investigado a possíveis atividades que utilizem a queima de antracinas ou diesel nas proximidades deste local. Na ausência destas atividades, a provável fonte petrogênica deve ser cogitada.

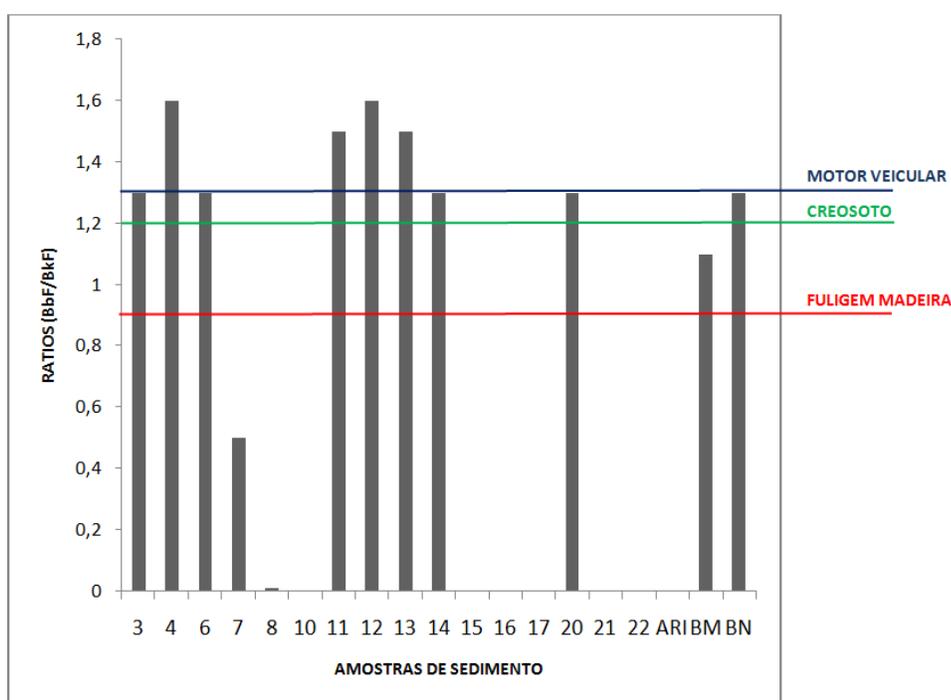
**Figura 64.** Resultados do ratio (BaA/Cri) e diagnósticos sugeridos para as amostras de sedimento.



A razão diagnóstica calculada com os isômeros benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno é uma ferramenta complementar que ajuda a distinguir algumas fontes pirogênicas distintas. Os limites estabelecidos para cada fonte pode ser observado na Figura 65.

Segundo esta razão ponto **BM** possui fonte pirolítica com grande influência da queima de biomassa, enquanto os demais pontos, com exceção de **7** e **8**, possuem maior probabilidade da fonte ser veicular, queima de combustível. As amostras **7** e **8** apresentaram valor bem abaixo do reportado para o diagnóstico utilizando esta razão. Esta ferramenta possui uma limitação para este estudo, ele não é afetado por degradação aeróbia e evaporação, porém no mangue também ocorre a degradação anaeróbica, limitando a interpretação com o uso desta ferramenta.

**Figura 65.** Razões BbF/BkF em amostras de sedimento e prováveis fontes.

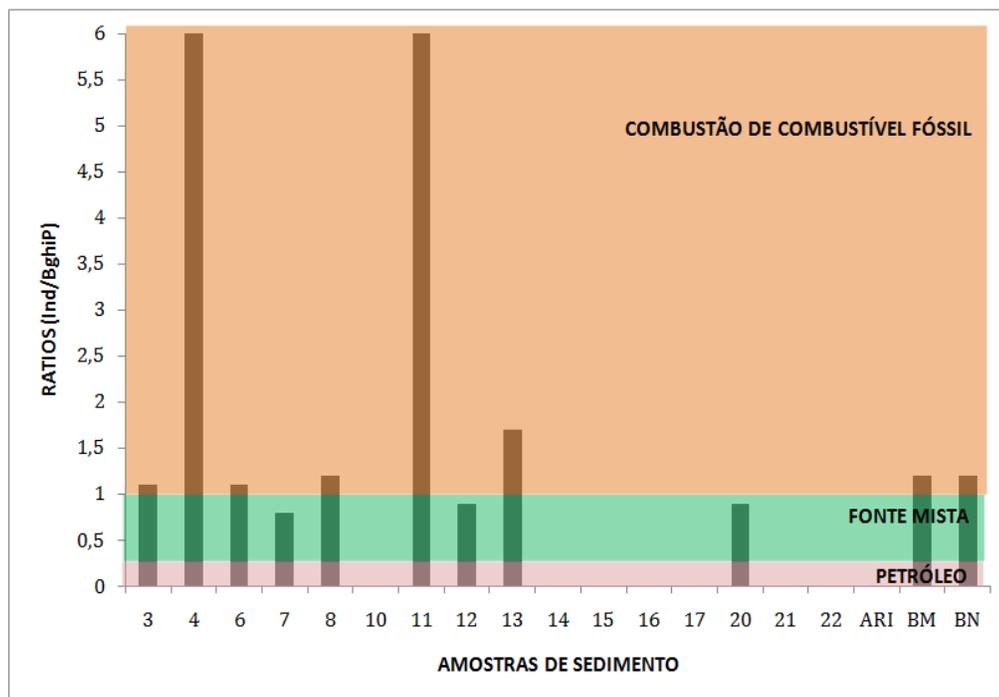


O cálculo da razão Ind/BghiP, assim como a anterior auxilia na identificação da provável fontes pirolíticas e também possui intervalos para a diferenciação entre fontes pirolíticas e petrogênicas. Esta razão tem sido bastante utilizada em amostras de sedimento (ZANG et al., 2005 e VAN DROOGE et al., 2012). Não foi observado prováveis fontes petrogênicas dentre as amostras de sedimento analisadas (Figura 66), o que condiz com o reportado na literatura, que poucas fontes petrogênicas são diagnosticadas quando comparadas as fontes pirogênicas.

Segundo esta razão as amostras estão divididas entre prováveis fontes mista (amostras **7**, **12** e **20**) e pirogênicas, a queima de combustível fóssil, as amostras **3**,

**4, 6, 8, 11, 13, BM e BN**, sendo que as amostras **4** e **11** apresentaram valores bem mais elevados que os observados na literatura.

**Figura 66.** Razões Ind/BghiP em amostras de sedimento e prováveis fontes contribuintes



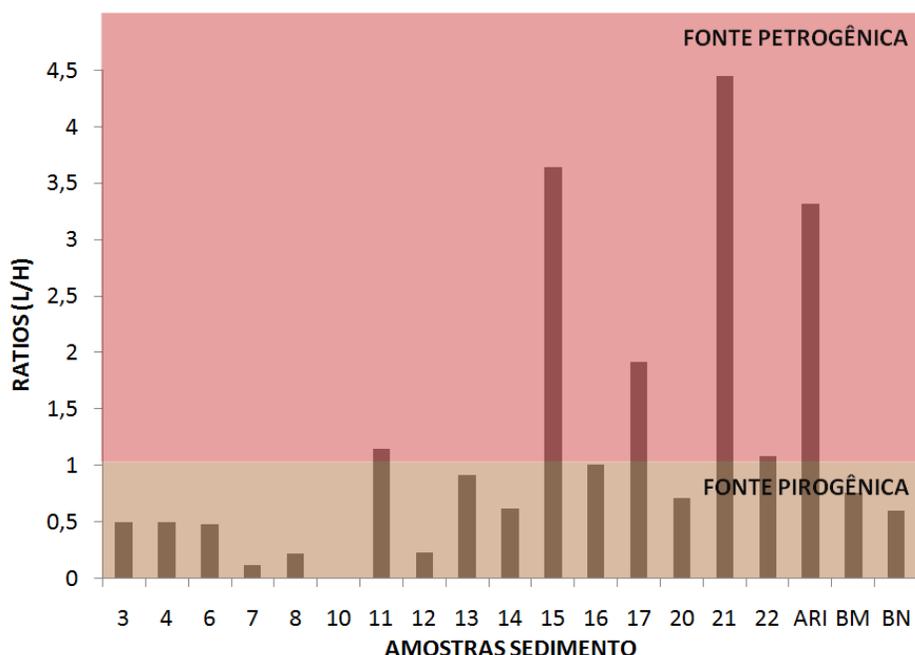
Na literatura encontramos razão de somatório dos HPAs para o diagnóstico das possíveis fontes emissoras, podendo ser a somatória de 11 HPAs, sendo os 16 prioritários com exceção do naftaleno, fluoreno, acenafteno, acenaftileno e benzo(b)fluoranteno, separados entre os HPAs mais leves (L) e os mais pesados (H) de acordo com a Equação 2 (página 42).

Nesta razão os valores acima de 1 indicam prováveis fontes petrogênicas e abaixo de 1, fontes pirogênicas. As exceções que encontramos nesta razão são algumas fontes pirogênicas que são comuns no local estudado como queima de diesel, carvão, alcatrão de carvão, etc (DE LUCA et al., 2004) que apresentam valores de razão maiores que 1.

No diagnóstico das possíveis fontes de HPAs nas amostras deste trabalho utilizando a razão (L/H) observamos na Figura 67, que a maioria das amostras apontam provável fonte pirogênica, com exceção dos pontos **10, 15, 17, 21** e **Ariri**

que apresentam valores bem acima de 1, respectivamente 1,1; 3,64; 1,92; 4,45 e 3,32, indicando possíveis fontes petrogênicas.

**Figura 67.** Razões de diagnóstico com a soma de 11 HPAs prioritários (L/H) em amostras de sedimento.



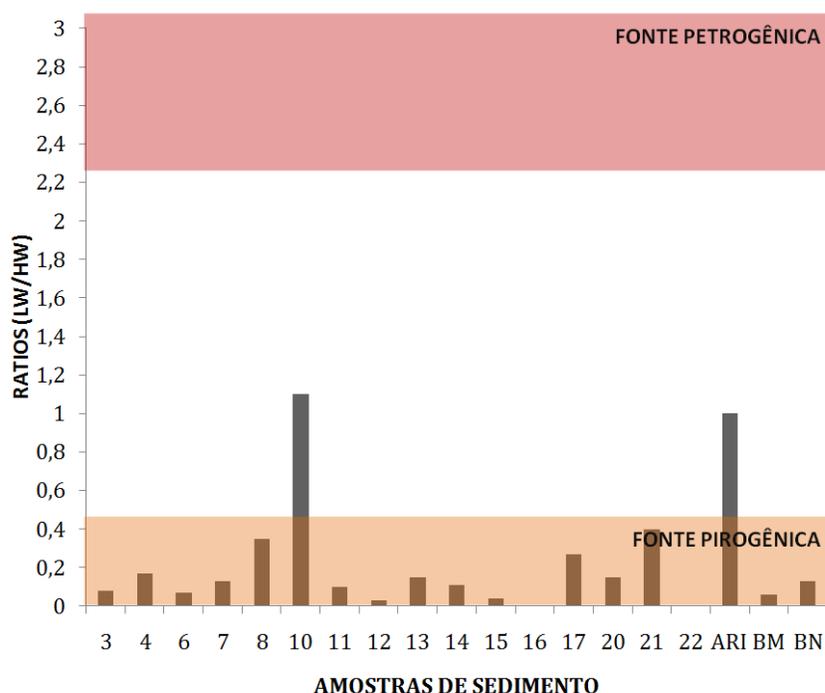
Para estas amostras que apresentaram valores de razão acima de 1 o mais provável é que se enquadram nas exceções, como a queima de diesel, combustível utilizado nos barcos de navegação que circulam no Mar Pequeno, local de coleta dos pontos **17** e **21** e próximo ao ponto **15**, o ponto **10** também se encontra na rota das embarcações e apresentou valor próximo do limite (1,1). Para a amostra de **Ariri** é preciso maiores investigações do ponto de coleta exato, pois a possibilidade de fonte petrogênica não pode ser descartada.

Outra razão que utiliza a somatória das concentrações dos 16 HPAs prioritários, organizados em dois grupos, HPAs pesados de 4 a 6 (HW) e leves de 2 a 3 anéis aromáticos (LW), o cálculo é feito de acordo com o mostrado na Equação 3 (página 42). Os limites descritos para esta razão são, fontes pirogênicas menor que 0,4 e fontes petrogênicas normalmente apresentam razão maior que 2,3 (TOBISZEWSKI e NAMIESNIK, 2012).

As amostras de sedimento apresentaram razões da somatória dos HPAs como as mostradas na Figura 68. Todas as amostras com exceção das amostras **10** e **Ariri**, apresentaram razões que indicam contribuição prevalente de fonte pirogênica.

As amostras 10 e Ariri apresentaram valores de razão que indicam fonte mista.

**Figura 68.** Razões de diagnóstico da somatória de HPAs, pesados de 4 a 6 (HW) e leves de 2 a 3 anéis aromáticos (LW).



Os resultados de razão diagnóstico utilizando a soma dos HPAs mostraram concordância com a maioria dos pontos, os pontos de **3 a 8, 11 a 14, 16, 20, 22, BM** e **BN** para as duas diferentes razões de soma, concordaram com o diagnóstico de fonte pirogênica, para a amostra **15** e **17** as razões divergem, a primeira indicando possível fonte petrogênica e a segunda fonte mista e por último a amostra **10** e **Ariri**, na primeira razão a possível fonte é petrogênica e na segunda fonte mista.

Todas as amostras, pelo contexto histórico e informações da dinâmica de atividades antropogênicas do local de amostragem, são fortemente influenciadas por fontes pirogênicas, como a queima de combustível fóssil que em quase todas as razões aplicadas se encontra na exceção, sobrepondo os valores que indicariam contribuições de fontes mistas ou petrogênicas.

Para a amostra de Ariri não dispomos de informações suficientes para analisar, mas sabemos pela literatura que as fontes petrogênicas são mais escassas, sendo as fontes pirogênicas as mais abundantes e prováveis.

#### 4.6.7. Comparação entre as concentrações de HPAs encontradas em sedimento e em *Spartina alterniflora* coletados no mesmo ponto

Em alguns pontos foi possível coletar amostras de sedimento e de *Spartina alterniflora* possibilitando a comparação entre as concentrações encontradas nas duas matrizes.

As maiores concentrações encontradas em sedimentos coincidem com as maiores concentrações encontradas na SA<sub>total</sub> (somatória das concentrações na mesma planta de raiz e caule+folha) e este comportamento prevalece para todos os pontos (Tabela 51). A medida que as concentrações decrescem na Tabela 51, as concentrações totais da SA<sub>total</sub> seguem praticamente o mesmo padrão.

**Tabela 49.** Valores de concentrações ( $\Sigma$  HPA, ng g<sup>-1</sup>) para amostras de sedimento e *Spartina alterniflora* coletadas nos mesmos pontos (Figura 19, pag 80).

Sedimento		<i>Spartina alterniflora</i>			
PONTO		PONTO	SA <sub>C+F</sub>	SA <sub>R</sub>	SA <sub>total</sub>
7	4964	D	722	859	1581
11	4300	E	457	501	958
15	210	G	163	239	403
17	170	H	166	462	629
20	371	I	139	177	316
21	109	J	185	163	348

**LEGENDA:**

SA<sub>C+F</sub> caule+folhas de *Spartina alterniflora*

SA<sub>R</sub>raiz de *Spartina alterniflora*

SA<sub>total</sub> = SA<sub>C+F</sub> + SA<sub>R</sub>

As amostras podem ser analisadas em três grupos, GRUPO 1 de alta concentração (amostras sedimento 7 e 11 e respectivas SA, D e E), GRUPO 2 com as amostras de concentrações médias e baixas (amostras de sedimento 15 e 17 e

SA respectivos **G** e **H**) e amostras coletadas em pontos próximos, denominado Portinho (amostras sedimento **20**, **21** e **22** e SA, **I** e **J**).

Para o GRUPO 1 observamos as maiores concentrações no sedimento, pontos **7** e **11** e maiores concentrações de SA<sub>total</sub> nas amostras **D** e **E**. As amostras de SA mostram concentrações semelhantes para as partes analisadas separadamente do mesmo indivíduo, para D temos SA<sub>C+F</sub>= 722 e SA<sub>R</sub>=859 ng g<sup>-1</sup> e para a amostra **E** temos SA<sub>C+F</sub>= 457 e SA<sub>R</sub>=501 μg kg<sup>-1</sup>. A grande diferença é a concentração total nas SA destes mesmos locais, que apresentaram concentrações próximas sendo a concentração na amostra **E** relativa ao ponto **11**, 50% menor que a encontrada em **D**. O ponto **7** possui um histórico de contaminação constante desde a fundação da COSIPA nos anos 1970, com diminuição em 2015 com o fechamento da metalurgia primária, proporcionando um tempo de exposição maior com a vegetação contida nestes ponto. Caso a vegetação seja invasiva como a SA, as concentrações de contaminantes orgânicos no sedimento rapidamente podem ser capturadas por esta espécie que é conhecida pelo grande potencial de remoção dos HPAs em sedimento (HUANG et al., 2022).

O Grupo 2, formado pelas amostras dos pontos **15** e **17** com respectivas amostras de *Spartina alterniflora*, **G** e **H**, apresentaram as concentrações observadas na Tabela 51, o sedimento apresentou diferença de 20%, enquanto as concentrações nas partes aéreas (caule e folhas) são praticamente as mesmas, o que não foi observado nas amostras de raízes dos mesmos indivíduos, apresentando uma diferença de 100%, indicando que apesar da concentração de HPAs no meio onde as *Spartinas alterniflora* se desenvolveu, serem semelhantes, houve maior absorção de HPA nas raízes para o indivíduo **H**, mais especificamente, para o fenatreno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(g,h,i)perileno (Tabela 43, pag 168-170).

Na literatura há relatos das variáveis que influenciam na dinâmica dos contaminantes orgânicos em sedimento e na vegetação próxima, uma das mais interessantes seria o tempo e quantidade de exposição aos diversos contaminantes ambientais. A presença de contaminantes altera a microbiota e conseqüentemente as características que potencialmente influenciam na absorção, translocação de contaminantes orgânicos e inorgânicos, como pH, porcentagem de matéria orgânica, salinidade, dentre outras. O HPA que mais afetada a dinâmica da microbiota é o

fenantreno (HONG et al.,2014), que na amostra **H** apresentou concentrações cinco vezes maiores quando comparado a amostra **G**.

Além destes fatores podemos observar as diferenças nos pontos onde as amostras foram coletadas, o ponto **H** no Mar Pequeno, se encontra na rota de transporte, sofrendo constante influência das embarcações e do tráfego das rodovias próximas que ligam o município de Praia Grande a São Vicente, enquanto o ponto **G** se localiza no Rio Mariana, área com menos influências comparada a área do Mar Pequeno.

O Grupo 3 é composto por amostras de sedimento coletados em pontos próximos, enquanto a amostra **20** foi coletada na margem do Mar Pequeno contendo vegetação, as outras duas foram coletadas na margem de uma entrada do Mar Pequeno, sendo a amostra **21** proveniente da margem com vegetação e a **22** da parte da mesma margem sem vegetação. Maior concentração no sedimento foi da margem do Mar Pequeno, local com características iguais aos do ponto **17**, as demais amostras **21** e **22** apresentaram baixas concentrações comparada a anterior e diferentes entre si, concentrações comparáveis com pontos pouco impactados. As amostras de *Spartina alterniflora* não mostraram diferenças em suas concentrações totais e individuais dos HPAs, devido a proximidade dos pontos de coleta. Para que houvesse melhor investigação de influência da presença de vegetação em amostras de sedimento seria necessário um estudo com diversos indivíduos e campanhas de coleta em diferentes épocas, considerando as variações climáticas e hidrodinâmicas dos locais de amostragem para valiar a influência que a vegetação pode proporcionar. Na literatura há diversos estudos que reportam investigações deste tipo que concluem pela existência desta influência (MARTINEZ et al., 2007; SYED et al., 2021; JI et al., 2014).

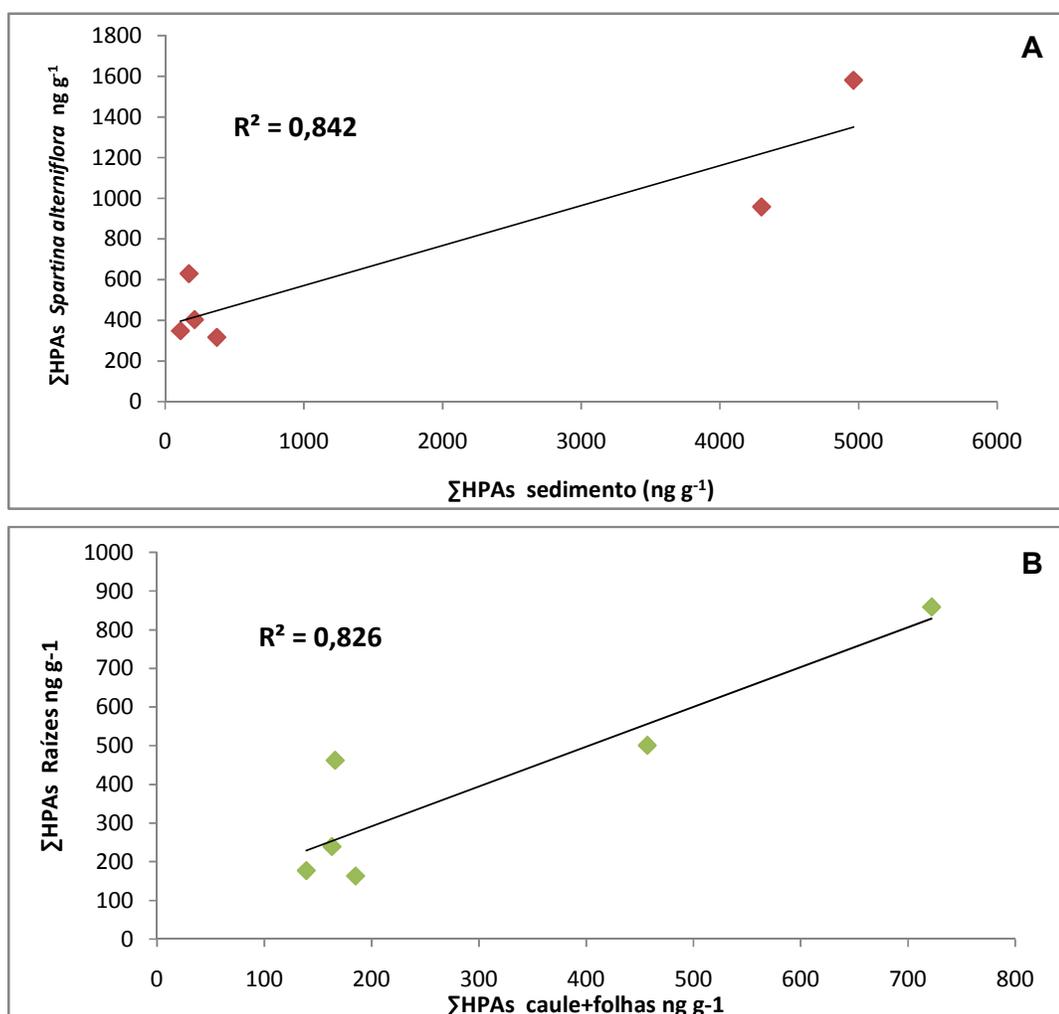
Analisamos graficamente as correlações entre as concentrações de HPAs totais encontradas em amostras coletadas no mesmo local de acordo com os indicados a seguir:

- *Spartina alterniflora* totais (caule e folhas somado a raíz) X sedimento ( $R^2=0,842$ ) Figura 69A;
- *Spartina alterniflora* caule + folhas X *Spartina alterniflora* raíz ( $R^2=0,826$ ) Figura 69B;

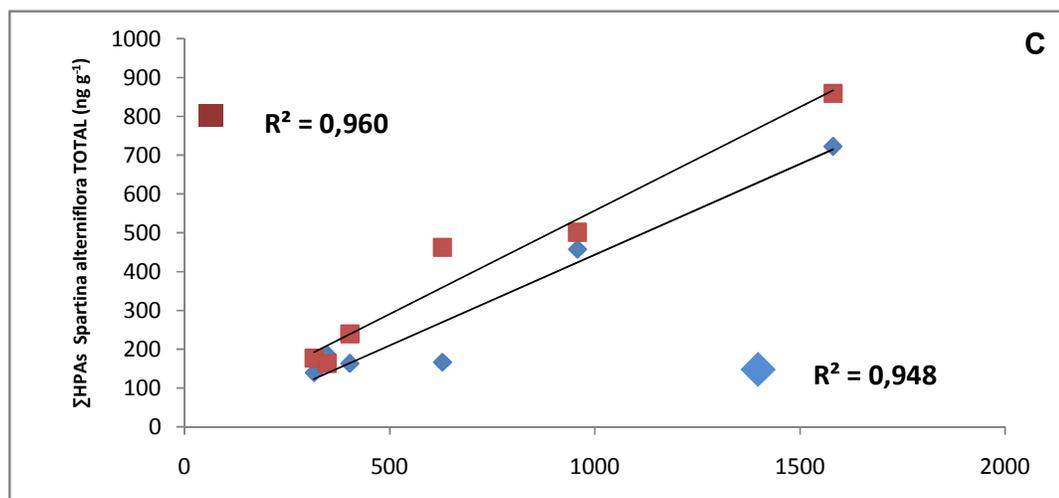
- *Spartina alterniflora* totais (caule e folhas somado a raíz) X *Spartina alterniflora* caule e folhas ( $R^2=0,960$ ) Figura 69C;
- *Spartina alterniflora* totais (caule e folhas somado a raíz) X *Spartina alterniflora* raíz ( $R^2=0,948$ ) Figura 69C.

As correlação encontradas dentro do mesmo indivíduos de *Spartina alterniflora* apresentam os maiores valores dentre as correlações calculadas.

**Figura 69.** Gráficos de correlação entre  $\sum_{HPAs}$ ; **A)** sedimento X *Spartina alterniflora* TOTAL; **B)**  $SA_{RAÍZES}$  X  $SA_{CAULE+FOLHAS}$ ; **C)**  $SA_{TOTAL}$  X  $SA_{RAÍZES}$  e  $SA_{TOTAL}$  X  $SA_{CAULE+FOLHAS}$



continuação da Figura 69



LEGENDA: ■ *Spartina alterniflora* caule\_folhas ◆ *Spartina alterniflora* raízes

#### 4.6.8. Testes Biológicos:

Os bioensaios de toxicidade tem sido recomendado e aplicado por agências de proteção ambiental para a avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais e compostos puros, bem como a avaliação do efeito fitotóxico de pesticidas em espécies não alvo, oferecendo um ótimo *screening* do risco do local (OCDE, 1984; WANG, 1987; USEPA, 1989).

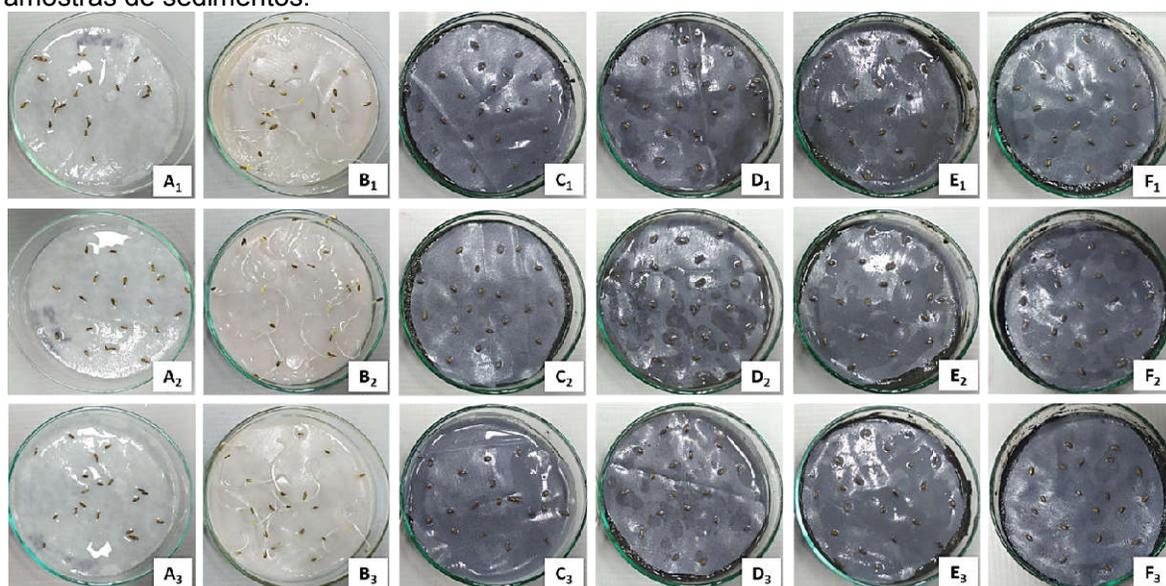
##### 4.6.8.1. *Lactuca sativa*

O bioensaio foi realizado pela aluna de doutorado do departamento de Biologia, Laís R. D. Sommaggio do Instituto de Biociências (UNESP) Campus de Rio Claro (Laboratório de Mutagênese Ambiental) com o organismo modelo *Lactuca sativa*, variedade *Grand rapids* da marca Isla, sendo feito algumas modificações da metodologia proposta por SOBERO & RONCO (2004). Este bioensaio de toxicidade é um teste estático de toxicidade aguda (120 horas de exposição) que avalia os efeitos fitotóxicos de compostos puros ou misturas complexas no processo de germinação das sementes e no desenvolvimento das mudas durante os primeiros dias de crescimento. O ensaio avalia a inibição na germinação e a inibição no alongamento da radícula e do hipocótilo. Deve-se destacar que durante o período de

germinação e nos primeiros dias de desenvolvimento da muda, ocorrem diversos processos fisiológicos nos quais a presença de uma substância tóxica pode interferir, alterando a sobrevivência e o desenvolvimento normal da planta, sendo portanto, um estágio altamente sensível à fatores externos adversos. Por outro lado, muitas das reações e processos envolvidos são gerais para a grande maioria das sementes, portanto a resposta desta espécie e os dados obtidos com a aplicação deste teste são amplamente representativos dos efeitos nas sementes ou brotos em geral. O sucesso ou a capacidade de uma muda de se estabelecer em um determinado ambiente é de grande importância para garantir a sobrevivência da espécie. Logo, a avaliação do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo constituem indicadores representativos para determinar o estabelecimento e a capacidade de desenvolvimento da planta.

O teste de germinação foi realizado em placas de Petri contendo as amostras de sedimento (Figura 70). Para os controles utilizou-se areia lavada e autoclavada como controle negativo (CN) e uma solução de sulfato de zinco 0,05 M como controle positivo (CP).

**Figura 70.** Germinação das sementes de *Lactuca sativa* nos tratamentos controles e nas amostras de sedimentos.



**LEGENDA:**

- A<sub>1-3</sub> controle positivo (sulfato de zinco)
- B<sub>1-3</sub> controle negativo (água de osmose reversa)
- C<sub>1-3</sub> amostras ponto 6
- D<sub>1-3</sub> amostras ponto 9
- E<sub>1-3</sub> amostras ponto 11
- F<sub>1-3</sub> amostras ponto 15

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, e em replicata. Sobre as amostras de sedimento e tratamentos controles foram dispostas 20 sementes de alface, as placas de Petri contendo as amostras foram colocadas em câmara estufa com temperatura controlada, no escuro, por 5 dias a 22 °C. Após este período se realizou uma contagem das sementes que germinaram.

A análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância, utilizando o *software* Bioestat 5.0, os resultados estão sumarizados na Tabela 50.

**Tabela 50.** Resultados do teste de germinação em *Lactuca sativa* utilizando sedimento de mangue.

Amostras	Réplica 1		Réplica 2	
	Média	%	Média	%
<b>CN</b>	18,3 ± 0,6	91,7	17,7 ± 1,5	88,3
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	0 *	0	0 *	0
<b>Ponto 6</b>	0 *	0	0 *	0
<b>Ponto 9</b>	0 *	0	0 *	0
<b>Ponto 11</b>	0 *	0	0 *	0
<b>Ponto 15</b>	0 *	0	0 *	0

**LEGENDA:**

\* estatisticamente significativo,  $p < 0,05$  – Kruskal Wallis  
CN: controle negativo

Os pontos de coleta selecionados para realizar este ensaio foram baseados na disposição geográfica e na exposição ambiental de cada ponto, ou seja, foram preconizados pontos que estão em zonas de maior risco ambiental.

Os resultados obtidos a partir do bioensaio com *Lactuca sativa* demonstram que as amostras de sedimentos de todos os pontos analisados, pontos 6, 9, 11 e 15 são fitotóxicas para o organismo teste em questão, já que não houve germinação das sementes em nenhum dos tratamentos. É considerado adequado uma germinação maior que 80% para ausência de fitotoxicidade. A concentração de HPAs e/ou a concentração de outros contaminantes, contida nestas amostras são altas suficiente para exercer efeito fitotóxico logo, podemos considerar que este sedimento apresenta potencial risco ao ambiente a que ele está inserido, destacando

novamente que não há somente os HPAs nas amostras mas outros contaminantes que podem influenciar no desenvolvimento do experimento.

A literatura não reporta relações entre concentração mínima de analito e fitotoxicidade, os estudos se baseiam em solos ou águas contaminadas e se os mesmos apresentam ou não efeito fitotóxicos, observado pela germinação das sementes de vegetais, ou seja, a respostas sendo uma variável qualitativa nominal.

A incorporação deste teste, inserido no contexto de demais bioensaios, considera importante o equilíbrio entre a sensibilidade das espécies *L. sativa*, tempo de exposição reduzida do ensaio com sementes, baixos custos associados e não necessita de equipamento sofisticado, particularmente na aplicação a amostras ambientais ou no monitoramento de processos de desintoxicação, saneamento, controle de efluentes ou reuso de bioensaios

#### 4.6.8.2. *Tiburonella viscana*

O grupo do Professor Dr. Denis Abessa (Instituto de Biociências, Campus Litoral Paulista-São Vicente) utilizou como organismo-teste o anfípodo escavador *Tiburonella viscana* (THOMAS & BARNARD, 1983), *Crustacea, Malacostraca, Peracarida, Amphipoda, Platyschnopidae*.

Segundo MELO (1993), a espécie é adequada ao uso em testes de toxicidade pelos seguintes fatores:

- 1) alta sensibilidade a diversos contaminantes;
- 2) disponível em abundância;
- 3) organismo autóctone (natural da região que habita) e representativo;
- 4) ampla distribuição geográfica;
- 5) alta sobrevivência e boa tolerância durante o período de aclimação às condições de laboratório;
- 6) tolerante a vários fatores abióticos;
- 7) hábito escavador assegurando uma exposição máxima aos contaminantes retidos no sedimento, entrando em contato com a água intersticial e com as partículas do sedimento.

A literatura mostra o uso do *T. viscana* em estudos de toxicidade de sedimentos (ABESSA *et al.*, 1998; 2001; 2005; MARANHO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2016; SOUZA *et*

al., 2016). Os exemplares de *T. viscana* foram coletados no nível superior do infralitoral da Praia do Engenho D'Água, em Ilhabela, com auxílio de uma draga manual, desenvolvida especialmente para coleta de anfípodos. Após a coleta, os animais foram transferidos para frascos de polietileno contendo sedimento e água do mar do local, e transportados para o laboratório, dentro de caixas de isopor.

Após triagem e identificação dos indivíduos de *T. viscana* em estereomicroscópio, os animais foram aclimatados por 5 dias em tanques contendo água do mar filtrada e uma camada de 2 cm de sedimento controle, a  $25\pm 2$  °C, com iluminação e aeração constantes, conforme orientações de MELO (1993) e ABNT (2016). O método utilizado na execução dos testes de toxicidade de sedimentos seguiu basicamente uma adaptação do protocolo descrito por MELO & ABESSA (2002) e ABNT (2016) para *Tiburonella viscana*, o qual foi miniaturizado segundo USEPA (1994), KUBITZ et al. (1996) e SHIELDS et al. (1991).

Os testes foram conduzidos em frascos de polietileno de alta densidade com volume de 350 mL (Figura 71). Cerca de 24 horas antes do início de cada experimento, as amostras de sedimento foram homogeneizadas manualmente e as réplicas preparadas, em número de 4 por amostra testada; para algumas amostras, havia pouco volume de sedimento e nesses casos apenas 3 réplicas foram preparadas. Em cada uma foi introduzida uma camada de 1,5 cm ( $\cong 100$  ml) de sedimento não peneirado e 200 mL de água do mar filtrada em elemento filtrante do tipo CUNO ( $0,1 \mu\text{m}$ ).

**Figura 71.** Montagem do bioensaio utilizando *Tiburonella viscana* como organismo teste.



Crédito das fotos: MSc. Ana Carolina Feitosa Cruz (UNESP)

Parâmetros físico-químicos da água circundante nos frascos-teste contendo as amostras foram medidos antes e ao final do experimento: a salinidade foi medida com auxílio de um refratômetro da marca ATAGO-S/Mill com precisão de 1 ‰; o pH foi medido por meio de pHâmetro Lutron modelo PH-206 (precisão de 0,01); o teor de oxigênio dissolvido foi por meio de um oxímetro YSI modelo 550A (com precisão de 0,01 mg L<sup>-1</sup>); temperatura, com auxílio de um termômetro de mercúrio com precisão de 0,5 °C; e concentração de nitrogênio amoniacal, pelo método de titulação por colorimetria descrito por KOROLEFF (1970) e tem limite de detecção de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal total. No dia seguinte, foram iniciados os experimentos, cada réplica recebeu 5 indivíduos adultos sadios e de mesmo tamanho. De acordo com MELO (1993), são considerados saudáveis os organismos que apresentam movimentação regular dos apêndices e do tubo digestivo, respondem a estímulos contraindo o corpo, não apresentam deformações ou anomalias morfológicas e se enterram num período de até uma hora após serem introduzidos nos frascos-teste. Não foram utilizadas fêmeas ovadas. Durante os experimentos os animais não foram alimentados e permaneceram sob aeração e iluminação constantes à temperatura de 25±2 °C. Diariamente, foi observado o número de organismos mortos e o de vivos desenterrados (emergentes) em cada frasco, assim como as variáveis físico-químicas (pH, salinidade). Após 10 dias, o experimento foi finalizado. O sedimento de cada réplica foi peneirado em malha 0,5 mm. Os exemplares de *T. Viscana* retidos foram então transferidos para placas de Petri, com auxílio de um conta-gotas e examinados em estereomicroscópio. O número de animais mortos e vivos foi contado. Quando a soma final de vivos e mortos numa réplica não atingiu 5, os organismos não encontrados foram considerados mortos. Sobre os dados foram aplicadas as análises estatísticas contidas no pacote estatístico STATISTICA (STATSOFT, 1998). Os dados foram checados quanto à homocedasticidade pelo teste de Bartlett, e quanto à normalidade de suas distribuições pelo teste de Shapiro-Wilks. Após essa determinação, para os dados homocedásticos e com distribuições normais, foi aplicado teste t-student para variâncias similares ou diferentes (amostra x controle). Na Tabela 51 podem ser observados os valores obtidos para as variáveis físico-químicas indicadoras da qualidade da água nos frascos teste no início e no final do experimento.

**Tabela 51.** Parâmetros monitorados durante o experimento.

	pH		salinidade		OD (mgL <sup>-1</sup> )		Amônia (mgL <sup>-1</sup> )		Temperatura (°C)		NH <sub>3</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
<b>Controle (Ilhabela)</b>	8,24	7,75	35	38	5,6	4,5	0,13	0,18	25	24,0	9,7	4,5
<b>1</b>	7,73	7,98	35	38	5,4	5,8	1,03	0,16	25	24,0	25,1	6,9
<b>2</b>	7,58	7,63	35	38	5,2	5,3	4,29	6,12	25	24,0	93,0	118,3
<b>3</b>	7,66	7,75	35	37	5,7	5,1	2,14	3,43	25	24,5	44,2	86,9
<b>4</b>	7,73	7,67	35	36	4,2	4,5	2,60	5,02	25	24,0	63,0	106,3
<b>6</b>	7,74	7,69	35	36	5,5	5,1	1,96	3,90	25	24,9	48,6	86,3
<b>7</b>	7,72	7,76	35	36	5,8	5,2	3,18	7,25	25	24,5	75,3	188,0
<b>8</b>	7,73	7,68	35	36	5,1	5,1	1,61	4,81	25	24,5	39,1	104,2
<b>9</b>	7,85	3,62	35	37	5,2	4,0	0,55	0,62	25	24,5	17,5	0,0
<b>10</b>	7,85	7,27	35	38	5,1	4,7	0,56	0,31	25	24,0	17,8	2,6
<b>11</b>	7,81	7,36	35	37	5,7	4,8	1,85	2,35	25	24,5	53,7	24,7
<b>12</b>	7,81	7,41	35	37	5,1	4,5	1,38	3,51	25	24,5	39,9	41,3
<b>13</b>	7,86	7,04	35	37	5,5	5,2	4,20	7,20	25	24,0	136,2	36,3
<b>14</b>	7,72	6,39	35	36	4,9	3,5	2,18	4,78	25	24,0	51,8	5,4
<b>15</b>	7,71	5,99	35	36	4,9	4,9	0,86	1,50	25	24,0	19,8	0,7
<b>16</b>	8,08	7,38	35	36	4,8	4,7	1,84	4,71	25	24,5	96,8	51,6
<b>17</b>	8,16	7,83	35	37	3,5	5,7	2,63	3,10	25	24,5	164,9	94,0
<b>21</b>	8,04	7,99	35	38	4,1	4,8	5,24	5,26	25	24,5	252,7	227,5
<b>22</b>	8,21	7,71	35	37	5,1	5,2	3,22	1,51	25	24,0	224,6	35,0

**LEGENDA:**

valores em vermelho: níveis considerados tóxicos para a espécie em estudo

Os teores de oxigênio dissolvido estiveram sempre acima de 3 mg L<sup>-1</sup> (variando entre 3,5 e 5,8 mg L<sup>-1</sup>), a temperatura manteve-se constante a 25,9±1 °C e a salinidade manteve-se entre 35 e 38, dentro da faixa aceitável para a espécie, o pH em geral esteve dentro da faixa aceitável (acima de 7,0), porém houve valores finais excepcionalmente baixos nas amostras **9** (pH = 3,62); **14** (pH = 6,39) e **15** (pH = 5,99); possivelmente esses valores estão relacionados com contaminantes presentes, as concentrações de nitrogênio amoniacal total variaram entre 0,13 mgL<sup>-1</sup> e 7,25 mg L<sup>-1</sup> enquanto as de amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) estiveram entre 0 e 252,7 µg L<sup>-1</sup>, níveis de NH<sub>3</sub> acima dos limiares tóxicos para *Tiburonella viscana* (0,80 mg L<sup>-1</sup>) foram detectados nas amostras **2**, **17** e **21** (inicial e final); **13**, **14**, **16** e **21** (inicial), e **3**, **4**, **6**, **7** e **8** (final), porém as mortalidades de *T. viscana* nos ensaios não apresentaram correlação significativa com as concentrações iniciais ou finais de amônia total ou amônia não ionizada. Além disso, entre as amostras não tóxicas (**14**, **15**, **16**, **21**, **22**) foram detectadas algumas das concentrações mais altas de NH<sub>3</sub>, sugerindo baixa interferência desse composto; porém, é possível que a amônia (total ou não ionizada) tenha tido alguma influência nas toxicidades de algumas amostras, em especial aquelas com concentrações altas ao fim do experimento, como por exemplo, aquelas dos pontos **2**, **3**, **4**, **6**, **7** e **8**. De acordo com os critérios propostos por MELO & ABESSA (2002) para aceitabilidade de testes com *T. viscana* (pH maior que 7,0; salinidade entre 30 e 38 ‰, oxigênio dissolvido acima de 3 mgL<sup>-1</sup>; teor de nitrogênio amoniacal abaixo de 10 mgL<sup>-1</sup>; temperatura de 25±2°C, as condições da água foram consideradas adequadas na maioria das réplicas.

No teste de toxicidade realizado com sedimento integral, foram consideradas significativamente tóxicas as amostras coletadas nas estações **1 a 4**; **6 a 13**; e **17** – nestas amostras as sobrevivências dos organismos expostos apresentaram redução significativa, não foram significativamente tóxicas as amostras dos pontos **14**, **15**, **16**, **21** e **22** (Tabela 52), porém para a amostra do ponto **21**, a sobrevivência foi reduzida a 50%, com alto desvio padrão, o que pode indicar um possível indício de efeito tóxico. As amostras dos pontos **5**, **18**, **19** e **20** não foram testadas devido a problemas na coleta,

Analisando-se os resultados, devem ser destacados os sedimentos do ponto **9** (bacia de evolução do terminal portuário da antiga COSIPA, atual Usiminas), onde os níveis de pH baixaram a 3,62, tornando o sedimento esbranquiçado durante o

experimento, nesse sedimento, a mortalidade dos anfípodos foi de 100%, este local é amplamente reconhecido pela alta contaminação e toxicidade de sedimentos, conforme a literatura (ABESSA et al., 2008 e LAMPARELLI et al., 2001), duas amostras de sedimentos coletadas em tributários do estuário (pontos **14** e **15**) levaram a valores de pH finais mais baixos; é possível que tais resultados se devam à interferência de poluentes organoclorados dispostos irregularmente no passado em aterros próximos a esses pontos.

**Tabela 52.** Resultado do experimento com *Tiburonella viscana*

Dados de sobrevivência	R1	R2	R3	R4	Média	Desvio	p	NH <sub>3</sub>		∑HPA
<b>Controle (Ilhabela)</b>	80	100	100	100	95,0	10		9,7	4,5	
<b>1</b>	20	20	40	60	35,0	19,1	0,0017	25,1	6,9	21
<b>2</b>	20	0	60	80	40,0	36,5	0,0262	93,0	118,3	
<b>3</b>	0	0	20	40	15,0	19,1	0,0005	44,2	86,9	2595
<b>4</b>	20	20	20	40	25,0	10,0	0,0000	63,0	106,3	1192
<b>6</b>	20	40	80	20	40,0	28,3	0,0120	48,6	86,3	7529
<b>7</b>	20	20	40	20	25,0	10,0	0,0000	75,3	188,0	4965
<b>8</b>	40	20	40	60	40,0	16,3	0,0006	39,1	104,2	0,000
<b>9</b>	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0000	17,5	0,0	6645
<b>10</b>	0	40	60	80	60,0	20,0	0,0379	17,8	2,6	52
<b>11</b>	60	60	60	100	70	20,0	0,0413	53,7	24,7	4309
<b>12</b>	80	60	80		73,3	11,5	0,0223	39,9	41,3	912
<b>13</b>	60	60	80		66,7	11,5	0,0087	136,2	36,3	877
<b>14</b>	80	100	100		93,3	11,5	0,4228	51,8	5,4	937
<b>15</b>	40	80	100		73,3	30,6	0,1720	19,8	0,7	206
<b>16</b>	80	40	100	80	75,0	25,2	0,4712	96,8	51,6	226
<b>17</b>	0	0	0	20	5,0	10,0	0,0000	164,9	94,0	168
<b>21</b>	100	0	80	20	50,0	47,6	0,0769	252,7	227,5	372
<b>22</b>	60	80	60	100	75,0	19,1	0,0567	224,6	35,0	109

**LEGENDA:**

valores em vermelho: níveis considerados tóxicos para a espécie em estudo

Quando os resultados de toxicidade são analisados em sua disposição geográfica (Figura 72), evidencia-se uma maior incidência de amostras tóxicas no Canal de Santos e áreas internas do estuário, corroborando com a literatura. Estas áreas tenderam a apresentar os maiores níveis de HPAs e de amônia não ionizada. No Canal de São Vicente, menos amostras foram tóxicas e as concentrações de HPAs foram menores. Porém, nas amostras dessa região também foram medidas concentrações de amônia não ionizada acima dos limiares tóxicos. Nessa região, há fontes de outros contaminantes, em especial os aterros de compostos organoclorados e os esgotos domésticos.

**Figura 72.** Distribuição espacial dos resultados qualitativos de toxicidade (para  $p < 0,05$ ), Em vermelho as amostras que apresentaram maior toxicidade, em amarelo a amostra exibindo indício de toxicidade, em azul as amostras não tóxicas e em branco as amostras não testadas



Fonte: googlemaps

Os resultados de toxicidade aguda apresentaram correlação fraca, mas significativa com os níveis de HPAs, a mortalidade apresentou correlação de 0,48 ( $p < 0,05$ ) com  $\Sigma$ HPA, enquanto as somas de HPAs de 3, 4, 5 e 6 anéis tiveram correlações de 0,47 ( $\Sigma$ HPAs de 3 e 4 anéis) e 0,49 ( $\Sigma$ HPAs de 5 e 6 anéis), tais resultados sugerem contribuição significativa dos HPA na toxicidade dos sedimentos, além disso, outras classes de contaminantes podem estar contribuindo com os efeitos observados nos organismos expostos às amostras ambientais, como os seguintes contaminantes, DDT ( $C_{14}H_9Cl_5$ ) inseticida utilizado em larga escala na segunda guerra mundial para combater os vetores transmissores de malária), Deldrin, ( $C_{12}H_8Cl_6O$ ) inseticida organoclorado e Hg (mercúrio) reportado por ABESSA, 2008.

A literatura para esta região demonstra a presença de diversas substâncias em concentrações tóxicas nos sedimentos do Sistema Estuarino de Santos devido as práticas indevidas como despejo de esgoto e aterros, os quais podem apresentar diversos contaminantes como os mostrados a seguir: mercúrio total em concentrações  $5-3500 \mu\text{g kg}^{-1}$  (HATJE et al, 2019) e  $0,04-1,19 \mu\text{g g}^{-1}$ , (HORTELANI et al., 2005);  $190,7 \text{ ng g}^{-1}$  de PCBs por SOUZA et al., 2018, dentre outros. Adicionalmente, fatores naturais, como granulometria, podem também apresentar como variáveis intervenientes,

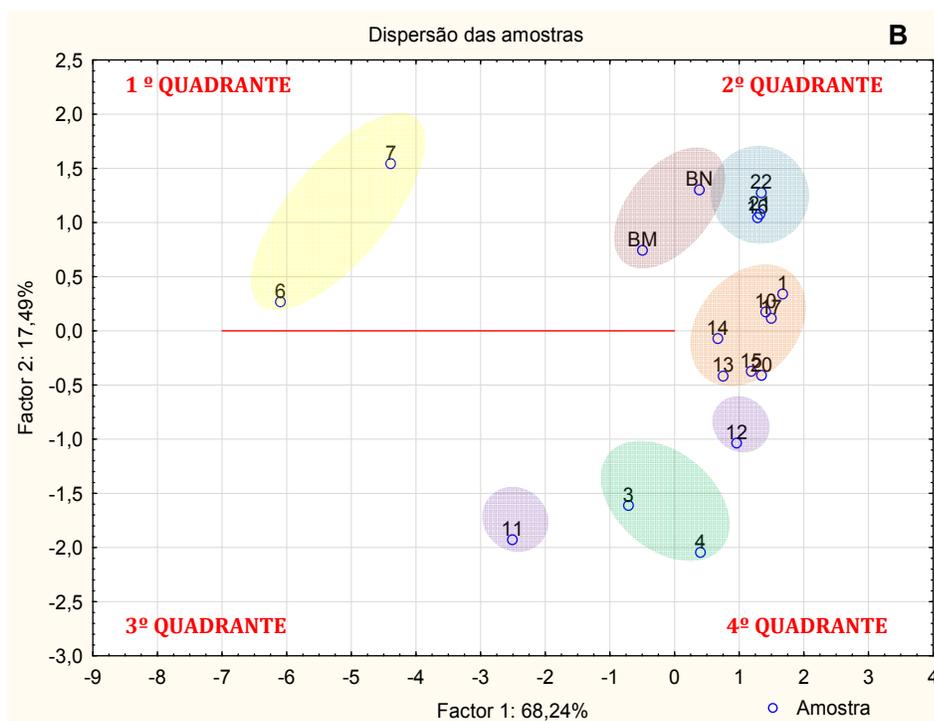
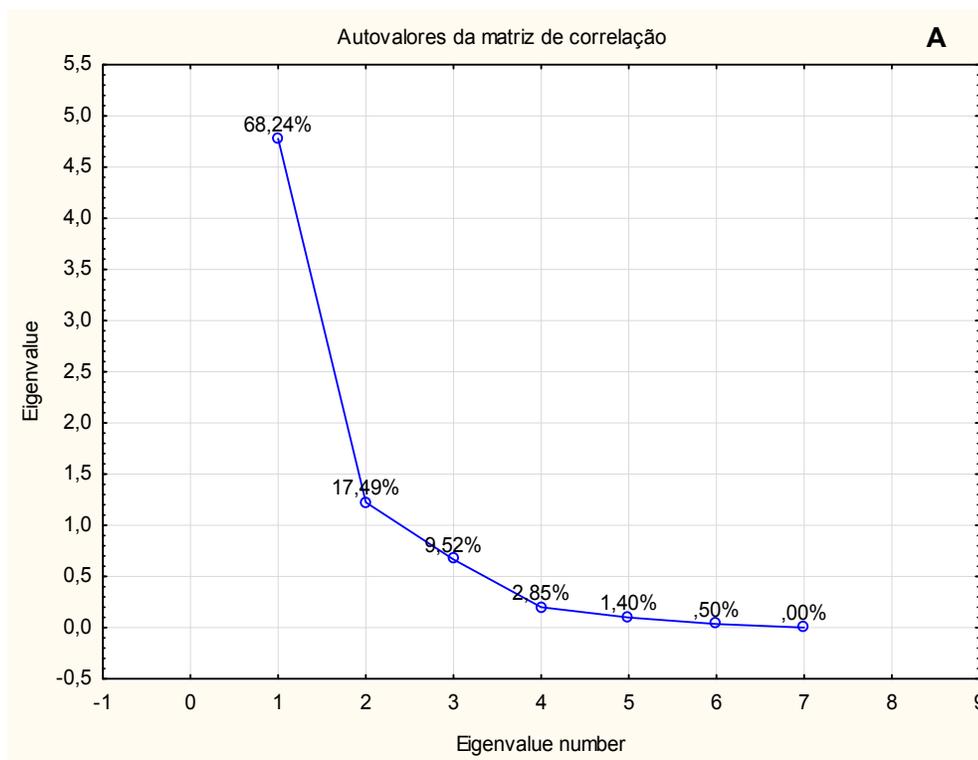
#### 4.7. ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS

A PCA (*Principal Components Analysis*) é usado na análise exploratória de dados fazendo modelos preditivos, usadas para a redução da dimensionalidade, projetando cada ponto (amostras) apenas nas primeiros componentes principais obtendo dados de dimensões inferiores, preservando o máximo possível da variação dos dados. A primeiro componente principal pode ser definido de forma equivalente como uma direção que maximiza a variação dos dados projetados, pode-se mostrar que os componentes principais são autovetores (*eigenvalues*) da matriz de covariância dos dados. Uma limitação da utilização de PCA é a dependência da variância de uma resposta (variável) dentro da matriz de dados, caso uma resposta apresentada seja um outlier, ela impactará na dispersão das componentes principais (*eigenvalues*) visto na Figura 73A. Podemos utilizar o mapa perceptual bidimensional como ferramenta para avaliar as relações entre as variáveis, uma vez que explica grande parte da variabilidade dos dados. O mapa mostra quais as variáveis de maior impacto para explicar a variabilidade da PCA.

Para análise de amostras de sedimentos da Baixada Santista foi considerada a construção da matriz da PCA as seguintes respostas:  $\Sigma\text{HPA}_{\text{total}}$ ,  $\Sigma\text{HPA}_{3\text{anéis}}$ ,  $\Sigma\text{HPA}_{4\text{anéis}}$ ,  $\Sigma\text{HPA}_{5\text{anéis}}$ ,  $\Sigma\text{HPA}_{6\text{anéis}}$ , COT e tamanho de partícula, as demais foram classificadas como variáveis intervenientes, ou seja elas mais dispersavam os dados do que contribuíam para a análise. A análise dos componentes principais nos mostra o agrupamento de amostras semelhantes, a amostra de maior concentração, ponto **9** mostrou comportamento discrepante sendo considerada um *outlier*, devido a concentração atípica encontrada, esta amostra foi removida das análises por desviar os resultados impedindo melhor interpretação das componentes principais, a tabela dos fatores e valores de contribuição estão sumarizados no Apêndice 3.

Na Figura 73B observamos o gráfico de dispersão das amostras com as duas primeiras componentes explicando 85,73 % da variabilidade dos resultados (68,24% fator 1 e 17,49% fator 2). A componente 1 é explicado pelas concentrações de HPAs nas amostras e a componente 2 corresponde ao teor de carbono orgânico e a granulometria, como observado na Figura 73.

**Figura 73. A)** porcentagem explicada por cada PC; **B)** Agrupamento das amostras de sedimento por PCA em função de cada HPA

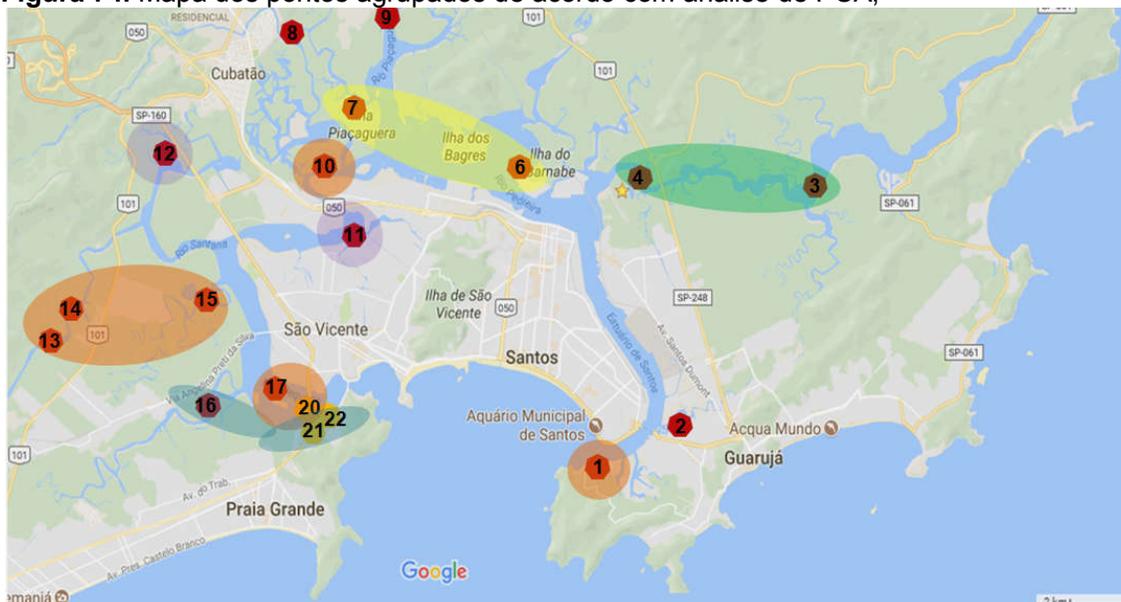


Na Figura 73B podemos ver os agrupamentos das amostras semelhantes, à esquerda do eixo y (quadrantes 1,3) observamos as amostras que apresentaram maiores concentrações de HPAs e a direita (quadrante 2 e 4) as amostras de menores concentrações, acima o eixo x, (quadrantes 1 e 2) observamos a influência das características secundárias de tamanho e COT nas amostras, acima os maiores valores e abaixo os menores valores. As amostras **6** e **7** apresentam altas concentrações e altos valores de COT, são amostras coletadas próximas e estão entre os pontos conhecidamente sob maior influência de fontes de contaminantes de grande porte como a Alemoa, USIMINAS e Porto de Santos.

No segundo quadrante em azul (Figura 73B) observamos o agrupamento dos pontos **16**, **21** e **22**, pontos coletados em locais próximos, **21** e **22**, no Mar Pequeno e **16** próximo a Ilha Hérvida (em azul Figura 74), estes pontos estão localizados entre as rodovias que ligam a parte costeira de São Vicente e Praia Grande à Ilha de São Vicente e Santos, a Expressa Sul localizada ao sul e a Avenida Vereadora Angelina Pretti da Silva, porém nesta mesma área foram coletadas as amostras **17** e **20** que se agruparam juntamente com o grupo localizado entre o segundo e terceiro quadrante (cor laranja Figura 73B) que ainda englobou os pontos **1**, **10**, **13**, **14** e **15**, sendo **1** o ponto coletado mais à sudeste, os pontos **13**, **14** Rio Mariana e **15** no Rio Boturoca pontos coletados próximos (laranja Figura 74), ps demais, **1**, **10** e **17** foram coletados em pontos distantes deste primeiro, porém os locais de coleta das 3 são locais de "trânsito" ao entorno da ilha de Santos/São Vicente, mostrando que há semelhanças nas amostras com relação as outras características que podem ser consequências da localização.

Os pontos **3** e **4** foram coletadas no mesmo canal (Canal de Bertioga, em verde Figura 74) e apresentaram concentrações bastante distintas dentre si, 7529 e 4965 ng g<sup>-1</sup>, porém pela proximidade podemos deduzir que possuem características semelhantes.

**Figura 74.** Mapa dos pontos agrupados de acordo com análise de PCA,



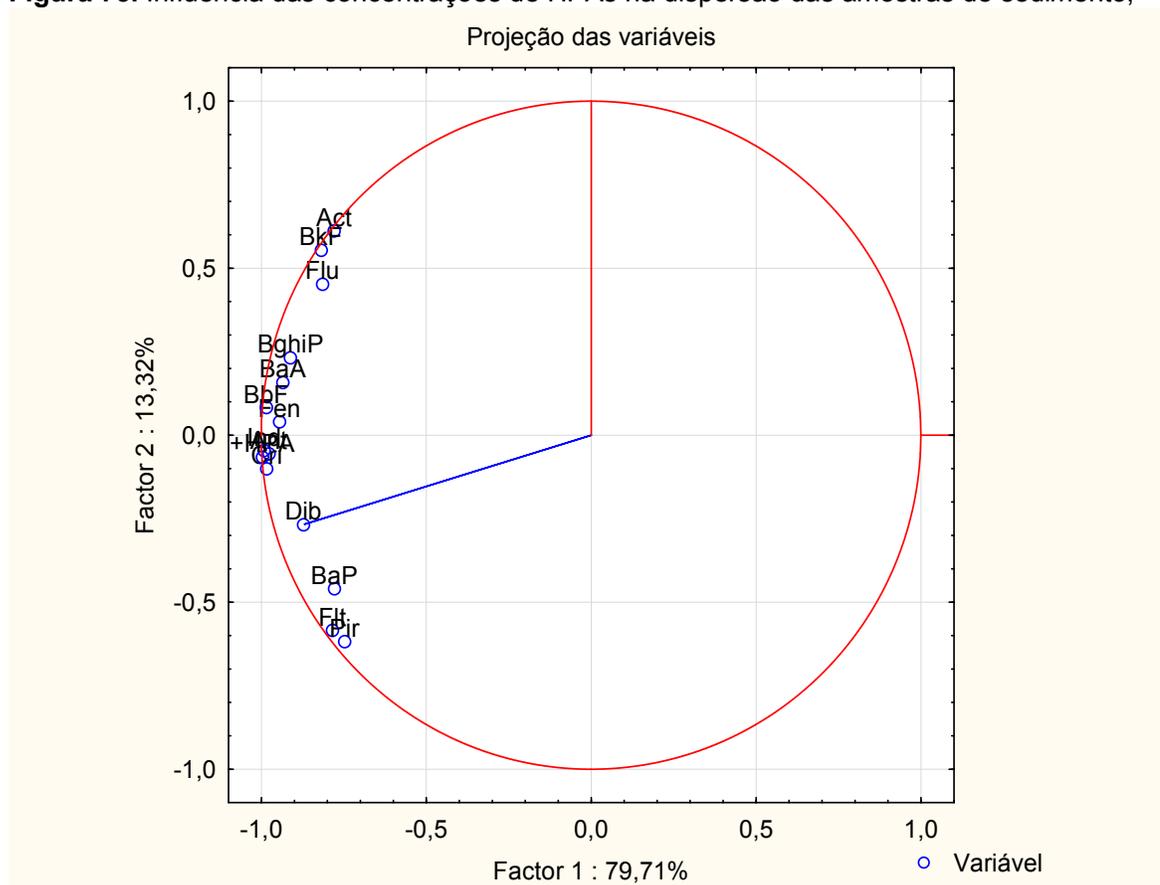
As amostras de Bertioga (**BN** e **BM**) foram coletadas em local com muitos estabelecimentos comerciais do ramo alimentício, levando a nossa conclusão de que o local possui períodos de grande procura pois em uma distância de 1Km haviam mais de 10 estabelecimentos que oferecem alimentação e local para camping, não podendo ser caracterizado como local não impactado.

O ponto **12** no Rio Santana não foi agrupado estando próximo dos pontos de Bertioga (**BN** e **BM** na Figura 73B), não foi observado fontes de contaminação próxima ao ponto **12**.

O ponto **11** no Lago da Popemba, também não foi agrupado onde há várias fontes antropogênicas próximas (Dique da Gilda, Alemoa e Porto de Santos).

Podemos observar pela Figura 74 que amostras com pontos de coleta próximos, mesmo com concentrações de HPAs um pouco distintas entre si, se agrupam devido a característica físico-química do sedimento.

Além disso, foi estudado quais os HPAs mais importantes que podem explicar a dispersão dos resultados. A projeção de variáveis com as amostras (Figura 75) demonstra que os HPAs: Ant, Cri, BbF, Ind, Fen e  $\Sigma\text{HPA}_{\text{total}}$  são as respostas de maior significância que explicam o resultado, os demais HPAs também denotam importância, mas com significância menor.

**Figura 75.** Influência das concentrações de HPAs na dispersão das amostras de sedimento,

O antraceno dificilmente é detectado em amostras petrogênicas (STOUT et al. 2002), porém, ambos fenantreno e o antraceno, são comumente associados a processos pirogênicos (DE LUCA et al., 2004).

O criseno e o benzo(b)fluoranteno são classificados como constituintes minoritários em amostras petrogênicas (WANG et al., 2001).

O indeno(1,2,3-cd)pireno é indicador de fonte de combustão, e é tipicamente produto de combustão em escapamentos de veículos automotores (YUNKER et al., 2002).

## QUADRO RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

<b>Métodos Analíticos</b>	O método cromatográfico otimizado e validado, utilizando GC-MS, para separação e quantificação dos HPAs, apresentou valores de limites e faixa de trabalho aplicáveis ao estudo efetuado, LD e LQ $5 \text{ ng mL}^{-1}$ , faixa de trabalho $5,0 - 2000 \text{ ng mL}^{-1}$ .
	Para a separação de isômeros BbF e BkF a coluna RTX-5MS apresenta melhor seletividade quando comparada com a ZB 5MS, decorrente dos anéis aromáticos nas cadeiras laterais
	O método de extração de HPAs em amostras de <i>Spartina alterniflora</i> otimizado e validado apresentou os limites do método (LD) entre $3,7$ e $18,1 \text{ ng g}^{-1}$ e faixa de trabalho $15,0/20,0$ a $1300 \text{ ng g}^{-1}$ , considerando 15 HPAs (não foi possível a validação do método para naftaleno)
	O método de extração de HPAs em amostras de sedimento de mangue otimizado e validado apresentou os valores de LD $2,9$ a $14,8 \text{ ng g}^{-1}$ , e faixa de trabalho $15,0/20,0 \text{ ng g}^{-1}$ a $1300 \text{ ng g}^{-1}$ , considerando 15 HPAs (não foi possível a validação do método para naftaleno)
<b>Estudo Ambiental</b>	Para as amostras de <i>Spartina alterniflora</i> , as raízes apresentaram concentrações de HPAs maiores que a parte aérea, corroborando com dados apresentados em outros estudos da literatura;
	Observou-se correlação ( $R^2$ 0,942) entre as concentrações de HPAs quantificadas na planta e nas amostras de sedimento subjacente, indicando o potencial desta planta como biorremediadora
	Para o sedimento, a correlação entre carbono orgânico/granulometria e $\Sigma$ -HPAs foi significativa apenas para a fração fina ( $<0,63$ e $<0,25 \mu\text{m}$ ) das amostras, sendo de 0,5727 e 0,6229, respectivamente
<b>Testes Ecotoxicológicos</b>	O teste com a <i>Lactuca sativa</i> mostrou que todas as amostras testadas são fitotóxicas
	O teste com <i>Tiburella viscana</i> apontou que as amostras testadas apresentaram toxicidade moderada a alta
<b>Fontes dos HPAs</b>	Utilizando-se as razões diagnóstico foi possível inferir que as fontes predominantes dos HPAs na região estudada são pirogênicas
	Utilizando PCA foi possível agrupar as amostras com a somatória de todos os HPAs, sendo que Ant, Cri, BbF, Ind e Fen são as respostas de maior significância para o agrupamento. Sendo fenantreno e antraceno os HPAs mais associados com fontes pirogênicas e o indeno (1,2,3-cd)pireno o mais associado a fontes de combustão em veículos automotivos

## 5 CONCLUSÕES:

- Neste trabalho estabeleceram-se dois métodos analíticos, que foram validados para determinação de HPAs em concentrações da ordem de unidades  $\text{ng g}^{-1}$ , em amostras de sedimento de mangue e planta (*Spartina alterniflora*), empregando extração com pequeno volume de solvente de baixo impacto ambiental (20-40 mL, n-hexano/acetona), equipamento de baixo custo (banho de ultrassom) e baixo tempo de extração (20 minutos), em contraponto com métodos ainda largamente empregados baseados na extração por *Soxhlet* com centenas de mL de solventes de maior impacto ambiental e tempo de extração que pode chegar a algumas horas. Seguidos de processos dispendiosos e demorados de limpeza (*cleanup*) destes extratos;
- O emprego de planejamento experimental ainda é pouco frequente na otimização de métodos analíticos em estudos ambientais. Neste trabalho o emprego de ferramentas de estatística multivariada possibilitou o atingimento dos métodos com melhor desempenho com maior rapidez e com menor custo;
- Ao escolher incluir na malha amostral os mesmos pontos utilizados no estudo efetuado pela CETESB em 2001, e sendo encontrados valores para  $\Sigma$ HPA menores nas amostras coletadas em 2017, foi possível inferir a grande magnitude da influencia do polo industrial de Cubatão e suas transformações durante quase 20 anos entre estes estudos;
- Foram utilizados dois testes ecotoxicológicos para toxicidade aguda, que indicaram toxicidade média/alta na região estudada. No entanto, estes resultados não podem ser atribuídos apenas aos HPAs pois a região estudada possui diversas fontes que contribuem para o aumento do impacto ambiental, sendo que altas concentrações de outros contaminantes orgânicos e inorgânicos tem sido amplamente descritos na literatura;
- Considerando-se os dados obtidos nesta tese, são recomendados estudos futuros, incluindo o monitoramento de HPAs em *Spartina Alterniflora* e sedimento subjacente, nos pontos estudados, por pelo menos um ano, para compreender a dinâmica destes compostos na Baixada Santista e o comportamento desta planta em relação aos HPAs. Testes ecotoxicológicos mais abrangentes, incluindo testes de mutagenicidade (característica de diversos HPAs) e de alteração endócrina, deveriam ser efetuados em amostras de sedimento desta região para melhor avaliar o impacto ambiental.

## 6 REFERÊNCIAS

- AICHNER. B. et al. Regionalized concentrations and fingerprints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in German forest soils. **Environmental pollution**. v. 203. p. 31–39. 2015.
- ALBANESE. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils of a densely populated region and associated human health risks: the Campania Plain (Southern Italy) case study. **Environmental geochemistry and health**. v. 37. n. 1. p. 1–20. 2015.
- AL-DABBAS. M. A.; ALI. L. A.; AFAJ. A. H. Determination of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil and in the leaves of plant (Eucalyptus) of selected locations at Kirkuk—Iraq. **Arabian Journal of Geosciences**. v. 8. n. 6. p. 3743–3753. 2015.
- ALEKSEENKO. A. et al. Determination of 1-Hydroxypyrene as a Biomarker for the Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urine by Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 75. n. 1. p. 84–89. 2020.
- AMARAL. P. O.; OLIVEIRA. J. P.; BUSTILLOS. J. O. Diferentes técnicas de varredura de Ânons no espectrômetro de massas aplicadas À análise de organoclorados via GC/MS.[s.d.].
- ANDRADE. L.; DAVIDE. L.; GEDRAITE. L. The effect of cyanide compounds. fluorides. aluminum. and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of Lactucasativa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73. n. 4. p. 626–631. 2010.
- ANGULO-CUERO. J. et al. Impact of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangroves from the Colombian pacific coast: Evaluation in sediments and bivalves. **Marine Pollution Bulletin**. v. 172. p. 112828. 2021.
- AQUINO. M. Revista FLAMMAE ESPUMA NO COMBATE AOS INCÊNDIOS E SUA FITOTOXICIDADE NO CERRADO. v. 6.1 maio 2020.
- ARAUJO. M. P. et al. Assessment of brazilian mangroves hydrocarbon contamination from a latitudinal perspective. **Marine pollution bulletin**. v. 150. p. 110673. 2020.
- ASSUNÇÃO. M. A. et al. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments collected from mangroves with different levels of urbanization in southern Brazil. **Marine pollution bulletin**. v. 119. n. 1. p. 439–445. 2017.
- BALU. S. et al. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Sundarbans. the world’s largest tidal mangrove forest and indigenous microbial mixed biofilm-based removal of the contaminants. **Environmental Pollution**. v. 266. p. 115270. 2020.
- BANIEMAM. M. et al. Seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments of the southern Caspian Sea. **Marine pollution bulletin**. v. 117. n. 1–2. p. 478–485. 2017.

- BARKER. S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of chromatography A**. v. 885. n. 1–2. p. 115–127. 2000.
- BARROS NETO. B. DE; SCARMINIO. I. S.; BRUNS. R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**. v. 29. p. 1401–1406. 2006.
- BELLAN-SANTINI. D. Relationship between populations of amphipods and pollution. **Marine Pollution Bulletin**. v. 11. n. 8. p. 224–227. 1980.
- BEZERRA. M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76. n. 5. p. 965–977. 2008.
- BÍCEGO. M. C. et al. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System. São Paulo. Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 52. n. 12. p. 1804–1816. 2006.
- BRITO. N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 13. 2003.
- BRUNS. R. E.; NETO. B. B.; SCARMÍNIO. I. Como fazer experimentos. **Editores da Unicamp. Campinas**. 2001.
- BUOSI. D.; FELFILI. J. M. Recuperação de áreas contaminadas por pesticidas organoclorados na Cidade dos Meninos. município de Duque de Caxias. RJ. **Revista Árvore**. v. 28. p. 465–470. 2004.
- CAI. J.-F. et al. Remediation of cadmium-contaminated coastal saline-alkaline soil by *Spartina alterniflora* derived biochar. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 205. p. 111172. 2020.
- CAMPOS. I.; ABRANTES. N. Forest fires as drivers of contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons to the terrestrial and aquatic ecosystems. **Current Opinion in Environmental Science & Health**. v. 24. p. 100293. 2021.
- CAVÉ-RADET. A. et al. Increased tolerance to organic xenobiotics following recent allopolyploidy in *Spartina (Poaceae)*. **Plant Science**. v. 280. p. 143–154. 2019.
- CESAR. R. et al. Disposição continental de sedimentos de dragagem em solos tropicais: avaliação do risco ecológico de metais baseada em bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. v. 20. p. 181–189. 2015.
- CHUNG. J.-Y. et al. Benzo [a] pyrene reduces testosterone production in rat Leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. **Environmental health perspectives**. v. 119. n. 11. p. 1569–1574. 2011.
- COGLIANO. V. J. Identifying carcinogenic agents in the workplace and environment. **The lancet oncology**. v. 11. n. 6. p. 602. 2010.
- COSTA. C.; DAVY. A. Coastal saltmarsh communities of Latin America. In: **Coastal plant communities of Latin America**. [s.l.] Elsevier. 1992. p. 179–199.
- CZERNIAWSKA-KUSZA. I.; KUSZA. G. The potential of the Phytotoxkitmicrobiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater

- ecosystems.**Environmental Monitoring and Assessment**. v. 179. n. 1. p. 113–121.2011.
- DA SILVA. J. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Rio de Janeiro**. 2020.
- DE LA TORRE. T. et al.Trace organics removal using three membrane bioreactor configurations: MBR, IFAS-MBR and MBMBR.**Water Science and Technology**. v. 71. n. 5. p. 761–768. 2015.
- DE NICOLA. F. et al.Distribution of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in holm oak plant–soil system evaluated along urbanization gradients.**Chemosphere**. v. 134. p. 91–97. 2015.
- DE SOUZA. A. C. et al.Historical records and spatial distribution of high hazard PCBs levels in sediments around a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Brazil).**Journal of hazardous materials**. v. 360. p. 428–435. 2018.
- DEWITT. T. H. et al. The influence of organic matter quality on the toxicity and partitioning of sediment-associated fluoranthene.**Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. v. 11. n. 2. p. 197–208. 1992.
- DMS. A. et al. Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system.**Marine pollution: new research**. p. 125. 2008.
- DOMÍNGUEZ. C. et al. Quantification and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from Sundarban Mangrove Wetland,India.**Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 59. n. 1. p. 49–61. 2010.
- DONG. C.-D.; CHEN. C.-F.; CHEN. C.-W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS.**International journal of environmental research and public health**. v. 9. n. 6. p. 2175–2188. 2012.
- EL-MARADNY. A. et al.PAH bioaccumulation in two polluted sites along the eastern coast of the Red Sea, Saudi Arabia.**International Journal of Environmental Science and Technology**. v. 18. n. 6. p. 1335–1348. 2021.
- FILIPKOWSKA. A.; LUBECKI. L.; KOWALEWSKA. G. Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment.**Analytica Chimica Acta**. v. 547. n. 2. p. 243–254. 2005.
- FRAPICCINI. E. et al.Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in different common sole (*Solea solea*) tissues from the North Adriatic Sea peculiar impacted area.**Marine pollution bulletin**. v. 137. p. 61–68. 2018.
- FROEHNER. S. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments and their potential toxic effects.**Environmental monitoring and assessment**. v. 168. n. 1. p. 205–213. 2010.
- GEARHART-SERNA. L. M. et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon intake in the US adult population from NHANES 2005–2014 identifies vulnerable subpopulations. suggests interaction between tobacco smoke exposure and sociodemographic factors.**Environmental research**. v. 201. p. 111614. 2021.

- GUSSO-CHOUERI, P. K. et al. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 22. n. 22. p. 18047–18065. 2015.
- HAN, J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) geographical distribution in China and their source. risk assessment analysis. **Environmental Pollution**. v. 251. p. 312–327. 2019.
- HE, Q. et al. Effect of input pathways and altitudes on spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in background soils. the Tibetan Plateau. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 22. n. 14. p. 10890–10901. 2015.
- HINDERSMANN, B.; ACHTEN, C. Urban soils impacted by tailings from coal mining: PAH source identification by 59 PAHs. BPCA and alkylated PAHs. **Environmental Pollution**. v. 242. p. 1217–1225. 2018.
- HONG, Y. et al. A comprehensive study of the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination on salt marsh plants *Spartina alterniflora*: implication for plant-microbe interactions in phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 22. n. 9. p. 7071–7081. 2015.
- HUANG, R. et al. Underestimated PAH accumulation potential of blue carbon vegetation: Evidence from sedimentary records of saltmarsh and mangrove in Yueqing Bay, China. **Science of The Total Environment**. p. 152887. 2022.
- JIA, H. et al. The remediation of PAH contaminated sediment with mangrove plant and its derived biochars. **Journal of environmental management**. v. 268. p. 110410. 2020.
- JUVANCZ, Z. et al. Study of endocrine disrupting chemicals in environment. **Acta Polytechnica Hungarica**. v. 5. n. 3. 2008.
- KARLSSON, K.; VIKLANDER, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water and sediment from gully pots. **Water, air, and soil pollution**. v. 188. n. 1. p. 271–282. 2008.
- KARP, G. **Biologia celular e molecular**. [s.l.] Editora Manole Ltda. 2005.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. 2001.
- KATIYAR, S.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Introduction: sources, occurrence, nomenclature, and carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: **Hand Book of Chromatography**. [s.l.] CRC Press Boca Raton, FL. 1993. p. 1–17.
- KIM, A. et al. PAH, PCB, TPH and mercury in surface sediments of the Delaware River Estuary and Delmarva Peninsula, USA. **Marine pollution bulletin**. v. 129. n. 2. p. 835–845. 2018.
- KIRMAN, Z. D. et al. Composition and depth distribution of hydrocarbons in Barataria Bay marsh sediments after the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Pollution**. v. 214. p. 101–113. 2016.
- KOMILIS, D. P.; TZIOUVARAS, I. S. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. **Waste Management**. v. 29. n. 5. p. 1504–1513. 2009.

- KOROLEFF. F. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. **Information on techniques and methods for seawater analysis**. p. 19–22. 1970.
- KOTTUPARAMBIL. S.; AGUSTI. S. Cell-by-cell estimation of PAH sorption and subsequent toxicity in marine phytoplankton. **Chemosphere**. v. 259. p. 127487. 2020.
- KUBINCOVÁ. P. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and endocrine disruption: role of testicular gap junctional intercellular communication and connexins. **Toxicological Sciences**. v. 169. n. 1. p. 70–83. 2019.
- KUBITZ. J. A.; BESSER. J. M.; GIESY. J. P. A two-step experimental design for a sediment bioassay using growth of the amphipod *Hyaella azteca* for the test end point. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. v. 15. n. 10. p. 1783–1792. 1996.
- LABRE. J. C. C. et al. Testes ecotoxicológicos baseados na exposição de anelídeos e sementes de alface através da adição de diferentes concentrações de surfactantes ao solo. **Holos Environment**. v. 8. n. 2. 2008.
- LACERDA. L. D.; FREIXO. J. L.; COELHO. S. M. The effect of *Spartina alterniflora* Loisel on trace metals accumulation in inter-tidal sediments. **Mangroves and Salt Marshes**. v. 1. n. 4. p. 201–209. 1997.
- LAMPARELLI. M. et al. Sistema estuarino de Santos e São Vicente Relatório Técnico CETESB São Paulo 183p. 2001.
- LANÇAS. F. M. Extração em fase sólida (SPE). In: **Extração em fase sólida (SPE)**. [s.l.: s.n.]. p. 93–93.
- LERDA. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) factsheet. **Belgium. Joint Research Centre. European Commission**. p. 34. 2011.
- LI. F. et al. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China. **Marine pollution bulletin**. v. 85. n. 2. p. 590–596. 2014.
- LIN. Q. et al. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. **Marine pollution bulletin**. v. 44. n. 9. p. 897–902. 2002.
- LIN. Q.; MENDELSSOHN. I. A. Impacts and recovery of the Deepwater Horizon oil spill on vegetation structure and function of coastal salt marshes in the northern Gulf of Mexico. **Environmental science & technology**. v. 46. n. 7. p. 3737–3743. 2012.
- LINDAU. C. et al. Response of *Spartina alterniflora* vegetation to oiling and burning of applied oil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 38. n. 12. p. 1216–1220. 1999.
- LYNCH. J.; WISEMAN. A.; DE LEIJ. F. Ecotoxicology. 2001.
- MACIAS-ZAMORA. J.; MENDOZA-VEGA. E.; VILLAESCUSA-CELAYA. J. PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, BC, Mexico. **Chemosphere**. v. 46. n. 3. p. 459–468. 2002.

- MACIEL, D. C. et al. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf. Northeast of Brazil. **Marine pollution bulletin**. v. 101. n. 1. p. 429–433. 2015.
- MAHUGIJA, J. A.; AHMED, K. N.; MAKAME, Y. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in coastal mangrove ecosystems of the Zanzibar archipelago. **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**. v. 16. n. 1. p. 25–34. 2017.
- MARTINS, C. DE C. **Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho**. Doutorado em Oceanografia Química e Geológica—São Paulo: Universidade de São Paulo. 11 mar. 2005.
- MEDEIROS, P. M.; CARUSO BÍCEGO, M. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos. SP—Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49. n. 9–10. p. 761–769. nov. 2004.
- MELNYK, A. et al. Concentration and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in surface soil near a municipal solid waste (MSW) landfill. **Science of the Total Environment**. v. 530. p. 18–27. 2015.
- MELO, S. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos: adequação de metodologia para o anfípodo escavador *Tiburonella viscana*. **Master of Science Dissertation. Universidade de São Paulo. São Carlos. SP**. 1993.
- MELO, S.; ABESSA, D. Testes de toxicidade com sedimentos marinhos utilizando anfípodos. **Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil**. p. 163–178. 2002.
- MIURA, K. et al. Seasonal and annual changes in PAH concentrations in a remote site in the Pacific Ocean. **Scientific reports**. v. 9. n. 1. p. 1–10. 2019.
- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing Bacillus subtilis biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental monitoring and assessment**. v. 187. n. 1. p. 1–17. 2015.
- MOREIRA, I. T. et al. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) using *Avicenniaschaueriana*. **Marine pollution bulletin**. v. 67. n. 1–2. p. 130–136. 2013.
- MUSCO, M. et al. Benthic Foraminifera as bio-indicators of anthropogenic impacts in coastal environments: Acquadei Corsari area case study (Palermo. Italy). **Marine pollution bulletin**. v. 117. n. 1–2. p. 75–87. 2017.
- NA, M. et al. IMPACT OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ON MALE REPRODUCTIVE HEALTH IN COAL TAR WORKERS. **Egyptian Journal of Occupational Medicine**. v. 44. n. 1. p. 499–512. 2020.
- NEVES, D. e SOUSA R. Revolução Industrial. **Brasil Escola Online**. Acesso em 10-05-2021. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/historiag/revolucao-industrial.htm#:~:text=A%20Revolu%C3%A7%C3%A3o%20Industrial%20foi%20o,pr ocesso%20de%20forma%C3%A7%C3%A3o%20do%20capitalismo.>>>

- NISHIGIMA. F. Aplicação da HPLC na purificação dos extratos de hidrocarbonetos de sedimentos de Santos and Cananéia. São Paulo. Brazil. **Disertacao de Mestrado Instituto Oceanográfico da USP**. 1999.
- NISHIGIMA. F. N.; WEBER. R. R.; BÍCEGO. M. C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia. SP. Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 42. n. 11. p. 1064–1072. 2001.
- OBRIST. D.; ZIELINSKA. B.; PERLINGER. J. A. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs) in organic and mineral soil horizons from four US remote forests. **Chemosphere**. v. 134. p. 98–105. 2015.
- OLLIVON. D.; BLANCHARD. M.; GARBAN. B. PAH fluctuations in rivers in the Paris region (France): impact of floods and rainy events. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 115. n. 1. p. 429–444. 1999.
- PERALTA-ZAMORA. P.; MORAIS. J. L. DE; NAGATA. N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 10. n. 2. p. 106–110. 2005.
- PEREIRA NETTO. A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química nova**. v. 23. p. 765–773. 2000.
- PERINA. F. C. et al. Sediment quality assessment of the tributaries of the Santos–São Vicente Estuarine System–Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**. v. 13. n. 2. p. 25–38. 2018.
- PEZESHKI. S. et al. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental pollution**. v. 108. n. 2. p. 129–139. 2000.
- PIES. C. et al. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river bank soils. **Chemosphere**. v. 72. n. 10. p. 1594–1601. 2008.
- RAMDINE. G. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 79. p. 80–89. 2012.
- RAMIREZ. D.; DUSSAN. J. Landfarmed oil sludge as a carbon source for *Canavalia ensiformis* during phytoremediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**. v. 11. n. 5. p. 1197–1206. 2014.
- RAVINDRA. K.; SOKHI. R.; VAN GRIEKEN. R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric environment**. v. 42. n. 13. p. 2895–2921. 2008.
- READMAN. J. W. et al. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44. n. 1. p. 48–62. jan. 2002.
- REISH. D. J.; BARNARD. J. L. Amphipods (Arthropoda: Crustacea: Amphipoda). In: **Pollution ecology of estuarine invertebrates**. [s.l.] Elsevier. 1979. p. 345–370.

- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**. v. 27. n. 5. p. 771–780. 2004.
- ROBERTO, J.; LEE, W.-Y.; CAMPOS-DÍAZ, S. I. Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region. **Journal of Hazardous Materials**. v. 163. n. 2–3. p. 946–958. 2009.
- ROSLUND, M. I. et al. Endocrine disruption and commensal bacteria alteration associated with gaseous and soil PAH contamination among daycare children. **Environment international**. v. 130. p. 104894. 2019.
- RUMNEY, H. S.; BOLAM, S. G.; LAW, R. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments at dredged material disposal sites around England: Concentrations in 2013 and time trend information at selected sites 2008–2013. **Marine pollution bulletin**. v. 92. n. 1–2. p. 180–185. 2015.
- SALLA, V.; HARDAWAY, C. J.; SNEDDON, J. Preliminary investigation of *Spartina alterniflora* for phytoextraction of selected heavy metals in soils from Southwest Louisiana. **Microchemical Journal**. v. 97. n. 2. p. 207–212. 2011.
- SANTODONATO, J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. **Chemosphere**. v. 34. n. 4. p. 835–848. 1997.
- SANTOS, A. G. et al. A simple, comprehensive, and miniaturized solvent extraction method for determination of particulate-phase polycyclic aromatic compounds in air. **Journal of chromatography A**. v. 1435. p. 6–17. 2016.
- SANTOS, M. M. DOS et al. PAHs diagnostic ratios for the distinction of petrogenic and pyrogenic sources: applicability in the Upper Iguassu Watershed-Parana, Brazil. **Rbrh**. v. 22. 2017.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Grupo de ecossistemas: manguezal, marisma e apicum. **São Paulo**. 1999.
- SILVA, C. D. L. Estudo da distribuição de HPA's nos sedimentos de fundo da Baía do Guarujá, Porto de Miramar, Belém (PA). Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Geologia do Instituto de Geociências da Universidade Federal do Pará. 14+11+2012
- SISINNO, C. L. et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19. p. 671–676. 2003.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA, Canadá. Capítulo**. v. 4. p. 71–79. 2004.

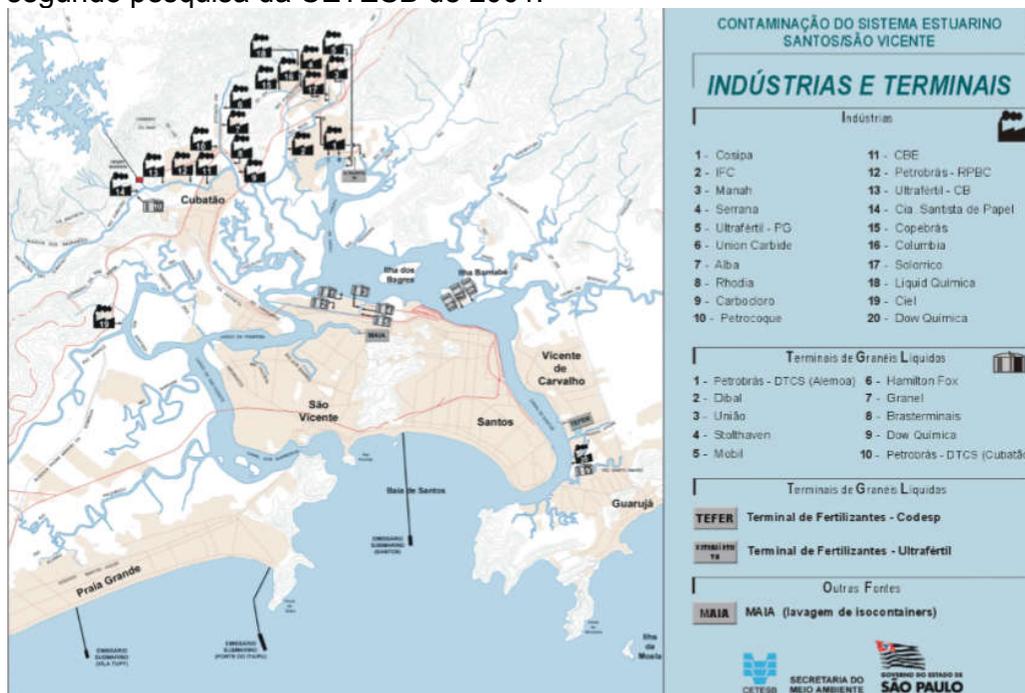
- SOUSA. R. História dos Combustíveis. **Brasil Escola online**. Acesso em: 10-05-2021. Disponível em: < Nos primeiros anos do século XX, a popularização dos automóveis ampliou ainda mais a demanda internacional por combustíveis de alto desempenho. Dessa forma, os combustíveis fósseis (então somente empregados na obtenção do querosene) passaram a ser >
- SOUZA. M. R. et al. Concentration, distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Poxim River sediments. Brazil. **Marine pollution bulletin**. v. 127. p. 478–483. 2018.
- SUGAUARA. L. E. Influência da fuligem da queima de palha de cana-de-açúcar na presença de HPA em hortaliças de consumo humano. 2014.
- SUKHDHANE. K. et al. Sources, distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the mangrove sediments of Thane Creek, Maharashtra, India. **Environmental monitoring and assessment**. v. 187. n. 5. p. 1–14. 2015.
- SUN. L. et al. Evaluation of heavy metal and polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in plants from typical industrial sites: potential candidate in phytoremediation for co-contamination. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 21. n. 21. p. 12494–12504. 2014.
- SYED. J. H. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chinese forest soils: profile composition, spatial variations and source apportionment. **Scientific reports**. v. 7. n. 1. p. 1–10. 2017.
- SYED. S. et al. Invasive *Spartina alterniflora* in controlled cultivation: environmental implications of converging future technologies. **Ecological Indicators**. v. 130. p. 108027. 2021.
- TAM. N. et al. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**. v. 114. n. 2. p. 255–263. 2001.
- THAMES, A. C. M. Projeto de lei n. 7.927 de 2017. Consultado em: 10-05-2020. Disponível em: <camara.leg.br/proposicoesWeb/prop\_mostrarintegra?Ocodteor=1575388
- THIER. H.-P.; ZEUMER. H. Manual of pesticide residue analysis. 1987.
- TIWARI. M.; SAHU. S.; PANDIT. G. Distribution of PAHs in different compartment of creek ecosystem: Ecotoxicological concern and human health risk. **Environmental toxicology and pharmacology**. v. 50. p. 58–66. 2017.
- TOBISZEWSKI. M.; NAMIEŚNIK. J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. **Environmental pollution**. v. 162. p. 110–119. 2012.
- TOMASETIG. F. et al. Comparative genotoxic potential of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons in three human cell lines. **Toxicology letters**. v. 326. p. 99–105. 2020.
- TORRES. R. J. et al. Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP. Brazil. **Journal of soils and sediments**. v. 9. n. 5. p. 420–432. 2009.

- VELHO, A. M. A. et al. Preliminary study by environmental indicator measurements of sediments in a mangrove forest in Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Journal of Environmental Protection**. v. 3. n. 8. p. 731–739. 2012.
- VENTURINI, N. et al. Characterization of the benthic environment of a coastal area adjacent to an oil refinery, Todos os Santos Bay (NE-Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 52. p. 123–134. 2004.
- VENTURINI, N.; MUNIZ, P.; RODRIGUEZ, M. Macro-benthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-eastern coastal region of South America. **Marine Biology**. v. 144. n. 1. p. 119–126. 2004.
- VENTURINI, N.; TOMMASI, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todosos Santos Bay, Northeastern. Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v. 48. n. 1–2. p. 97–107. 2004.
- VERÂNE, J. et al. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments using *Rhizophora mangle*. **Marine Pollution Bulletin**. v. 160. p. 111687. 2020.
- VIANA, F. V. Acumulação de HPAs pela *spartina alterniflora* cultivada em solo de landfarming de indústria petroquímica. 2008.
- VIGLIO, J. E. et al. NOT ALL GLITTERS IN THE BLACK GOLD: UNCERTAINTIES AND ENVIRONMENTAL THREATS OF THE BRAZILIAN PRE-SALT 1. **Ambiente & Sociedade**. v. 20. p. 21–38. 2017.
- VILLAR-VIDAL, M. et al. Air Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) associated with PM<sub>2.5</sub> in a North Cantabric coast urban environment. **Chemosphere**. v. 99. p. 233–238. 2014.
- WANG, C. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from urban to rural areas in Nanjing: concentration, source, spatial distribution, and potential human health risk. **Science of the Total Environment**. v. 527. p. 375–383. 2015a.
- WANG, Q. et al. Studies on size distribution and health risk of 37 species of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with fine particulate matter collected in the atmosphere of a suburban area of Shanghai city, China. **Environmental Pollution**. v. 214. p. 149–160. 2016.
- WANG, Y. et al. Genotypic responses of bacterial community structure to a mixture of wastewater-borne PAHs and PBDEs in constructed mangrove microcosms. **Journal of hazardous materials**. v. 298. p. 91–101. 2015b.
- WANG, Y.-C. et al. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon uptake pathways and risk assessment of vegetables from waste-water irrigated areas in northern China. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 13. n. 2. p. 433–439. 2011.
- WANG, Z. et al. Distribution of PAHs in tissues of wetland plants and the surrounding sediments in the Chongming wetland, Shanghai, China. **Chemosphere**. v. 89. n. 3. p. 221–227. 2012.

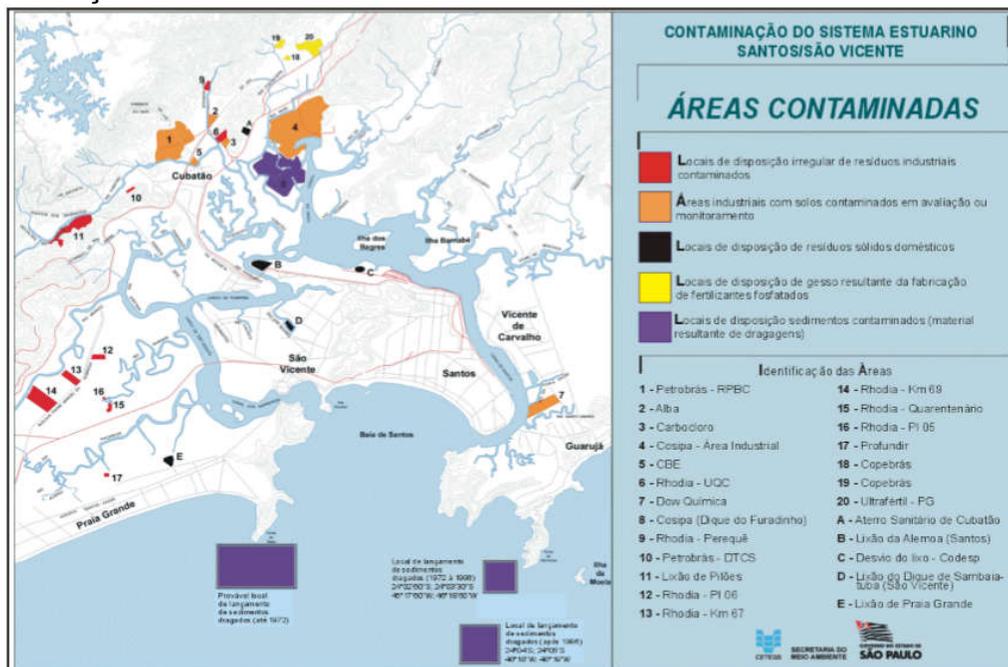
- WISEMAN, A.; GOLDFARB, P. S. Biomonitoring,ecoextrapolation and then bioremediation for eco restoration? **TRENDS in Biotechnology**. v. 19. n. 1. p. 7–8. 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans.**Agents Classified by the IARC Monographs**. p. 1–125. 2020.
- XIE, R. et al. Heavy metal accumulation affected by *Spartina alterniflora* invasion in estuarine wetland sediments.**Journal of Natural Resources**. v. 35. n. 5. p. 05001238. 2020.
- YANG, Y. et al. Characterization of bacterial communities associated with the exotic and heavy metal tolerant wetland plant *Spartina alterniflora*.**Scientific reports**. v. 10. n. 1. p. 1–11. 2020.
- YOON, S. J. et al. Distributions of persistent organic contaminants in sediments and their potential impact on macrobenthic faunal community of the Geum River Estuary and Saemangeum Coast.Korea.**Chemosphere**. v. 173. p. 216–226. 2017.
- YUNKER, M. B. et al. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition.**Organic geochemistry**. v. 33. n. 4. p. 489–515. 2002.
- ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants.**Environmental Research. Engineering & Management**. v. 46. n. 4. 2008.
- ZANARDI-LAMARDO, E. et al. Distribution and sources of organic contaminants in surface sediments of Hooghly river estuary and Sundarban mangrove. eastern coast of India.**Marine pollution bulletin**. v. 146. p. 39–49. 2019.
- ZHANG, J. et al. Distribution and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in Bank soils and river sediments from the middle reaches of the HuaiheRiver.China.**CLEAN–Soil. Air. Water**. v. 43. n. 8. p. 1207–1214. 2015.

7 ANEXO

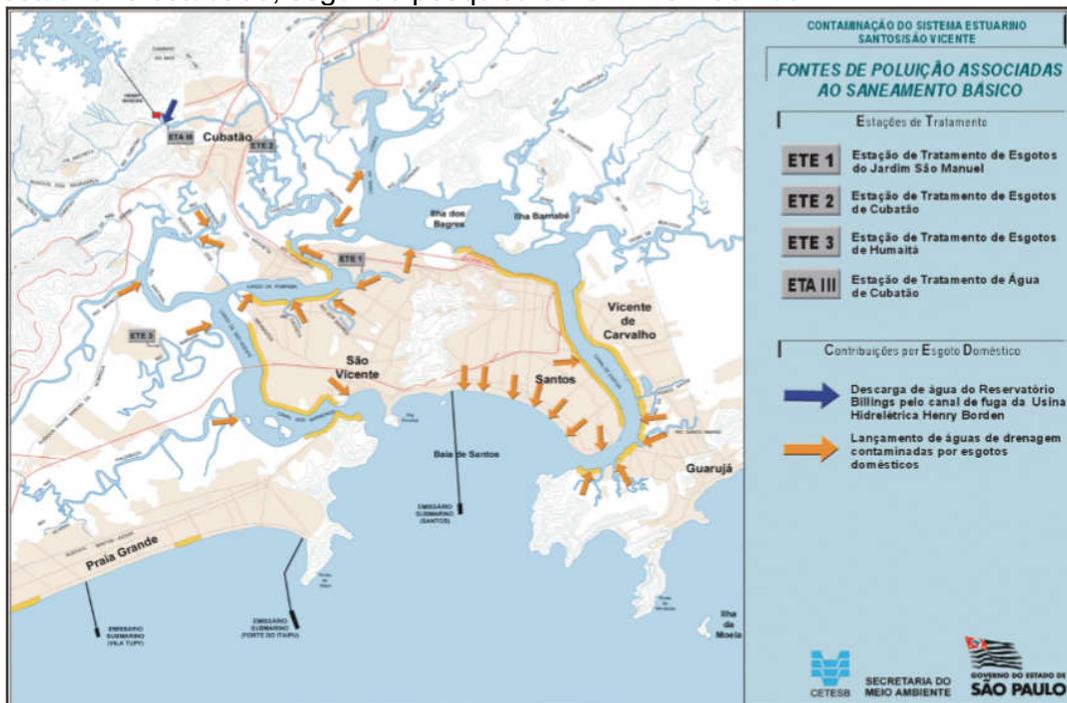
A. Mapa das indústrias e terminais estabelecidos no sistema estuarino estudado, segundo pesquisa da CETESB de 2001.



B. Mapa das áreas contaminadas no sistema estuarino estudado segundo pesquisa da CETESB de 2001 e tipos de descartes que podem ocasionar essas contaminações.



C. Mapa dos locais de poluição associados ao saneamento básico no sistema estuarino estudado, segundo pesquisa da CETESB de 2001.



Anexos D Mapas dos HPAs estudados:

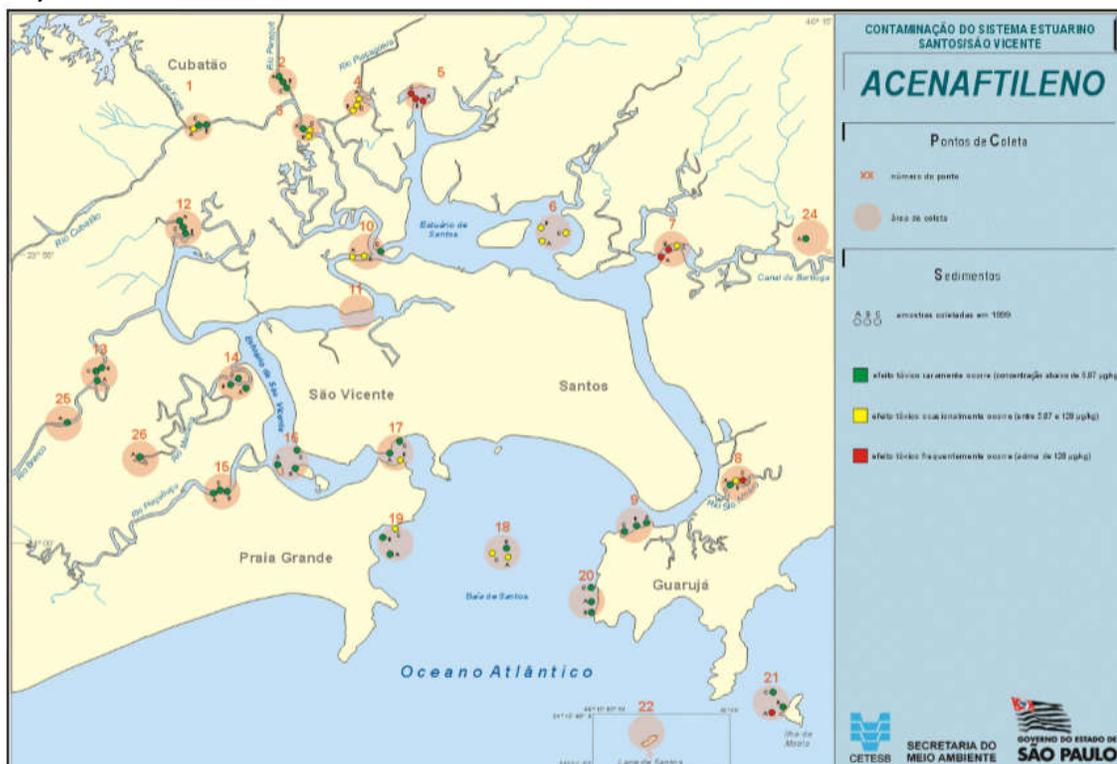
D1) Naftaleno



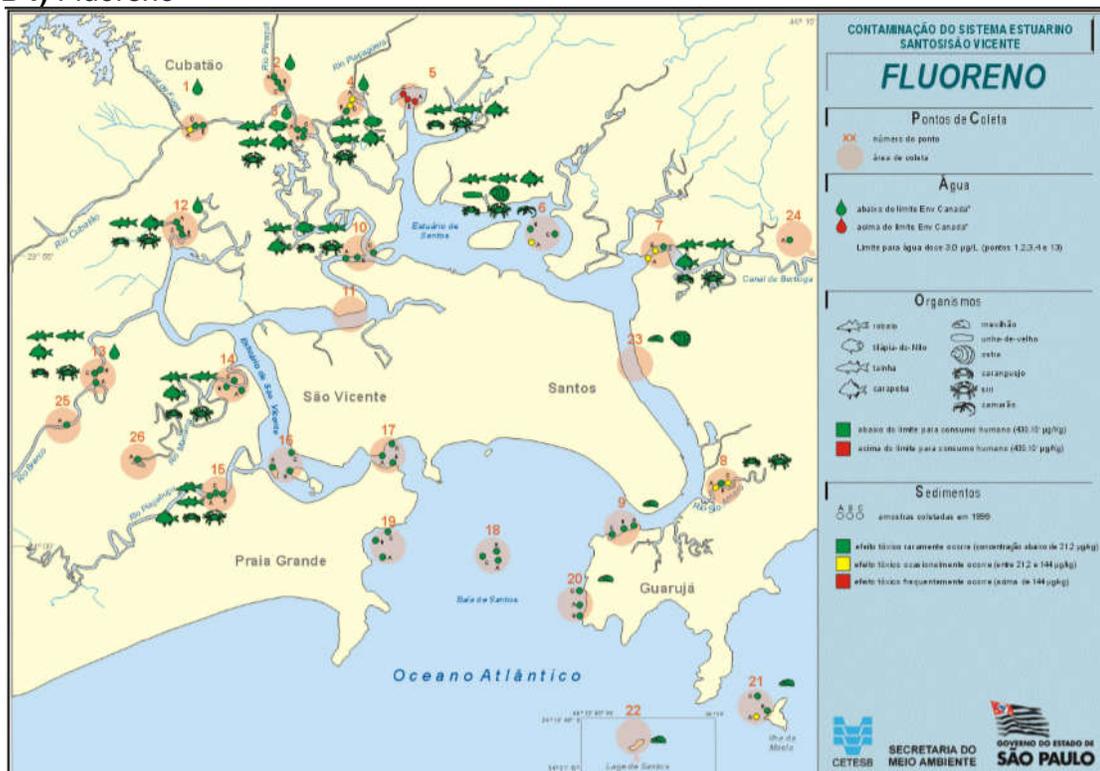
D2) Acenafeno



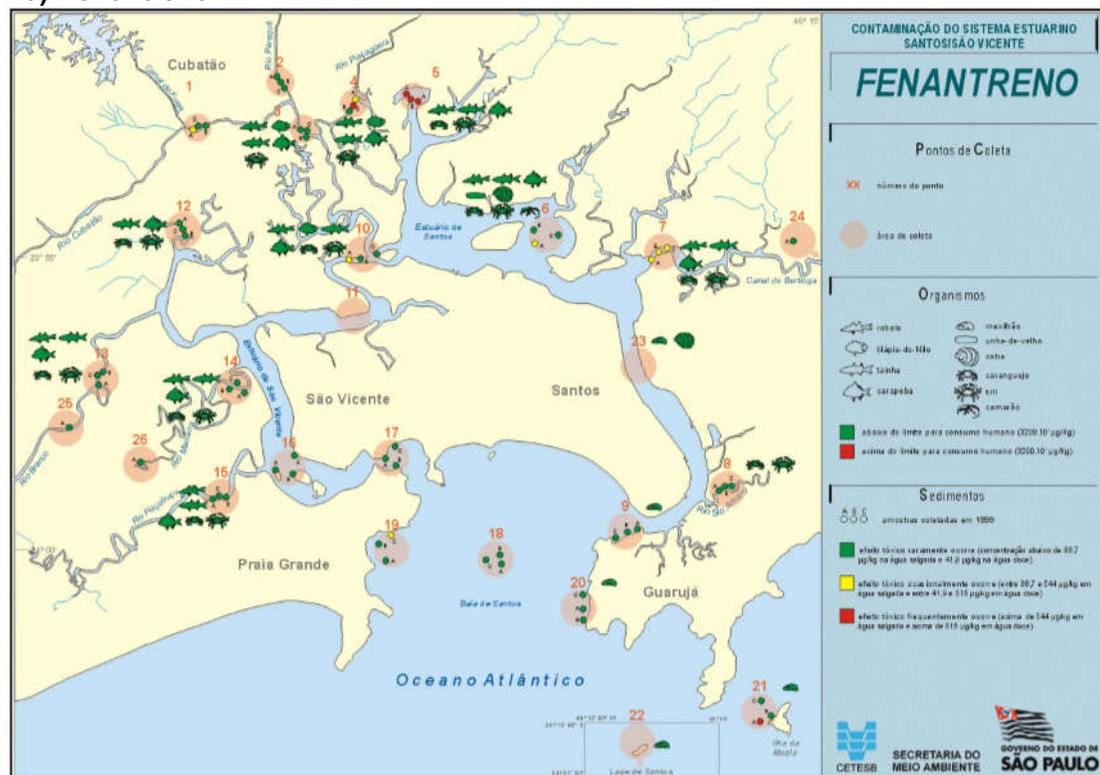
D3) Acenafileno



D4) Fluoreno



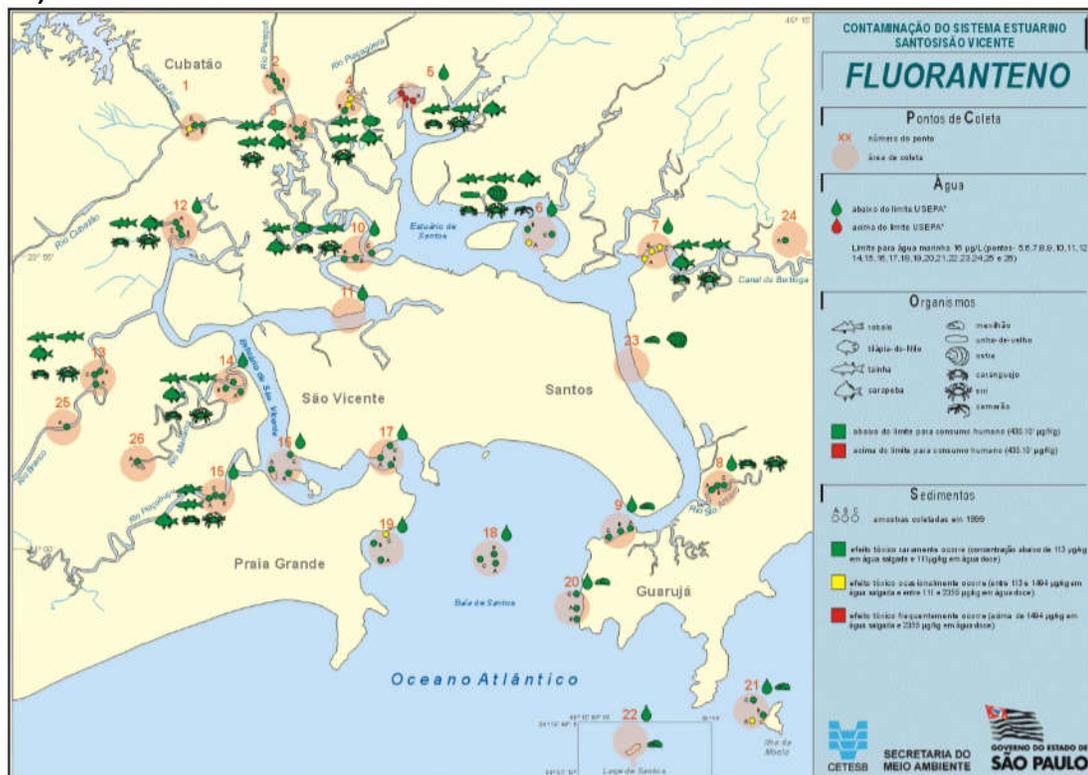
D5) Fenantreno



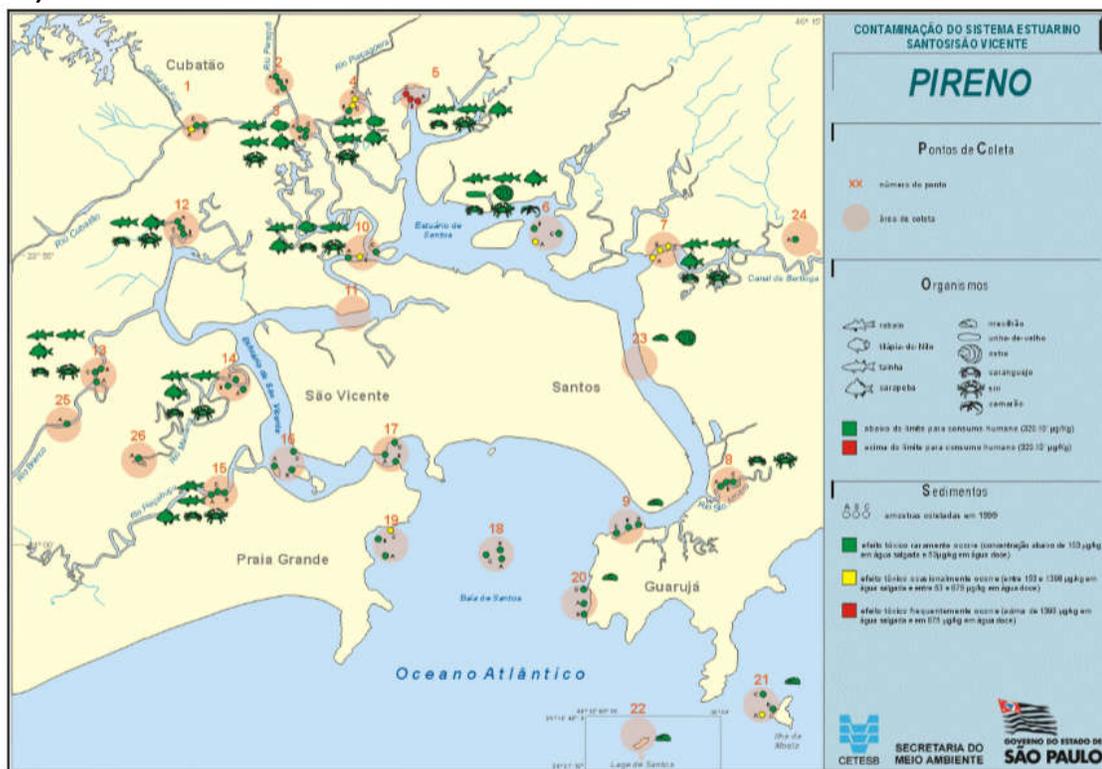
D6) Antraceno



D7) Fluoranteno



D8) Pireno



D9) Benzo(a)antraceno



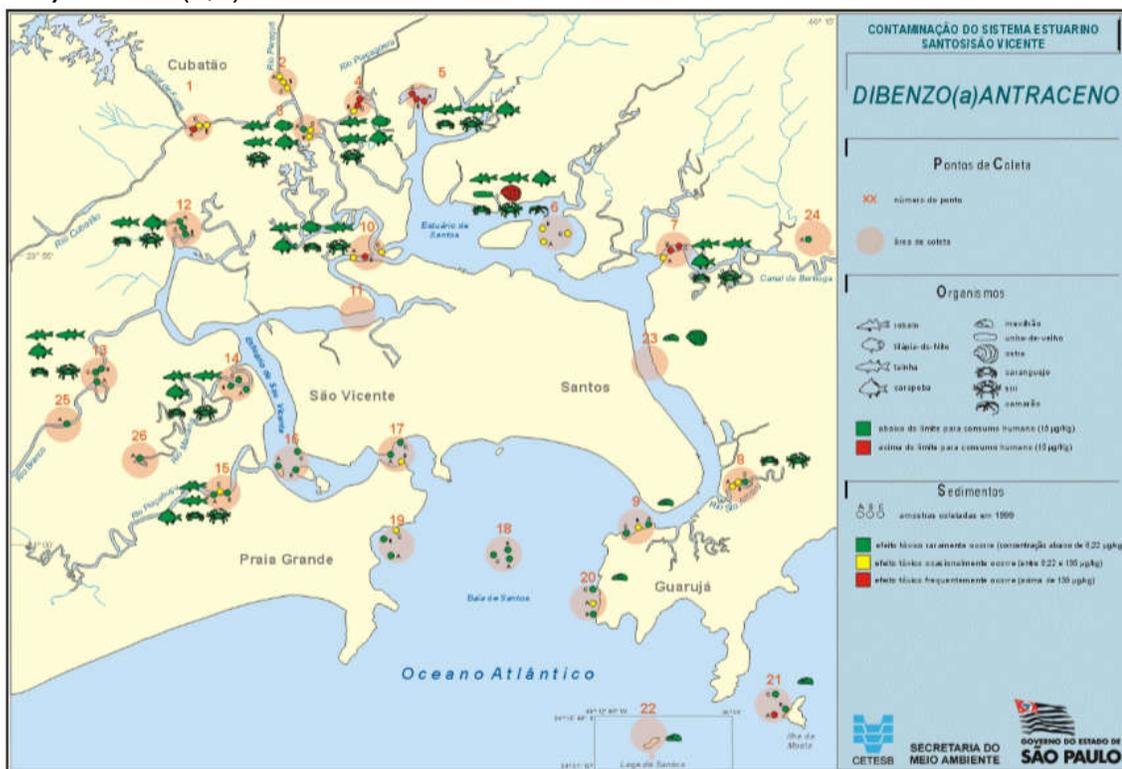
D10) Criseno



D11) Benzo(a)pireno

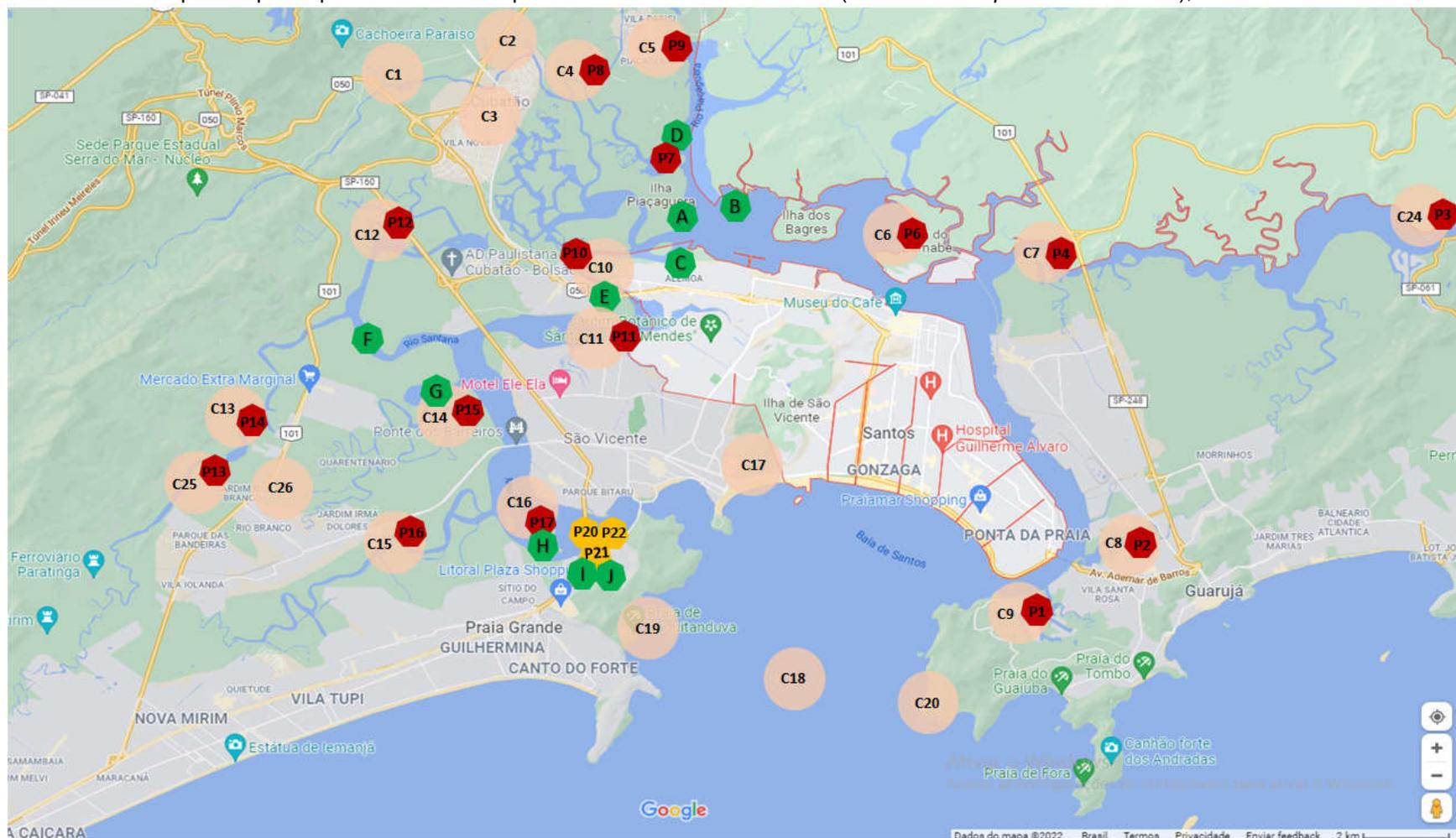


**D12) Dibenzo(a,h)antraceno**



## 8 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Mapa completo: pontos CETESB e pontos de coleta deste trabalho (sedimento e *Spartina alterniflora*),



- local amostragem sedimento
- local amostragem *Spartina alterniflora*
- local amostragem CETESB 2001

## APÊNDICE 2.

MALHA TAMANHO				
	>1000	18 >63	250 >25	500 ≤25
AMOSTRA	PORCENTAGEM			
1	38	62	0	0
2	70	29	1	0
3	33	65	1	0
4	19	80	1	0
6	23	74	2	1
7	9	81	8	2
8	10	76	11	3
9	0	80	15	4
10	7	88	5	1
11	0	90	7	3
12	7	85	6	2
13	2	93	4	1
14	4	90	5	1
15	0	91	7	1
16	7	88	4	1
17	8	87	4	1
20	16	81	2	1
21	1	97	1	0
22	3	94	2	1
BM	1	97	2	1
BN	3	95	1	0
ARIRI	0	97	3	0
CAN	0	98	2	0

APÊNDICE 3: Valores das razões de diagnóstico calculadas e respectivos diagnósticos.

	Fen/ Pir	DIAG,	Flt/ Pir	DIAG,	BaA/ Cri	DIAG,	BbF/ BKF	DIAG,	Ind/ BghiP	DIAG,	Pir/ BaP	DIAG,	L/H	DIAG,	LHPA/ HHPA	DIAG,
3	2,5	PIROGÊNICA	1	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	1,2	PIROGÊNICA	1,3	EMIÇÃO VEICULAR	1,1	COMB, PE- TROGÊNICO	0,4	QUEIMA MADEI- RA	0,5	PIROGÊNICA	0,08	PIROGÊNICA
4	4,6	PIROGÊNICA	0,9	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	1	PIROGÊNICA	1,6	EMIÇÃO VEICULAR	8,3		1,4	QUEIMA GASOLI- NA	0,5	PIROGÊNICA	0,17	PIROGÊNICA
6	2,6	PIROGÊNICA	1	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	1	PIROGÊNICA	1,3	EMIÇÃO VEICULAR	1,1	COMB, PE- TROGÊNICO	0,9	QUEIMA GASOLI- NA	0,48	PIROGÊNICA	0,07	PIROGÊNICA
7	3,8	PIROGÊNICA	1,2	PIROGÊNICA	1,3	PIROGÊNICA	0,5	ASFALTO/ ÓLEO CRU	0,8	FONTES MISTAS	0,2	QUEIMA MADEI- RA	0,12	PIROGÊNICA	0,13	PIROGÊNICA
8	1,8	PIROGÊNICA	11,4		0,1	PETROGÊNICA	0,01	ASFALTO/ ÓLEO CRU	1,2	COMB, PE- TROGÊNICO	0,01		0,22	PIROGÊNICA	0,35	PIROGÊNICA
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	PETROGÊNICA
11	4,1	PIROGÊNICA	0,8	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	0,2	PETROGÊNICA	1,5	EMIÇÃO VEICULAR	11,2		2	QUEIMA GASOLIN A	1,15	PETROGÊNICA	0,1	PIROGÊNICA
12	-	-	-	-	0,4	FONTES MISTAS	1,6	EMIÇÃO VEICULAR	0,9	FONTES MISTAS	1	QUEIMA GASOLIN A	0,23	PIROGÊNICA	0,03	PIROGÊNICA
13	5,8	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	0,7	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	-	-	1,5	-	1,7	COMB, PE- TROGÊNICO	1,6	QUEIMA GASOLIN A	0,92	PIROGÊNICA	0,15	PIROGÊNICA
14	3,7	PIROGÊNICA	-	-	1,3	PIROGÊNICA	1,3	EMIÇÃO VEICULAR	-	-	1,6	QUEIMA GASOLIN A	0,62	PIROGÊNICA	0,11	PIROGÊNICA
15	-	-	0,8	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	-	-	-	-	-	-	-	-	3,64	PETROGÊNICA	0,04	PIROGÊNICA
16	-	-	-	--	0,6	PIROGÊNICA	-	-	-	-	1,47	QUEIMA GASOLI- NA	1,01	PETROGÊNICA	-	-

APÊNDICE 3. continuação

Fen/Pir	DIAG,	Fit/Pir	DIAG,	BaA/Cri	DIAG,	BbF/BkF	DIAG,	Ind/BghiP	DIAG,	Pir/BaP	DIAG,	L/H	DIAG,	LHPA/HHPA	DIAG,
17	-	0,7	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	-	-	-	-	-	-	1,4	QUEIMA GASOLINA	1,92	PETROGÊNICA	0,27	PIROGÊNICA
P1	1	0,6	MISTAS/ QUEIMA DE GASOLINA	1,2	PIROGÊNICA	1,3	EMISSÃO VEICULAR	0,9	FONTES MISTAS	-	-	0,71	PIROGÊNICA	0,15	PIROGÊNICA
P2	-	1,1	PIROGÊNICA	-	-	-	-	-	-	-	-	4,45	PETROGÊNICA	0,40	PIROGÊNICA
PS P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,08	PETROGÊNICA	-	-
ARI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,32	PETROGÊNICA	1	-
BM	3,5	1,1	PIROGÊNICA	1,2	PIROGÊNICA	1,1	-	1,2	COMB, PETROGÊNICO	2,4	QUEIMA GASOLINA	0,76	PIROGÊNICA	0,06	PIROGÊNICA
BN	5,3	-	MISTAS/QUEIMA DE GASOLINA	1	PIROGÊNICA	1,3	EMISSÃO VEICULAR	1,2	COMB, PETROGÊNICO	2,6	QUEIMA GASOLINA	0,6	PIROGÊNICA	0,13	PIROGÊNICA

DIAG: diagnóstico

## APÊNDICE 4. Tabela fatores da PCA

Variable	Variable contributions, based on correlations (PCA dos HPA)													
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Fact,10	Fact,11	Fact,12	Fact,13	Fact,14
Act	0,050787	0,187084	0,015595	0,002675	0,000001	0,014137	0,036452	0,536214	0,031949	0,011696	0,005812	0,004220	0,086305	0,017002
Flu	0,055435	0,102220	0,134921	0,157074	0,005615	0,089654	0,021368	0,000604	0,000212	0,000000	0,216148	0,046767	0,085349	0,084336
Fen	0,074651	0,000802	0,143955	0,004258	0,000521	0,032560	0,352766	0,080918	0,274346	0,018947	0,008681	0,005832	0,000047	0,000030
Ant	0,079946	0,001575	0,012209	0,004835	0,251184	0,345468	0,240198	0,000152	0,024280	0,013460	0,000390	0,000020	0,018119	0,007981
Flt	0,051488	0,171083	0,019495	0,015886	0,206977	0,371254	0,003063	0,009406	0,004047	0,026029	0,008611	0,013410	0,034822	0,051316
Pir	0,046817	0,191152	0,067845	0,039465	0,040906	0,025557	0,000159	0,001445	0,070572	0,000370	0,273852	0,002343	0,224612	0,000134
Cri	0,081044	0,005056	0,001144	0,060297	0,017871	0,045729	0,008019	0,033990	0,037481	0,532899	0,077323	0,031379	0,008143	0,054428
BaA	0,073209	0,012549	0,127238	0,000964	0,191083	0,011314	0,227375	0,007321	0,157092	0,007011	0,010980	0,002035	0,001730	0,164689
BbF	0,081209	0,003435	0,015195	0,020244	0,106100	0,005994	0,030351	0,004435	0,005250	0,075247	0,079573	0,391124	0,036635	0,128714
BkF	0,056084	0,153633	0,028995	0,000000	0,004180	0,000329	0,035461	0,186957	0,048404	0,014738	0,000312	0,022835	0,000167	0,417703
BaP	0,050677	0,105482	0,018031	0,653367	0,019740	0,000819	0,005825	0,001528	0,003184	0,003310	0,082595	0,001555	0,035466	0,002980
Ind	0,082256	0,001049	0,002821	0,033798	0,037534	0,012575	0,010949	0,002193	0,079714	0,159533	0,089095	0,472444	0,008474	0,000239
Dib	0,063648	0,035833	0,243677	0,006728	0,112194	0,004201	0,003053	0,033555	0,025727	0,017328	0,113580	0,002230	0,271575	0,066413
BghiP	0,069555	0,026864	0,168059	0,000303	0,005080	0,038722	0,023740	0,091531	0,232615	0,118449	0,031636	0,000059	0,184781	0,001083
+HPA	0,083195	0,002184	0,000820	0,000107	0,001013	0,001688	0,001220	0,009750	0,005126	0,000983	0,001410	0,003748	0,003775	0,002950