

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA E ECOLOGIA
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

TIAGO FRAGA FERRÃO

**GEOQUÍMICA ORGÂNICA E DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO FECAL NA PORÇÃO NORTE
DA BAÍA DE VITÓRIA, ES.**

VITÓRIA
2009

TIAGO FRAGA FERRÃO

**GEOQUÍMICA ORGÂNICA E DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO FECAL NA PORÇÃO NORTE
DA BAÍA DE VITÓRIA, ES.**

Monografia apresentada como requisito à
conclusão de curso de graduação em
Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Rodrigues Neto.

VITÓRIA
2009

TIAGO FRAGA FERRÃO

**GEOQUÍMICA ORGÂNICA E DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO FECAL NA PORÇÃO NORTE
DA BAÍA DE VITÓRIA, ES.**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Oceanografia do Departamento de Oceanografia e do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Rodrigues Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Gilberto Fonseca Barroso
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Maristela de Araújo Vicente
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória

Novembro, 2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e pelas oportunidades.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes com amor e apoio e aos meus familiares.

A Larissa, minha namorada, pelo carinho e compreensão.

Aos meus colegas de faculdade pelo companheirismo.

Ao Renato, meu orientador, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e ao Gilberto, pelo apoio prestado.

A Maristela Vicente, do LabPetro, pela solicitude e auxílio, importantíssimos para o desenvolvimento deste projeto.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos amostrais e respectivas massas de coprostanol.....	24
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do coprostanol.....	11
Figura 2: Reação de redução do colesterol a coprostanol (produzido nos intestinos de animais) e colestanol (produzido no meio-ambiente).....	11
Figura 3: Sistema Estuarino da Grande Vitória (SEGV) e localização dos pontos amostrais.....	19
Figura 4: Amostra 29 com aproximação no tempo de retenção do coprostanol, aproximadamente 38,75 minutos.....	24
Figura 5: Espectro de massa do coprostanol.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4 METODOLOGIA	18
4.1 Área de estudo	18
4.2 Materiais e métodos	19
4.2.1 Amostragem em campo.....	19
4.2.2 Limpeza de vidraria.....	20
4.2.3 Extração de lipídios.....	20
4.2.4 Saponificação.....	20
4.2.5 Cromatografia em coluna de sílica.....	21
4.2.6 Preparação prévia à injeção em cromatógrafo gasoso de espectrometria de massa (GC-MS).....	22
4.2.7 Injeção em cromatógrafo gasoso de espectrometria de massa (GC-MS).....	22
4.2.8 Identificação e quantificação do composto.....	23
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	29
9 REFERÊNCIAS	30

RESUMO

As regiões costeiras e vales de rios apresentam elevada taxa de ocupação humana, o que promove a introdução de compostos orgânicos ao meio ambiente, como os esgotos domésticos. As análises de poluentes orgânicos são geralmente realizadas por método microbiológico, entretanto a avaliação de poluição por biomarcadores lipídicos, como os esteróis fecais tem se mostrado mais precisa e confiável. O coprostanol é um esterol indicador de poluição fecal humana, logo sua presença caracteriza contaminação ambiental por efluentes domésticos.

Neste estudo foram analisadas amostras de sedimento superficial da porção norte da Baía de Vitória, região metropolitana de Vitória, ES. Esta baía sofre influência de quatro municípios, Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra, municípios bastante urbanizados. As amostras sedimentares foram submetidas ao método de cromatografia gasosa com espectrometria de massa, que permitiu identificar e quantificar a concentração de coprostanol e, desta forma, determinar a poluição por esgotos e identificar as áreas com maior contaminação orgânica de origem antrópica.

Os resultados encontrados não corresponderam à expectativa inicial, que era constatar uma elevada contaminação orgânica de origem antrópica, tal qual relatado pela literatura em estudos anteriores da mesma área de estudo e de áreas com características semelhantes.

As estações localizadas próximas à margem do município de Vitória apresentaram as maiores concentrações de coprostanol, ou seja, maior contaminação por esgoto doméstico, o que possivelmente reflete a elevada densidade demográfica e taxa de urbanização deste município. Estações mais distantes das margens e mais próximas à margem do município de Cariacica demonstraram menores concentrações do composto analisado, o que indica um sedimento menos contaminado por feco-esteróis humanos.

A repetição do experimento a fim de melhorar o sinal analítico seria interessante, bem como estudos complementares, para ratificar ou retificar o resultado obtido no presente estudo.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, regiões costeiras e vales de rios foram primariamente ocupados, mantendo uma relação constante entre ser humano e recursos hídricos. Recentemente, estima-se que 60% da população mundial habite a zona costeira (Burke *et al.*, 2001).

Esta ocupação populacional, junto ao desenvolvimento industrial e tecnológico e exploração de recursos naturais, promove uma crescente introdução de compostos orgânicos ao meio ambiente, devido principalmente ao aporte de efluentes urbanos não tratados (Bicego & Montone, 2008). “A industrialização e a urbanização em áreas litorâneas têm contribuído para a contaminação e a degradação de ambientes estuarinos, colocando em risco o equilíbrio de importantes ecossistemas, a exemplo dos manguezais” (LUIZ-SILVA *et al.*, 2006).

Além disso, os esgotos introduzem no meio ambiente uma série de compostos, a exemplo de metais traço e compostos orgânicos (nutrientes), como nitrogênio e fósforo.

O lançamento de esgotos domésticos, com ou sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos afeta a qualidade da água do sistema receptor, provocando redução do oxigênio dissolvido, aumento da turbidez, mudanças do pH, entre outros efeitos, e tem reflexo sobre a manutenção das condições ideais para a sobrevivência dos organismos e sobre a saúde humana (CARREIRA *et al.*, 2001).

Visto isso, para reduzir o aporte de nutrientes para os corpos hídricos é necessário estabelecer um plano de manejo para as fontes poluentes, bem como para o transporte destas, por meio de uma combinação entre melhorias no sistema de tratamento de esgotos e reabilitação de sistemas hídricos (Kronvang *et al.*, 1999a).

O oceano é comumente destino final de efluentes, entretanto seu potencial de diluição é limitado, em especial em áreas costeiras abrigadas, visto a menor

energia hidrodinâmica (Bicego & Montone, 2008). É, portanto, de suma importância para a saúde pública e ambiental o monitoramento e a avaliação de poluentes nestas regiões.

As análises de poluentes orgânicos característicos de esgotos são tradicionalmente realizadas por métodos microbiológicos com base em quantificação de bactérias, caracterizados pela presença de coliformes fecais - atualmente denominados termotolerantes – ou *Escherichia coli* (Barlett, 1987) e enterococcus (Leeming *et al.*, 1996).

Contudo, Bicego & Montone (2008) ao citarem Silva e outros (2003) atentam ao fato de que estes organismos não apresentam longo tempo de residência no ambiente marinho, em função da radiação solar, da temperatura, da salinidade e das relações biológicas, como predação. De acordo com Isobe e outros (2004), análises de indicadores microbianos de poluição fecal são críticas em ambientes tropicais, além de não distinguirem o tipo de material fecal (Cabelli *et al.*, 1983).

Já outros patógenos podem sobreviver por muito mais tempo nessas condições, representando riscos ambientais e sanitários. Logo novos métodos avaliativos de qualidade da água têm sido propostos, como os esteróis fecais (Isobe *et al.*, 2004), a destacar os indicadores de material fecal antrópico.

“O termo esterol fecal é a denominação para os esteróis encontrados em material fecal” (BICEGO & MONTONE, 2008).

“O coprostanol (5β (H)-colestano-3 β -ol) (Figura 1) tem sido utilizado como indicador de poluição fecal, estando associado às fezes de animais superiores. Este composto é gerado a partir da ação microbiana sobre o colesterol” (GRIMALT *et al.*, 1990 *apud* BICEGO & MONTONE, 2008), conforme mostrado na Figura 2. Logo, sua presença no sedimento caracteriza poluição por efluentes domésticos (Venkatesan & Kaplan, 1990), motivo pelo qual tem sido utilizado como traçador de poluição de origem doméstica (Leblanc *et al.*, 1992).

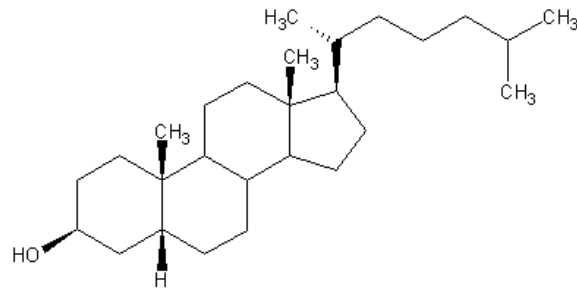


Figura 1: Estrutura do coprostanol. Fonte: CARREIRA e outros (2001).

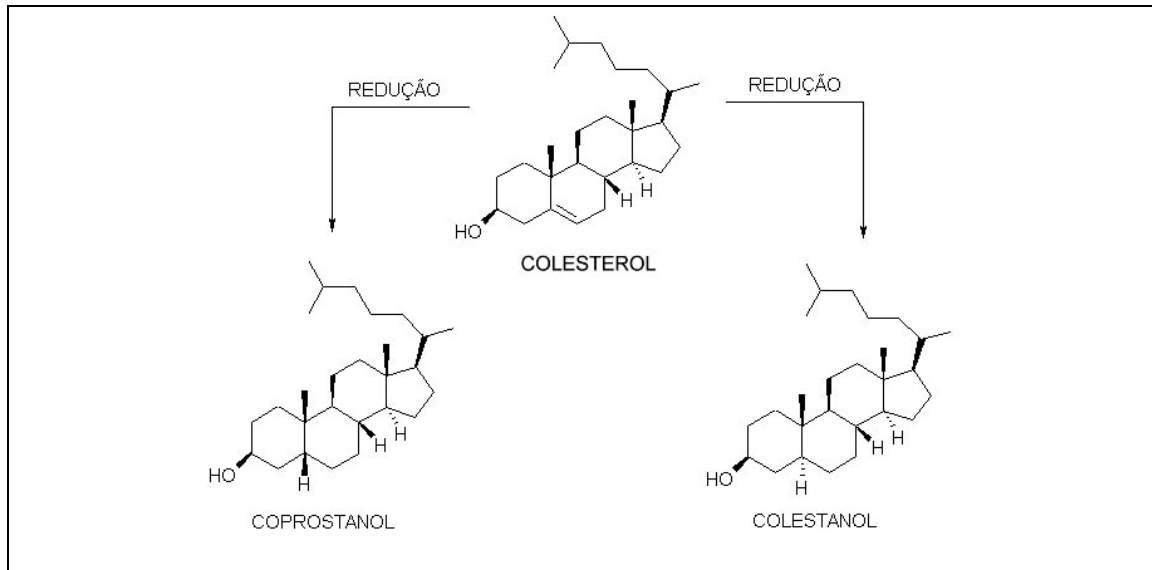


Figura 2: Reação de redução do colesterol a coprostanol (produzido nos intestinos de animais) e colestanol (produzido no meio-ambiente).

A região da baía de Vitória, Espírito Santo, sofre constantemente com a emissão de efluentes domésticos, sendo possivelmente bastante influenciada por materiais orgânicos oriundos dos municípios em seu entorno.

Este trabalho visa a realizar a análise de matéria orgânica por meio de um biomarcador lipídico - o coprostanol – utilizando-o para avaliar a magnitude da poluição na porção norte da Baía de Vitória, verificando as áreas de maior contaminação.

Espera-se que várias fontes sejam de origem antrópica, a destacar os esgotos. Logo, os resultados obtidos nesta análise podem subsidiar a tomada de decisão no gerenciamento ambiental, possibilitando um melhor direcionamento

de medidas mitigadoras do problema “poluição”, tanto preventivas quanto remediadoras.

Ressalta-se que a baía de Vitória tem sido foco de várias pesquisas já financiadas por agências de fomento, sendo este projeto complementar a vários outros já efetuados no Sistema Estuarino da Grande Vitória. Vale mencionar que este estudo é componente do projeto Avaliação Ambiental Integrada de Ambientes Estuarinos, financiado pela FACITEC.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a poluição por esgotos em sedimentos na porção norte da baía de Vitória, por meio de biomarcadores lipídicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as áreas com maior contaminação de origem orgânica utilizando o método de feco-esteróis.
- Avaliar a magnitude da contaminação fecal antrópica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo Lemos & Oliveira (2004), não há um consenso global sobre o futuro dos recursos hídricos e cada vez mais países procuram desenvolver políticas de conservação para tais, visando a aliar desenvolvimento econômico e sustentabilidade ambiental. Atualmente ocorre uma tendência de criação de agentes gestores integrados e descentralizados, como os comitês de bacias hidrográficas. Tal fato corresponde a um novo paradigma em manejo hídrico. O Brasil, acompanhando esta tendência, formulou em 1997 a Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH). Esta política demonstra a preocupação em manter os recursos hídricos em boas condições ambientais, o que, considerando a importância destes recursos, é de suma importância socioambiental.

Para uma eficaz manutenção da qualidade dos recursos hídricos, deve-se empregar uma visão holística, visando a manejar toda a bacia hidrográfica.

Lemos & Oliveira (2004) consideram que ao manejar uma bacia hidrográfica devem ser analisados aspectos institucionais e físicos, em que aqueles se referem a aspectos político-legais e estes se referem a clima, vegetação, geomorfologia, pedologia, dentre outros fatores. Dentre as características institucionais é possível citar a transparência governamental (Lemos & Oliveira, 2004), que é inclusive um princípio da administração pública de acordo com a Constituição Federal, e a participação da comunidade local. Os autores conferem especial importância a alguns indicadores, a mencionar regulação ambiental adequada, capital social e educação, mecanismos mediadores de conflitos, recursos humanos e financeiros, dentre outros. Já dentre as características físicas, uma feição de destaque é o regime pluvial ao longo do ano (Lemos & Oliveira, 2004).

Outro importante fator físico-químico diz respeito à ciclagem de nutrientes na bacia hidrográfica, em que são de grande importância os sumidouros – denitrificação e sedimentação – e o tempo de residência na coluna de água (Kronvang *et al.*, 1999b).

Dentre as metas apresentadas pelas políticas de gerenciamento de recursos hídricos se enquadra a manutenção da qualidade da água, o que inclui o controle da poluição.

Na última década houve melhorias no que tange ao desenvolvimento e à criação de programas de controle e manejo de combate à poluição (Baker & Senft, 1992), em especial a poluição por esgotos *in natura*.

“O esgoto consiste em uma mistura complexa de dejetos humanos, água e compostos químicos derivados de produtos de uso doméstico e/ou industrial” (KENNISH, 1997 *apud* Bicego & Montone, 2008).

Weber (1992) citado por Bicego & Montone (2008) considera os esgotos o maior problema global de poluição marinha, tanto em volume de material despejado quanto em questões de saúde pública relacionadas a doenças tais quais hepatite viral e cólera.

Esgotos podem conter vários organismos patogênicos causadores de pólio, tifo, desinteira, tétano e tuberculose. Por isso, a contaminação de água potável por microrganismos é um sério problema (McCalley *et al.*, 1980).

Bicego & Montone (2008) ainda relatam eutrofização, redução da biodiversidade de espécies e redução do oxigênio dissolvido como impactos associados à presença de esgoto em corpos hídricos. Como resultado dos aportes de nutrientes, observa-se que a eutrofização é um dos principais problemas globais para qualidade ecológica e manutenção da biodiversidade dos ecossistemas aquáticos (Baker & Senft, 1992).

Observa-se, pois, que a poluição por matéria orgânica é um problema na qualidade da água, sendo importante ao manejo deste tema identificar as fontes de material fecal. A identificação das fontes pode ser feita por meio de biomarcadores, em particular esteróis fecais, os quais oferecem um novo e vantajoso método que permite a distinção entre fontes de poluentes (Leeming *et al.*, 1994).

Os biomarcadores moleculares são compostos orgânicos capazes de manter uma integridade estrutural capaz de reconstituir a fonte. “Quando material fecal é introduzido em ambiente aquático, esteróis fecais lipofílicos como o coprostanol são fortemente incorporados ao material particulado” (HATCHER & MCGILLIVARY, 1979 *apud* LEEMING *et al.*, 1996), atuando como importantes ferramentas de diagnóstico e prognóstico para monitoramento de contaminantes de origem doméstica.

O coprostanol é o principal esterol encontrado em fezes humanas (24 a 89% dos esteróis totais, muito maior que nas fezes de outros animais) e tem demonstrado ser um possível indicador de poluição fecal em águas e sedimentos de rios, lagos e estuários (Isobe *et al.*, 2004).

A “impressão digital” dos esteróis em fezes de humanos e de outros animais é bem diferenciada, permitindo identificar se a poluição fecal é biogênica ou antropogênica (Leeming *et al.*, 1996). Assim, análise de esteróis e porcentagens de coprostanol podem ser utilizadas na identificação da fonte poluente (Peng *et al.*, 2002).

A meia vida do coprostanol em condições aeróbicas tem sido reportada como, no máximo, dez dias a 20°C e sua presença em um ambiente aeróbico pode ser considerada um indicador de poluição fecal recente (Isobe *et al.*, 2004).

Contudo, estudos de Barlett (1987) apontaram o longo tempo de residência do coprostanol em sedimentos anóxicos, fato que aliado a sua insolubilidade em água confirma também a contaminação contínua por esgoto (Bicego & Montone, 2008), caracterizando um estresse crônico.

Tais esteróis são degradados em semanas na coluna d’ água sob condições aeróbicas (Kirchmer, 1971), contudo sua degradação é muito limitada uma vez que incorporados ao sedimento (Barlett, 1987).

O coprostanol é uma molécula orgânica não iônica e não polar que indica fontes poluentes orgânicas, podendo ser utilizado para inferir informações de

processos geoquímicos e hidrológicos ao longo de um corpo de água. Este composto orgânico tem sido observado como traçador molecular de contaminação por esgotos domésticos, visto sua presença em material fecal humano e sua natureza refrataria em sedimentos anóxicos. A maior parte do coprostanol encontrado está associada com material particulado, justificando sua rápida adsorção nos sedimentos mais finos de ambientes aquáticos (Writer *et al.*, 1995).

Por isso, “coprostanol tem sido usado para definir a área afetada por esgoto, e sua concentração decresce com a distância da fonte” (VENKATESAN & KAPLAN, 1990). Porém, sua distribuição pode ser afetada pelas condições hidráulicas, as quais podem ou não favorecer sua deposição no sedimento. Além disso, por ser relativamente estável, principalmente quando depositado em sedimento anóxico, são úteis na reconstrução do registro da poluição (Venkatesan & Kaplan, 1990).

Justamente por funcionar como registro, a geoquímica sedimentar pode ser utilizada como traçador de alterações ambientais induzidas por fatores naturais ou antropogênicos (Garcia *et al.*, 2004).

4. METODOLOGIA

4.1. ÁREA DE ESTUDO

A Baía de Vitória está localizada na região costeira centro-sul do Estado do Espírito Santo, no município de Vitória, nas coordenadas geográficas de 20°13' e 20°22' latitude sul e 40°16' e 40°23' longitude oeste.

Deságuam nesta baía cinco rios: Santa Maria da Vitória, Bubú, Itanguá, Aribiri e Marinho (Nunes, 2005), sendo que o primeiro acima mencionado é o principal tributário da rede hidrográfica da baía (Rigo, 2004).

O sistema estuarino da Baía de Vitória tem sofrido há décadas uma intensa degradação ambiental, por ocupação populacional de seu entorno, aterros, atividades industriais e portuárias e, principalmente, devido ao lançamento de esgotos, quase sempre (cerca de 70%) *in natura* (Jesus *et al.*, 2004). Além disso, ao longo do histórico de ocupação do entorno da Ilha de Vitória ocorreu uma significativa conversão de estuários e manguezais para fins de urbanização da cidade. Nunes (2004) estimou para o período de 1815 a 2002 a perda de 4,4 km² de estuário e 13,9 km² de manguezal.

Além do município de Vitória, a baía em questão é influenciada por outros três municípios, Vila Velha, Cariacica e Serra (Jesus *et al.*, 2004).

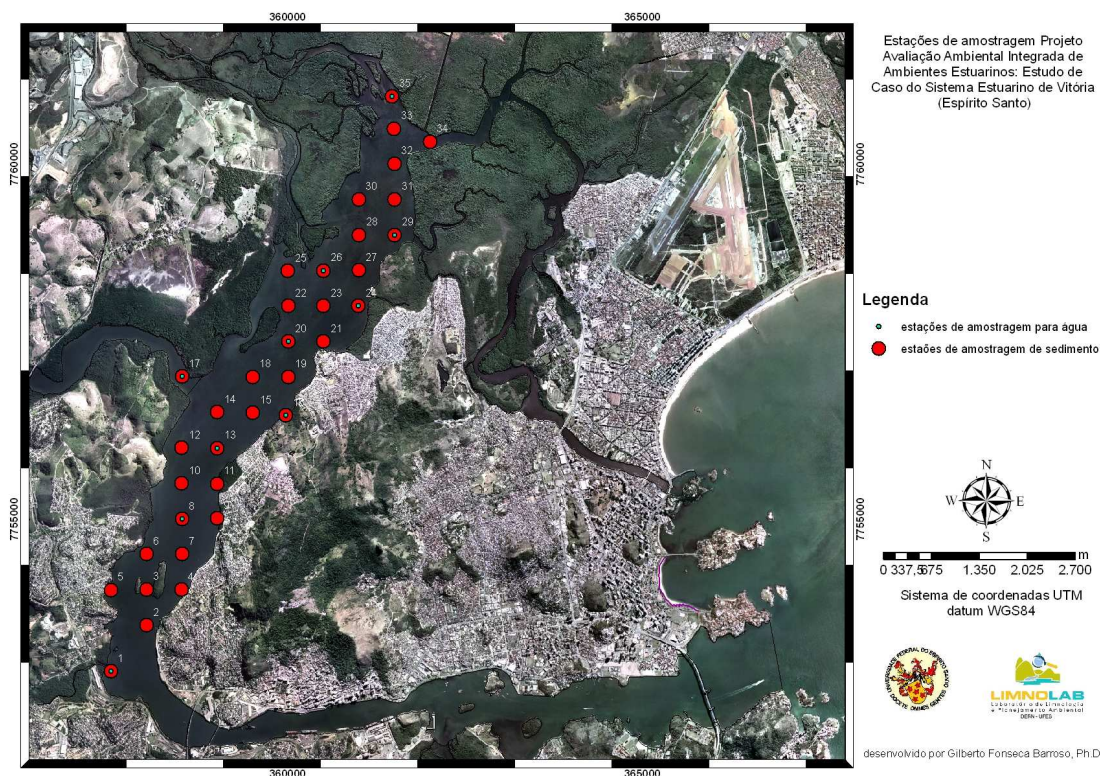


Figura 3: Sistema Estuarino da Grande Vitória (SEGV) e localização dos pontos amostrais.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Amostragem de campo

Por meio do programa ArcGis 9.2 ESRI, foram definidas, a partir de uma grade amostral com equidistância de 500 metros, trinta e cinco estações amostrais ao longo da porção noroeste da Baía de Vitória. Dentre estas estações foram escolhidas, aleatoriamente, oito para a realização de análise laboratorial. As estações escolhidos foram 16, 17, 21, 22, 25, 29, 33 e 35.

As amostras sedimentares foram coletadas em superfície com draga de Ekman e acondicionadas em frasco de vidro previamente identificado, transportadas sob refrigeração e posteriormente armazenadas em freezer a -18°C . A referida coleta ocorreu no dia 16 de setembro de 2009, com 0,0 mm de chuva acumulada nas 24 horas anteriores (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2009). A variação de maré na data da coleta foi de -0,1 m às 07:28, 1,4 m às 13:58 e 0,2 m às 19:49, ou seja, amplitude de 1,5 m (DIRETORIA DE HIDROGRAFIA E NAVEGAÇÃO, 2009).

Cada amostra foi liofilizada (secagem a frio em aparelho liofilizador por um período de 72h à cerca de -35°C), para eliminação do teor de água. Em seguida, as amostras foram novamente congeladas até a realização do procedimento de extração.

4.2.2. Limpeza de vidraria

A vidraria utilizada no procedimento laboratorial foi lavada em detergente neutro e água destilada sendo, em seguida, calcinada durante duas horas em mufla a 500°C .

4.2.3. Extração de lipídios (Cathum & Sabik, 2001)

Inicialmente foram pesados aproximadamente 2g (peso seco) de cada amostra a ser analisada, colocando-as em tubo de ensaio devidamente identificado. A cada tubo de ensaio foram adicionados cerca de 10 ml de solução de diclorometano (DCM):metanol na proporção de 9:1 volume/volume.

Foi realizado banho de ultra-som por 15 minutos, seguido de centrifugação com rotação de 3000 RPM também por 15 minutos. Com isso a fase líquida foi separada da sólida e aquela (denominada sobrenadante) foi retirada com o emprego de pipeta de Pasteur, sendo transferida para um balão de fundo chato. Este ciclo foi realizado três vezes para cada amostra, combinando os extratos. Os balões contendo as amostras foram submetidos a um Evaporador Rotativo, com a finalidade de evaporar o solvente, restando apenas o extrato. Os extratos restantes foram transferidos para *vials*, novamente com pipeta de Pasteur, e secados por completo em fluxo de nitrogênio (N_2) gasoso.

4.2.4. Saponificação

Em seguida foi realizado processo de saponificação, visando a obter separadamente a fração ácida e a fração neutra de cada amostra, uma vez que apenas os compostos lipídicos neutros seriam utilizados.

Para a realização deste procedimento, primeiramente foram adicionados 100 mL de água destilada e 10 mL de DCM a um funil de separação, agitando-se o funil e abrindo-se a válvula para aliviar a pressão interna. Em seguida o funil foi deixado em repouso até que todo o DCM decantasse, para que este fosse descartado; repetiu-se este processo de adição e descarte do solvente por mais duas vezes. Deste modo os interferentes orgânicos presentes na água foram eliminados. Para a extração dos compostos neutros, adicionou-se 5,6g de Hidróxido de Potássio (KOH) à água e, posteriormente, o extrato combinado a 10 mL de DCM, deixando o funil em posição de repouso para que o DCM decantasse e a fração neutra fosse recolhida em balão de fundo chato. Tal processo também foi triplamente realizado.

Novamente as amostras foram evaporadas em um Evaporador Rotativo e o produto resultante transferido para vials que foram submetidos a fluxo de nitrogênio gasoso puro (N₂).

4.2.5. Cromatografia em coluna de sílica

Com a finalidade de separar os hidrocarbonetos da fração neutra, foi realizado o fracionamento da amostra. Esse procedimento tem como fundamento a cromatografia em coluna, processo que separa os diferentes compostos orgânicos baseados em sua diferença de polaridade (Degani *et al.*, 1998).

Para a preparação da coluna foram pesados 7,1 g de sílica gel previamente calcinada, a qual foi colocada em uma coluna de separação juntamente com 20 ml de Hexano. Para cada amostra foram obtidas cinco frações, sendo a primeira de hidrocarbonetos, obtida com a adição de 30 ml de hexano; a segunda de hidrocarbonetos aromáticos, obtida com 20 ml solução de hexano:tolueno (15:5 v/v); a terceira de ésteres, obtida com 20 ml de solução de hexano:acetato de etila (19:1 v/v); a quarta de esteróis, alcoóis e acetonas,

obtida com 30 ml de solução de hexano:acetato de etila (24:6 v/v); e a quinta de compostos apolares, obtida com a adição de 30 ml de metanol.

Para o presente trabalho a fração utilizada foi a quarta, uma vez que o composto de interesse é um esterol.

4.2.6. Preparação prévia à injeção em Cromatógrafo Gasoso de Espectrometria de Massa (GCMS)

As frações quatro passaram por processo de silanização, o qual consiste em uma reação de derivatização convertendo os esteróis a ésteres trimetil-silicosos em função da substituição do hidrogênio da hidroxila (-OH) pelo grupo trimetil-silício (-Si(CH₃)₃), aumentando sua volatilidade (Degani *et al.*, 1998). Foram adicionados 50 µL do agente silanizante bistrimetilsilil-trifluoracetamida (BSTFA) a cada alíquota que foi, em seguida, acondicionada em estufa à 60°C, durante 40 min. Seqüencialmente os solventes foram novamente evaporados sob fluxo gasoso de N₂.

Em seguida foi adicionado padrão interno colestano 101 µg/ml em cada uma das amostras, na medida de 150 µL.

Vale mencionar que todos os procedimentos laboratoriais acima descritos foram realizados no Laboratório de Geoquímica Ambiental do Departamento de Ecologia e Oceanografia da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.2.7. Injeção em Cromatógrafo Gasoso de Espectrometria de Massa (GC-MS)

Por fim, os extratos resultantes foram submetidos à técnica da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS), para análise dos

compostos, com injetor a 290°C e interface a 300°C. Esta técnica é utilizada quando se deseja separar uma mistura em seus constituintes devido à passagem de uma fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário. Cabe ressaltar que a Cromatografia Gasosa tem por finalidade separar os compostos por polaridade e ponto de ebulição (Degani *et al.*, 1998). O Espectrômetro de Massa ajuda na identificação e quantificação destes compostos. Os resultados foram expressos em ng/g de sedimento seco.

Este procedimento foi realizado no LabPetro, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.2.8. Identificação e Quantificação do Composto

Para adquirir e processar os dados foi usado o Software LabSolutions. A identificação do coprostanol ocorreu com a interpretação da massa espectral, comparação do espectro de massa e do tempo de retenção com aqueles do padrão autêntico quando disponíveis.

Para a quantificação do composto ($Q_{g/g}$), foram utilizadas a concentração do padrão interno (Q_p), que foi adicionado nas amostras, as áreas das massas espectrais do padrão interno (A_p) e do composto (A_c) a ser determinado, sendo:

$$Q_{g/g} = \frac{(Q_p \times A_c)}{A_p}$$

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos para a massa de coprostanol presente em cada amostra estão expostos na Tabela 1, na proporção massa de composto por grama de amostra. A sigla ND indica quantidades não detectáveis ao limite instrumental.

Tabela 1: Estações amostrais e respectivas massas de coprostanol.

Estação amostral	Massa do composto (ng/g)
16	16,48
17	ND
21	41,32
22	ND
25	ND
29	24,81
33	10,96
35	ND

As amostras referentes às estações 17, 22, 25 e 35 apresentaram respostas analíticas abaixo do limite de detecção metodológico e/ ou instrumental. Deste modo, não foi possível quantificar a massa do composto presente nestes pontos amostrais.



Figura 4: Amostra 29 com aproximação no tempo de retenção do coprostanol, aproximadamente 38,75 minutos.

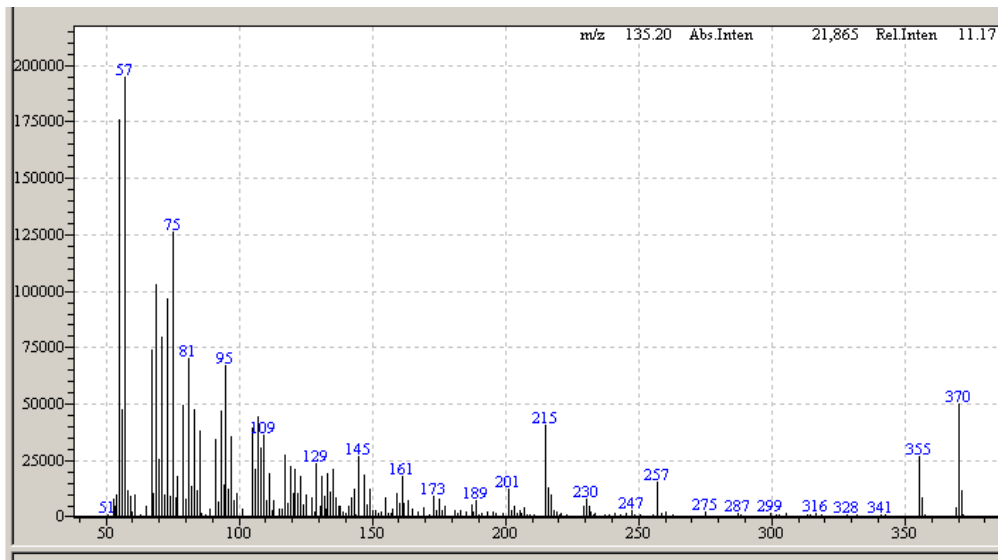


Figura 5: Espectro de massa do coprostanol.

6. DISCUSSÃO

As amostras 16, 21 e 29 apresentaram, respectivamente, resultados de 16,48; 41,32 e 24,81 ng/g. Estas três amostras correspondem a estações da malha amostral localizadas próximo à margem continental do município de Vitória. Apesar de baixos, os valores demonstram contribuição orgânica antrópica, a qual possivelmente resulta do escoamento de águas pluviais ou do lançamento direto dos bairros adjacentes para a região estuarina da Baía de Vitória. Vale ressaltar que o município em questão é bastante urbanizado e apresenta densidade demográfica de aproximadamente 3.363 habitantes por km² e taxa de urbanização de aproximadamente 100,0 (INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES, 2009).

A estação 16 está situada na região de São Pedro - Vitória, enquanto a 21, que apresenta maior concentração de coprostanol, está localizada próximo à Ilha das Caieiras, onde há uma elevada densidade populacional sem a devida infraestrutura de saneamento ambiental

Já a estação 17 apresentou em seu sedimento respostas analíticas abaixo do limite de detecção instrumental e/ ou metodológico para coprostanol. Esta baixa quantidade pode ser justificada pelo fato de a estação amostral em questão estar localizada em frente à desembocadura do rio Marinho, o que pode acarretar maior energia hidrodinâmica, em especial em períodos de maior intensidade pluviométrica, visto a maior velocidade de fluxo hídrico, gerando turbulência e dificultando a sedimentação dos compostos no local.

A estação amostral 22 também apresentou respostas analíticas abaixo do limite de detecção instrumental e/ou metodológico. Isto pode ser motivado pela considerável distância das margens, reduzindo a influência continental no sedimento. Por estar mais interiorizada no canal, o fator diluição pode determinar uma menor concentração de poluentes nesta estação.

Outra estação amostral com resposta analítica não passível de detecção foi a 25, que também não está próximo à margem e se situa mais perto do município de Cariacica, cujos índices de urbanização e ocupação são menores (1.273 habitantes/ km² e taxa de urbanização de aproximadamente 96,5) (INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES, 2009), do que os do município de Vitória. Com isso, a contribuição orgânica antrópica tende a ser menor.

Em relação à estação 35, que também apresentou valores não detectáveis ao limite instrumental e/ ou metodológico, uma possível motivação é sua localização em um ambiente mais natural, junto a um manguezal mais intacto. Apesar da proximidade a um pequeno córrego, o qual poderia drenar poluentes urbanos para o ambiente de estudo, tais poluentes poderiam ficar retidos no percurso, não atingindo a localidade da estação e, com isso, impactando minimamente o sedimento. Outra possibilidade seria a energia hidrodinâmica local, com velocidades maiores devido à descarga fluvial, principalmente em períodos chuvosos, dificultando a sedimentação dos poluentes.

Segundo Cathum & Sabik (2001), o limite de detecção do método é dependente do tamanho da amostra, do volume lipídico extraído, do limite de detecção instrumental e do nível de confiança. Portanto, é possível que uma análise realizada com maior quantidade de amostra (mais representativa) gere valores detectáveis.

Por fim a estação 33, que está localizada um pouco a frente da estação 35 e apresentou 10,96 ng/g de coprostanol em seu sedimento. Isto pode ser explicado pela redução da velocidade do fluxo após a desembocadura do córrego, permitindo que os poluentes passem na coluna d' água na estação 35, como uma zona de "by pass", e sedimentem na estação 33, ficando armazenados no sedimento. Além disso, esta estação recebe influência do rio Santa Maria. Jesus e colaboradores (2004) verificaram concentrações elevadas de metais pesados encontradas nesta região, provavelmente de aporte de esgoto. Isto é bem provável, já que os indicadores químicos feco-esteróis indicaram considerável aporte de esgoto nesta estação. Os feco-esteróis,

contudo, apresentam tempo de residência muito menor que os metais pesados, pois os metais são conservativos enquanto os esteróis são passíveis de biodegradação. Sugere-se, portanto, que o aporte de esgoto no local é de material antigo, trazido através do rio Santa Maria.

Neto e colaboradores (2006) encontraram elevadas concentrações de coprostanol na Baía de Vitória, com razão $[\beta/(\alpha + \beta)]$ geralmente superior a 0,7, o que indica forte presença de contaminação por esgotos domésticos.

Peng e outros (2002) encontraram valores médios de coprostanol de 629 ng/g, com máximo de 919 ng/g em sedimentos ao redor da Ilha de Macau - China, valores bem acima do encontrado até mesmo na estação amostral com maior concentração no presente estudo, o ponto 21 (41,32 ng/g). Entretanto, Peng e colaboradores também encontraram concentrações de coprostanol abaixo de 20 ng/g, em uma área marinha mais afastada da costa e em um ponto do rio Maliuzhou a montante da área altamente urbanizada, ou seja, áreas pouco influenciadas pela ocupação humana.

A região da Baía de Vitória é, notoriamente, muito antropizada. Logo, o fato de as concentrações encontradas de coprostanol serem compatíveis com concentrações reportadas de locais pouco impactados e bem abaixo de locais similares se deve, possivelmente, a fatores físicos, químicos, sedimentológicos, bioquímicos e analíticos.

Dumbabin & Bowmer (1992) relataram que o mecanismo de retenção de poluentes em sedimentos envolve absorção de íons, combinação com matéria orgânica, incorporação em estruturas de fácil decantação e precipitação em compostos insolúveis. Alguma peculiaridade local em relação a um ou mais destes fatores pode, portanto, ser responsável pela baixa concentração de coprostanol no sedimento da porção norte da Baía de Vitória.

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos indicam que a porção norte da Baía de Vitória é organicamente pouco influenciada por material antrópico. Esta constatação vai de encontro à expectativa inicial, pois o que se esperava era constatar um ambiente consideravelmente impactado por descargas de esgoto urbano. Este impacto foi, inclusive, constatado por Neto e colaboradores (2006), que reportaram significativos focos de esgoto doméstico na mesma área de estudo, considerando-a em processo de eutrofização.

Logo, mais amostras devem ser analisadas para ratificação ou retificação, uma vez que apenas oito de trinta e cinco amostras foram inspecionadas.

Além disso, os valores encontrados seriam, possivelmente, diferentes caso fosse realizada amostragem com maior quantidade de sedimento para cada ponto, aumentando, conseqüentemente, o volume lipídico extraído. Outro fator que pode influenciar os dados é o fator sazonalidade, uma vez que a amostragem de campo ocorreu em um único período do ano, em meados do mês de outubro, o qual apresentou reduzida pluviosidade. Não se deve descartar a possibilidade de a Baía estar passando por uma fase erosiva, o que removeria a camada sedimentar mais recente (superficial), expondo uma camada mais antiga, que pode conter um registro geoquímico de algumas décadas anteriores, quando a descarga de poluentes orgânicos de origem antrópica era menor, tendo em vista menores taxas de ocupação humana no entorno do local estudado.

O procedimento metodológico utilizado nas análises esteve em conformidade com o relatado pela bibliografia pertinente, contudo o ideal seria repetir o experimento a fim de melhorar o sinal analítico.

Estudos complementares, referentes à hidrodinâmica, à granulometria e à sedimentação local, poderiam também contribuir para um melhor esclarecimento dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

BAKER, D. E.; SENFT, J. P. Advances in agricultural nutrient runoff controls. **Water Science Technology**, v.26, n. 12, p. 2685-2694. 1992.

BARLETT, P. D. Degradation of coprostanol in an experimental system. **Marine Pollution Bulletin**, 18, p. 27-29. 1987.

BICEGO, M. C.; MONTONE, R. C. Contaminação por esgoto. In: BAPTISTA-NETO, J. A.; PATCHINEELAM, S. M.; WALLNER-KERSANACH, M. (orgs). In: **Poluição marinha**. Interciência. Rio de Janeiro, 2008.

BICEGO, M. C.; SEYFFERT, B. H.; MARTINS, C. de C.; FILLMANN, G. Poluição por petróleo. In: BAPTISTA-NETO, J. A.; PATCHINEELAM, S. M.; WALLNER-KERSANACH, M. (orgs). In: **Poluição marinha**. Interciência. Rio de Janeiro, 2008.

BURKE, L.; KURA, Y.; KASSEM, K.; REVENGA, C.; MCALLISTER, D; SPALDING, M. **Coastal ecosystems**: Pilot analysis of global ecosystems. Washington D.C. World Resources Institute. 2001.

CABELLI, V. J. DUFOUR, A. P.; MCCABE, L. J.; LEVIN, M. A. A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. **Journal WPCF**, v. 55, n. 10, p. 1306-1314. 1983.

CARREIRA, R.; FILEMAN, T. READMAN, J. W.; WAGENER, A.de L.R. Distribuição de coprostanol (5β (H)-coleston-3 β -ol) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: Indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 37-42. 2001.

CATHUM, S.; SABIK, H. Determination of steroids and coprostanol in surface water, effluent and mussel using gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, 53, p. 394-399. 2001.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia. **Química Nova na Escola**, n. 07, 1998.

DIRETORIA DE HIDROGRAFIA E NAVEGAÇÃO (DHN). Disponível em < <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/40250Set2009.htm> > Último acesso em 25 de novembro de 2009.

DUMBABIN, J.S. BOWMER, K. H. Potential use of constructed wetland for treatment of industrial wastewaters containing metals. **Science of Total Environment**, 111, p. 151-168. 1992.

GARCIA, D.; RAVENNE, C.; MARÉCHAL, B.; MOUTTE, J. Geochemical variability induced by entrainment sorting: quantified signals for provenance analysis. **Sedimentary Geology**, v. 171, p. 113-128. 2004.

INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES (IJSN). Disponível em < <http://www.ijsn.es.gov.br/> > Último acesso em 25 de novembro de 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/html/clima.php?lnk=/sim/mapas/mapas3.php> > Último acesso em 25 de novembro de 2009.

ISOBE, K. O.; TARAO, M.; CHIEM, N. H.; MINH, L. Y.; TAKADA, H.; Effect of environmental factors on the relationship between concentrations of coprostanol and fecal indicator bacteria in tropical (Mekong delta) and temperate (Tóquio) freshwaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 814-821. 2004.

JESUS, H. C. de; COSTA, E. de A.; MENDONÇA, A. S. F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 378-386. 2004.

KIRCHNER, C.J. **5 β (H)-colestano-3 β -ol**: An indicator of faecal pollution. Tese de doutorado. Universidade da Flórida, 1971.

KRONVANG, B.; SVENDSEN, L. M.; JENSEN, J. P.; DORGE, J. Scenario analysis of nutrient management at the river basin scale. **Hydrobiologia**, v. 410, n. 0, p. 207-212. 1999.

KRONVANG, B.; HOFFMANN, C. C.; SVENDSEN, L. M.; WINDOLF, J.; JENSEN, J. P.; DORGE, J. Retention of nutrients in river basins. **Aquatic Ecology**, v. 33, n. 1, p. 29-40. 1999.

LEBLANC, L. A.; LATIMER, J. S.; ELLIS, J. T.; QUINN, J. G. The Geochemistry of Coprostanol in Waters and Surface Sediments from Narragansett Bay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, n. 5, p. 439-458. 1992.

LEEMING, R.; BALL, A.; ASHBOLT, N.; NICHOLS, P. Distinguishing between human and animal sources of faecal pollution. **Chemistry in Australia**, 61, p. 434-435. 1994.

LEEMING, R.; BALL, A.; ASHBOLT, N.; NICHOLS, P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2893-2900, 1996.

LEMOS, M. C.; OLIVEIRA, J. L. F. de. Can water reform survive politics? Institutional change and river basin management in Ceará, northeast Brazil. **World Development**, v. 32, n. 12, p.2121-2137. 2004.

LUIZ-SILVA, W.; MATOS, R. H. R.; KRISTOSCH, G. C.; MACHADO, W. Variabilidade espacial e sazonal da concentração de elementos-traço em

sedimentos do sistema estuarino de Santos-Cubatão (SP). **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 256-263. 2006.

MCCALLEY, D. V.; COOKE, M.; NICKLESS, G.; Coprostanol in severn estuary sediments. **Bulletin Environment Contaminant Toxicology**, 25, p. 374-381. 1980.

NETO, R. R.; BARROSO, G. F.; OLIVEIRA, T. P. de; SANTOS, C. C. dos; GRILO, C.F.; BOINA, C. D. **Utilização de biomarcadores lipídicos na avaliação da poluição ambiental na Baía de Vitória e Canal da Passagem**. Relatório Técnico. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2006.

NUNES, A. L. **Modelo histórico das alterações fisiográficas recentes da Baía de Vitoria (ES) e áreas adjacentes, com o uso de sistema de informações geográficas**. Monografia (graduação em oceanografia), Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ecologia e Recursos Naturais. Vitoria, 2004.

PENG, X.; ZHANG, G.; MAI, B.; MIN, Y.; WANG, Z.; Spatial and temporal trend of sewage pollution indicated by coprostanol in Macao estuary, southern China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 295-299. 2002.

RIGO, D. **Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES**. Tese (doutorado em ciências em engenharia oceânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia. , Rio de Janeiro, 2004.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A. N.; SARKER, S. Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340. 2006.

WRITER, J. H.; LEENHEER, J. A.; BARBER, L. B.; AMY, G. L ; CHAPRA, S. C. Sewage contamination in the upper Mississippi river as measured by the fecal sterol, coprostanol. **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1427-1436. 1995.

VENKATESAN, M. I.; KAPLAN, I. R. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica basin, southern California. **Environmental Science & Technology**, 24, p. 208-214. 1990.