



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOLOGIA**

**ROBSON CARNEIRO SANTANA**

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO  
UTILIZANDO NPK E OSMOCOTE, ESTUÁRIO DO RIO SÃO  
PAULO, BAHIA, BRASIL**

Salvador  
2011

**ROBSON CARNEIRO SANTANA**

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO  
UTILIZANDO NPK E OSMOCOTE, ESTUÁRIO DO RIO  
SÃO PAULO, BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. MANOEL JERÔNIMO MOREIRA  
CRUZ  
Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. OLÍVIA MARIA CORDEIRO  
DE OLIVEIRA e JORGE ALBERTO TRIGUIS

Salvador  
2011

---

S232 Santana, Robson Carneiro.  
Avaliação de processos de biorremediação utilizando NPK e Osmocote, estuário do Rio São Paulo, Bahia, Brasil / Robson Carneiro Santana. - Salvador, 2011.

122f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jerônimo Moreira Cruz.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2011.

1. Biorremediação – Todos os Santos, Baía de (BA). 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Petróleo. 4. Geoquímica ambiental. I. Cruz, Manoel Jerônimo Moreira. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Geociências. III. Título.

CDU: 550.4:504 (813.8)

---

Elaborada pela Biblioteca do Instituto de Geociências da UFBA.

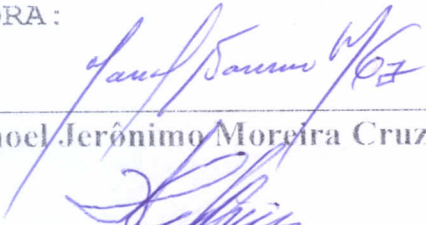
**Robson Carneiro Santana**  
Bacharelado Oceanografia (Universidade Federal da Bahia - 2008)

**"Avaliação dos processos de biorremediação utilizando  
NPK e osmocote, estuário do Rio São Paulo, Bahia,  
Brasil"**

Dissertação aprovada como  
requisito parcial para  
obtenção do grau de  
Mestre na Pós-Graduação  
em Geologia da  
Universidade Federal da  
Bahia

APROVADA EM: 16/06/2011

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Manoel Jerônimo Moreira Cruz – Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Alberto Triguís – SP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Donceivan Fernandes Ferreira - IGEO/UFBA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Olivia Maria Cordeiro de Oliveira – Co-Orientadora

**Dedico esta Dissertação à todos os membros da Família “Carneiro e Santana” pelo apoio desde a infância e por todo amor a mim ofertado. Ao Prof. Jorge Alberto Trigüis, por ter influenciado uma gama de pesquisadores, que juntos têm ampliados os horizontes da Geoquímica Ambiental no Brasil. À Danúsia, colega de longas datas, que cativa com sua competência e dedicação. A minha noiva Surya Ananda pela convivência, estímulo e compreensão.**

## **AGRADECIMENTOS**

São tantos....

A minha família que contribui direta e indiretamente pela formação cidadã e apoio durante toda jornada.

A Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira pela co-orientação, dedicação e confiança.

Ao Dr. Jorge Alberto Trigüis pela colaboração desde a monografia até o mestrado, aos conselhos e por ter aceitado o convite para participar da Banca Examinadora. Profundo conhecedor da Geoquímica Orgânica;

Ao Dr. Doneivan Ferreira por ter aceitado o convite para participar da Banca Examinadora e pelo conhecimento na área Econômica do Petróleo;

Ao Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz pelo apoio recebido desde as primeiras etapas desta jornada.

Ao Dr. Manuel Jerônimo pela orientação acadêmica e por aceitar os desafios impostos pela Geoquímica Ambiental.

A Dra. Eliane Souza (LENEP) pela colaboração e análises dos Biomarcadores;

A toda equipe do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA) e Laboratório de Estudo do Petróleo (LEPETRO) em especial Sarah, Karina, Irenilda, Jorge, Danúsia, Anderson, Carla, Paula, Alex, Juliana, Anselmo, Stefano, Joel, Everton, Davi, Danilo, Icaro, Serginho, Paulo, Carine, Narayana, Cícero, Izabel e Marcos pela convivência e colaboração em todas as etapas deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores da Pós-Graduação em Geologia da UFBA pela contribuição na minha vida acadêmica.

Aos colegas de curso pela agradável convivência ao longo desses anos, em especial Tacilo, Rodrigo, Elder, Jose Luis (Pepi), Martonio, Amanda, Agnaldo (Rambo), Carol e Eder. Que carrega o nome desta Instituição e mantém de fato, a grande produtividade de trabalhos acadêmicos deste mestrado e doutorado.

A Surya Ananda pela paciência, estímulo e compreensão nas horas difíceis.

A Cláudia Yolanda que foi o grande pilar de sustentação desta dissertação, que contribuiu imponderavelmente para a conclusão da mesma.

Ao motorista Jairo e ao polivalente Carlos Antonio (Bossal) que contribuíram em muitas fases do Projeto.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, em especial, aos colegas de Rondônia (Anderson, Reginaldo, Rafael e Érica), pela causa defendida - Proteção a Maior Floresta Tropical do Planeta. Força a todos nós do IBAMA.

Ao CNPq, CTPETRO, Finep, Petrobras e CAPES por acreditarem no Projeto.

Devagar começo essa viagem  
Rumo à Baía de Todos os Santos  
O meu nascedouro ainda límpido  
Pré-sinto o progresso chegando

Na serra sinto alegria  
Vejo flores desabrochando  
Ouço cantos de pássaros  
Bem-te-vi, sabiás e curiangos

Gravidade me guia  
Estrelas me iluminam  
Bálsamos me entorpecem

No médio curso sinto a fubeca  
Começo a repressão  
Busco a fuga e apresso

Continuo o meu caminho  
Sinto as ranhuras  
Verdadeira ingratidão  
As matas desaparecem  
Vejo fogo e solidão

A humanidade me castiga  
Sem outra alternativa  
Sinto cansaço e depressão

Continuo o meu destino  
Cumprindo a profecia  
De um dia beijar o mar

Sentindo a alegria  
De um dia retornar  
À Chapada Diamantina  
E lindas serras percolar

Encontrar livre o caminho pro mar  
Convidando a sua gente  
Nas minhas águas banhar.

***Devaneio do Paraguaçu***  
Robson Carneiro Santana

## RESUMO

O pioneirismo da exploração de petróleo vivido pela Baía de Todos os Santos (BTS) deixou um grande passivo ambiental, sentido pelos ecossistemas locais sob a forma de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Atualmente diversas técnicas lidam com essa problemática, dentre as quais, a biorremediação que é uma técnica aplicada para amenizar diversos impactos ambientais, dentre eles os gerados por derivados do petróleo, através da introdução de microorganismos no ambiente, ou criando condições ótimas para os mesmos se desenvolverem. O presente estudo objetivou avaliar a degradação de biomarcadores saturados e aromáticos através da técnica do bioestímulo em sedimento de manguezal impactado por atividades petrolíferas, testando a potencialidade de dois fertilizantes (NPK e OSMOCOTE) como agentes aceleradores da biodegradação dos componentes de petróleo, sob condições experimentais. A metodologia utilizada e testada no experimento baseou-se no monitoramento do processo de biorremediação em aquários com água do rio São Paulo e sedimento contaminado por óleo, realizado durante 90 dias de simulação, ocorrido entre os meses de setembro e dezembro de 2008. Para o controle da simulação os parâmetros físico-químicos foram monitorados ao longo dos 90 dias da simulação, os teores de nitrogênio e fósforo foram monitorados mediante coletas de sedimento extraídos das provetas dos aquários de simulação e analisados no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO). O óleo presente no sedimento foi extraído em *soxhlet* e posteriormente analisado por cromatografia líquida e gasosa. O resultado dos parâmetros físico-químicos mostrou condições favoráveis para o processo de biorremediação durante todas as fases de investigação e os nutrientes mantiveram dentro de limites adequados ao desenvolvimento dos microorganismos. Os biomarcadores saturados apresentaram indícios mais proeminentes de degradação ao longo da simulação, principalmente para os terpanos ( $m/z=191$ ) e os esteranos ( $m/z=217$ ). Os fragmentogramas ( $m/z=170$ ), ( $m/z=192$ ), ( $m/z=228$ ) e ( $m/z=231$ ) analisados para o sedimento coletado no final da simulação apresentaram maiores abundância relativa dos picos, isso pode fornecer algumas conclusões, tais como, a possibilidade de degradação de compostos mais complexos que possam gerar frações de intermediária complexidade. Pelos resultados apresentados ao longo do experimento o nutriente NPK foi mais eficiente principalmente para as frações dos saturados. Sendo o nutriente OSMOCOTE recomendado para processos de biorremediação de compostos de alta complexidade (HPA de alto peso molecular e composto NSO), pois o tempo de resposta desse nutriente é mais lento, porém, é capaz de fornecer nutrientes por muitos meses. Como recomendação para futuros experimentos na região norte da BTS seria importante que fossem contemplados também as frações dos compostos NSO, pois a complexidade dessas substâncias tem que ser avaliada em qualquer processo de biorremediação.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Bioestimulação, Biomarcadores, HPA, BTS.



## ABSTRACT

The pioneer in oil exploration in Todos os Santos Bay (BTS) left a huge environmental liability, still sense by local ecosystems as (in the form of) contamination by petroleum hydrocarbons. Currently several techniques deal with this problem among which the bioremediation is a technology used to mitigate several environmental impacts, including those generated by petroleum, through the introduction of microorganisms in the environment or creating optimum conditions for them to develop. This study aimed to evaluate the degradation of saturated and aromatic biomarkers (PAH) by the technique of biostimulation in mangrove sediments impacted by oil activities, testing the potential of two fertilizers (NPK and OSMOCOTE) as agents to accelerate the biodegradation of oil, under experimental conditions. The methodology used and tested in the experiment was based on monitoring the process of bioremediation in aquariums with São Paulo river water and sediment contaminated by oil carried out during 90 days of simulation which occurred between September and December 2008. To control the simulation physical-chemical parameters were monitored over the 90 days of simulation and the nitrogen and phosphorus content were monitored by collection of sediment from the aquarium simulation and then analyzed in the Laboratory (LEPETRO). The oil present in the sediment was extracted with soxhlet and subsequently analyzed by liquid chromatography and gas. The result of the physicochemical parameters showed favorable conditions for the bioremediation process during all phases of research and nutrients remained within suitable limits for the development of microorganisms. The biomarkers saturated showed most prominent signs of degradation during the simulation, mainly for terpanes ( $m/z = 191$ ) and steranes ( $m/z = 217$ ). The fragmentograms ( $m/z = 170$ ), ( $m/z = 192$ ), ( $m/z = 228$ ) and ( $m/z = 231$ ) analyzed of the sediment collected at the end of the simulation showed higher peaks of relative abundance, that can provide some conclusions, such as the possibility of degradation of complex compounds can generate some fractions of intermediate complexity. For the results presented during the experiment the nutrient NPK was more efficient especially for the saturated fractions. The OSMOCOTE was the nutrient recommended for bioremediation processes of highly complex compounds (PAHs of high molecular weight and NSO compounds) because the response time of this nutrient is slower however is able to provide nutrients for many months. As a recommendation for future experiments in the northern region of the SBT would be important were covered the fractions of NSO compounds, because the complexity of these substances have to be evaluated in any process of bioremediation.

**Key-Words:** Bioremediation, Biostimulation, Biomarkers, PAH, TSB

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Os mais importantes tipos de resíduos onde se aplica a técnica de biorremediação..	19
<b>Figura 2</b> - a) Antiga base de poço onde foi construído o Laboratório de Simulação, (b) vista frontal, (c) vista lateral evidenciando o Laboratório, construído e cercado e (d) vista interna evidenciando as bancadas.	20
<b>Figura 3</b> - Aquário com tubos de ensaio sustentados em barras de madeira (a) vista em planta, (b) vista em perfil.	21
<b>Figura 4</b> - Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) Fotografia aérea da área e em destaque c) Local de coleta.	22
<b>Figura 5</b> - Intensidade e direção das correntes na superfície ( $\text{cm.s}^{-1}$ ) durante os estágios de maré baixa-mar, enchente, preamar e vazante. Estuário do rio São Paulo-BA.	24
<b>Figura 6</b> – Cartas Sensibilidade Ambiental – SAO para a região Norte da Baía de Todos os Santos, Bahia.	25
<b>Figura 7</b> – Efeitos progressivos do nível de biorremediação sobre a composição dos óleos em função da intensidade da alteração em uma escala de 1 a 10.	28
<b>Figura 8</b> - Processos de intemperismo que ocorre com o óleo derramado no mar..	30
<b>Figura 9</b> – Fotografia aérea da foz do rio São Paulo localizado no município de São Francisco do Conde-BA desaguando na BTS, mostrando em destaque a localização do pier, da estação Pedra Branca e área das coletas.	47
<b>Figura 10</b> – a) Testemunhador de metal, b) Testemunhador com sedimento contendo óleo, c) Homogeneização do sedimento e d) Detalhe do sedimento com OSMOCOTE.	48
<b>Figura 11</b> - Figura esquemática mostrando da esquerda para a direita: as dimensões do aquário, da proveta e do suporte de madeira para as provetas.	49
<b>Figura 12</b> – a) Provetas de vidros revestidas com pano de algodão e com lacre e elástico, b) mensuração dos parâmetros físico-químicos.	50
<b>Figura 13</b> – Organograma mostrando passo a passo do monitoramento que era feito diariamente no Laboratório de Simulação.	50
<b>Figura 14</b> - Equipamentos utilizados para mensurar os parâmetros físico-químicos. Da esquerda para a direita: refratômetro, condutímetro, pH-metro e oxímetro.	52
<b>Figura 15</b> - Sistema <i>Soxhlet</i> utilizado na extração dos hidrocarbonetos contidos nos sedimentos retirados dos aquários de simulação.	55
<b>Figura 16</b> – Variação da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação (REF, NPK, OSM). Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.	58
<b>Figura 17</b> – Variação do pH no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.	60
<b>Figura 18</b> – Variação da salinidade no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.	62
<b>Figura 19</b> – Variação do oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.	63

<b>Figura 20</b> – Variação do fósforo ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico. ....	<b>65</b>
<b>Figura 21</b> – Gráfico da variação do nitrato ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{Kg}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico. ....	<b>66</b>
<b>Figura 22</b> – Variação da amônia ( $\text{mg.N-NH}_4^+ \text{kg}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico. ....	<b>67</b>
<b>Figura 23</b> - Características geoquímicas do petróleo produzido na Bacia do Recôncavo para os fragmentogramas $m/z=192$ (parte superior) e $m/z=217$ (parte inferior). Fonte:VEIGA, 2003. ....	<b>69</b>
<b>Figura 24</b> – Diagrama Ternário da amostras de simulação para os tempos inicial (T1) e final (T2) e para amostra do manguezal ( <i>background</i> ), REF, NPK e OSM com as setas indicando a rota dentro do diagrama. ....	<b>70</b>
<b>Figura 25</b> - Estrutura representativa dos terpanos pentacíclicos(Hopano) e do Bacteriohopanotetrol. ....	<b>71</b>
<b>Figura 26</b> – Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário REF nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). ....	<b>73</b>
<b>Figura 27</b> - Fragmentograma projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos (hopano pico de maior abundância), para o Aquário REF nos tempos inicial (05/Set) e final (04/Dez). A seta indica o sentido da degradação. ....	<b>74</b>
<b>Figura 28</b> - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário NPK nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). ....	<b>75</b>
<b>Figura 29</b> - Fragmentograma projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos, para o Aquário NPK nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). A seta indica o sentido da degradação, perceptível pelas abundâncias relativas dos picos (altura). ....	<b>76</b>
<b>Figura 30</b> - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário OSM nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). ....	<b>77</b>
<b>Figura 31</b> - Fragmentogramas projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos, para o Aquário OSM nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). A seta indica o sentido da degradação. ....	<b>78</b>
<b>Figura 32</b> – Processos representativos da transformação de Tm em Ts durante o processo de maturação. ....	<b>79</b>
<b>Figura 33</b> - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR que provoca uma elevação na linha de base ( <i>hump</i> ). Esse <i>hump</i> é indicado de degradação que já é visível no primeiro dia do experimento para todos os aquário, principalmente o REF. ....	<b>81</b>
<b>Figura 34</b> - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do $m/z=217$ para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário REF mostrando um aumento de degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta), que pode ser visualizado pelas reduções relativas dos picos. ....	<b>82</b>

<b>Figura 35</b> - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR que provoca uma elevação na linha de base ( <i>hump</i> ).....	<b>83</b>
<b>Figura 36</b> - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do $m/z=217$ para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário NPK mostrando um aumento de degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta), que pode ser visualizado pelas reduções relativas dos picos. ....	<b>84</b>
<b>Figura 37</b> - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR.....	<b>84</b>
<b>Figura 38</b> - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do $m/z=217$ para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário NPK mostrando um pequeno aumento na degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta).....	<b>85</b>
<b>Figura 39</b> – Fragmentogramas do $m/z=170$ ao longo dos tempos inicial (05/09) e final (04/12) da simulação para os aquário REF (a, b), NPK (c,d) e OSM (e,f). ....	<b>87</b>
<b>Figura 40</b> – Valores dos Picos mais abundantes (proeminentes) do $m/z=170$ , $m/z=192$ , $m/z=228$ e $m/z=231$ , ao longo do tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) da simulação para os aquários REF, NPK e OSM. ....	<b>89</b>
<b>Figura 41</b> – Fragmentogramas do $m/z=231$ ao longo do tempo inicial e final da simulação para os aquários REF, NPK e OSM. ....	<b>91</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais derrames de óleo ocorridos nas últimas décadas.	<b>17</b>
<b>Tabela 2</b> - Valores da média, mediana e desvio padrão da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) ao longo dos 90 dias de simulação.	<b>59</b>
<b>Tabela 3</b> - Valores da média, mediana e desvio padrão do pH ao longo dos 90 dias de simulação.	<b>60</b>
<b>Tabela 4</b> - Valores da média, mediana e desvio padrão para a salinidade ao longo dos 90 dias de simulação	<b>61</b>
<b>Tabela 5</b> - Valores da média, mediana e desvio padrão para o oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ).	<b>63</b>
<b>Tabela 6</b> - Valores de média, mediana e desvio padrão para nitrato ( $\text{mg N-NO}_3\text{Kg}^{-1}$ ).	<b>66</b>
<b>Tabela 7</b> - Valores da média, mediana e desvio padrão para amônia ( $\text{mg N-NH}_4^+\text{ kg}^{-1}$ ).	<b>68</b>
<b>Tabela 8</b> – Valores do pico mais relevante dos tricíclicos (T) e do pico mais relevante dos pentacíclicos (hopano) (P), razão desses dois picos (T/P) e os valores do $T_s$ e $T_m$ para os Aquários REF, NPK e OSM para o tempo inicial e final da simulação.	<b>76</b>
<b>Tabela 9</b> – Valores relativos dos picos de todos os fragmentogramas avaliados ao longo dos 90 dias de simulação (tempo inicial e final) para os aquários REF, NPK e OSM e no final da tabela as fórmulas estruturais desses HPA	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMM – Alta Massa Molecular;

BMM – Baixa Massa Molecular;

BTS – Baía de Todos os Santos;

CENPES – Centro de Pesquisa da Petrobras;

GPS – Sistema de Posicionamento Global (*Global Positioning System*)

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos;

HTP – Hidrocarbonetos Totais de Petróleo;

IGEO – Instituto de Geociências;

LENEPE – Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo;

LEPETRO – Laboratório de Estudos do Petróleo;

MCNR – Mistura Complexa Não Resolvida;

RLAM – Refinaria Landulfo Alves Mataripe;

NEA – Núcleo de Estudos Ambientais;

NPK – Fertilizante a Base de Nitrogênio(N), Fósforo(P) e Potássio(K);

O.D. – Oxigênio Dissolvido;

OSMOCOTE – Fertilizante de Lenta Solubilidade com N, P e K;

OSM – Aquário contendo OSMOCOTE;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

REF – Aquário Simulando Atenuação Natural;

REPAR – Refinaria Presidente Getúlio Vargas;

TEMADRE – Terminal Marítimo Almirante Câmara;

TPP – Poliprenóides Tetracíclicos;

UCM – *Unresolved Complex Mixture*.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO DO TRABALHO</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	21
1.2 OBJETIVOS	25
1.2.1 <b>Objetivos gerais</b>	<b>25</b>
1.2.2 <b>Objetivos específicos</b>	<b>26</b>
<b>2 REVISÃO DO TEMA</b>	<b>27</b>
2.1 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO PETRÓLEO	27
2.2 PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO ASSOCIADOS A DERRAMES DE ÓLEO	29
2.2.1 <b>Processos Ambientais</b>	<b>29</b>
2.2.2 <b>Processos Microbiológicos</b>	<b>30</b>
2.2.3 <b>Processos Químicos</b>	<b>31</b>
2.3 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO APLICADAS A DERRAMES DE ÓLEO	32
2.3.1 <b>Quanto à ação de tratamento:</b>	<b>33</b>
2.4 APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO	39
2.4.1 <b>Internacionalmente</b>	<b>39</b>
2.4.2 <b>Nacionalmente</b>	<b>41</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
3.1 AMOSTRAGEM	46
3.2 MONTAGEM E FUNCIONAMENTO DO EXPERIMENTO	48
3.3 MONITORAMENTO DA UNIDADE DE SIMULAÇÃO	49
3.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	52
3.4.1 <b>Processamento das Amostras de Sedimentos</b>	<b>52</b>
3.4.2 <b>Nutrientes</b>	<b>53</b>
3.4.3 <b>Biomarcadores Saturados e Aromáticos (HPA)</b>	<b>54</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>57</b>

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NÃO-CONSERVATIVOS	57
4.1.1 Temperatura	57
4.1.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)	59
4.1.3 Salinidade	60
4.1.4 Oxigênio Dissolvido (O.D.)	62
4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INORGÂNICOS (NUTRIENTES)	64
4.2.1 Fósforo	64
4.2.2 Nitrato	65
4.2.3 Amônio	67
4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS GEOQUÍMICOS	68
4.3.1 Cromatografia Líquida	69
4.3.2 Análises do Biomarcadores Saturados m/z=191 e m/z=217	71
4.3.3 Análise dos Compostos Aromáticos (HPA)	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
6 RECOMENDAÇÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO I	107
ANEXO II	109
ANEXO III	111
ANEXO IV	122



## APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Para uma melhor compreensão, a presente dissertação foi dividida em 06 tópicos, sendo:

**Tópico 1** - apresenta-se uma introdução geral do tema em estudo, caracterização da área e objetivos;

**Tópico 2** - neste capítulo são apresentados revisão do tema referente ao processo de biodegradação, histórico da região de estudo, aplicação das técnicas de biorremediação num caráter internacional e nacional e, os principais centros de pesquisas e estudos com a temática de biorremediação;

**Tópico 3** – neste capítulo são descritas as metodologias adotadas incluindo os materiais utilizados, os equipamentos e as condições experimentais empregados na realização deste trabalho;

**Tópico 4** - são apresentados os resultados e a discussão dos parâmetros físico-químicos, nutrientes e biomarcadores saturados ( $m/z=191$  e  $m/z=217$ ), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ( $m/z=170$ ,  $m/z=192$ ,  $m/z=228$ ,  $m/z=228$  e  $m/z=231$ );

**Tópico 5** - as considerações finais;

**Tópico 6** – as recomendações para trabalhos futuros.

Por fim, apresentam-se as referências bibliográficas citadas ao longo da presente Dissertação e dados anexos como complementação dos assuntos abordados no corpo do texto.

## 1 INTRODUÇÃO

O advento do uso de derivados do petróleo na Era Industrial, a partir da última metade do século XIX, tem ocasionado potenciais derramamentos destes produtos no ambiente, com subsequente efeito para os ecossistemas e para a biota (TSENG, 1999). De acordo com a base de dados da “The International Tanker Owners Pollution Federation Limited” (ITOPF), estima-se que, de 1970 a 2002, cerca de 5.700.000 toneladas de óleo foram lançadas ao mar. A Tabela 1 mostra alguns acidentes que, além de causar impactos ecológicos, tornaram-se marcos mundial devido as suas proporções e danos causados ao meio ambiente.

Tabela 1 - Principais derrames de óleo ocorridos nas últimas décadas.(Fonte: modificado de ITOPF, 2002).

<b>Navio/outro</b>	<b>Ano</b>	<b>Localização</b>	<b>Óleo Derramado</b>
Torrey Canyon	1967	Reino Unido	85.000 ton
Wafra	1971	Africa Sul	40.000 ton
Metula	1974	Chile	50.000 ton
Jakob Mersk	1975	Portugal	88.000 ton
Urquiola	1976	Espanha	100.000 ton
Hawaiian Patriot	1977	Honolulu	95.000 ton
Amoco Cadiz	1978	França	223.000 ton
Atlantic Express	1979	Índias	287.000 ton
Castillo de Bellver	1983	Africa Sul	252.000 ton
Odsey	1988	Canadá	132.000 ton
Exxon Valdez	1989	Alaska (USA)	37.000 ton
Haven	1991	Itália	144.000 ton
Braer	1993	Reino Unido	85.000 ton
Sea Express	1996	Reino Unido	72.000 ton
Dutos	2000	B. Guanabara (BR)	300.000 galões
Prestige	2002	Espanha	63.000 ton
British Petroleum	2010	Golfo do México	s/dados oficiais

A consequência de alguns destes acidentes tem sido particularmente grave em termos da perda financeira e danos locais para o ambiente. Desta forma, atualmente, eles têm recebido substancial atenção devido a um

aumento na consciência pública e legislação mais rigorosa em todo mundo (VANEM et al., 2008).

Os desastres ocorridos durante as últimas décadas têm mostrado como o petróleo é danoso ao ambiente. Contudo, esses desastres também serviram para o desenvolvimento de técnicas para lidar com derrames de óleo no ambiente marinho e na zona costeira. Muitos desses métodos normalmente utilizados para a limpeza de áreas que sofreram impacto por óleo (*i.e* dispersantes químicos, queima do óleo, remoção mecânica do sedimento), tornam-se problemáticos quando aplicados em áreas sensíveis, tais como, os manguezais (FINGAS, 1998).

Considerando que no Brasil, durante esta última década, houve um crescimento da atividade de petróleo e gás pode-se concluir que este fato gerou um aumento na exploração, produção e processamento do óleo, podendo ter efeito amplificador sobre os riscos de acidentes durante as etapas de exploração, transporte, refino e usos múltiplos dos produtos e subprodutos. Neste aspecto atenção especial deve ser dada as novas descobertas de grandes reservas de petróleo *offshore* debaixo da camada de sal, denominada de “pré-sal”, a qual num futuro próximo poderá aumentar consideravelmente a produção interna brasileira de petróleo.

A situação do meio ambiente no globo nos desafia a preservar os recursos naturais e, ao mesmo tempo, possibilitar um desenvolvimento social justo, permitindo que as sociedades atinjam uma melhor qualidade de vida em todos os aspectos. A necessidade de consolidar novos modelos de desenvolvimento sustentável exige a construção de alternativas de utilização dos recursos naturais, orientada por uma racionalidade ambiental (OLIVEIRA, 2001). Por meio dessa racionalidade, é cabível sugestões pelo desenvolvimento de metodologias alternativas, menos lesivas ao ambiente, como as técnicas de biorremediação e fitorremediação (DOWTY et al., 2001). Estas formas de remediação são poucas expensivas podendo ser aplicada a grandes áreas, para atenuação de um grande número de poluentes, como por exemplo, os hidrocarbonetos de petróleo (EVENS,2005).

A Figura 1 evidencia os principais tipos de poluentes onde pode ser aplicada a técnica de biorremediação. Percebe-se que o petróleo representa parcela significativa dentre os poluentes, com possibilidades de aumentar essa participação num cenário futuro, onde as novas fronteiras exploratórias da indústria do petróleo e gás certamente irão permitir o aumento da produção.

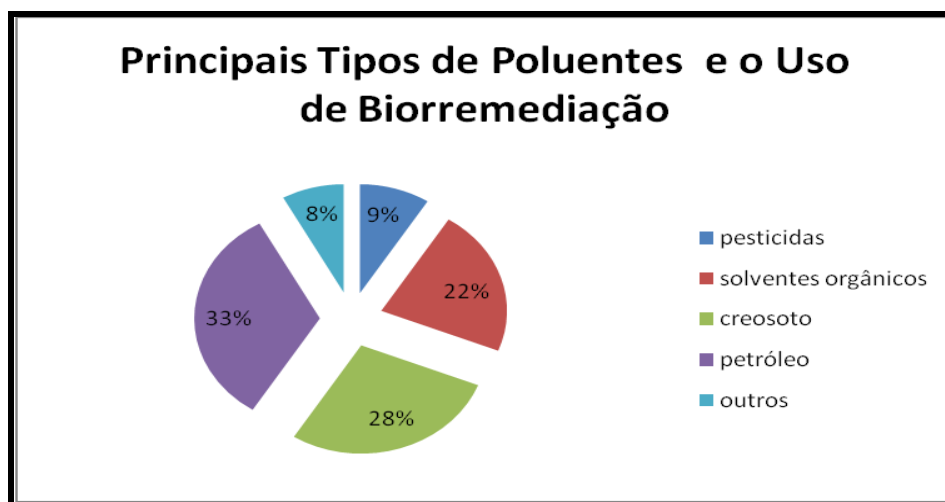


Figura 1 - Os mais importantes tipos de resíduos onde se aplica a técnica de biorremediação. Fonte: USA, EPA/540/N-93/001 apud SOUZA, 2003.

Sob a ótica de desenvolvimento de técnicas limpas ou menos impactantes como as de biorremediação é que uma série de pesquisas vem sendo desenvolvidas, no âmbito do Projeto Cooperativo Processos de Biorremediação de áreas de Manguezal sob Influência de Atividades Petrolíferas, PROAMB, vinculada a Rede de Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas (RECUPETRO), por pesquisadores do Instituto de Geociências da UFBA em parceria com diversas instituições de pesquisas. Este projeto tem como um dos objetivos principais desenvolver testes de biorremediação em níveis laboratorial e de bancada com vistas a promover processos de recuperação de áreas de manguezais afetadas por derramamentos de petróleos e/ou seus derivados.

No escopo da presente pesquisa, com o propósito de se realizar experimentos de simulação dos derrames de óleos em sedimentos de manguezal, implantou-se um laboratório nas proximidades do estuário do rio

São Paulo, intitulado “Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação”. A área estabelecida para construção do laboratório foi escolhida em função: i) de sua proximidade com a região onde serão realizados os testes; ii) de apresentar um piso já construído em cimento, sendo antiga base de poço de perfuração da Petrobras (Figura 2). A referida área obteve devida aprovação prévia junto a Petrobras (CENPES e UO-BA).

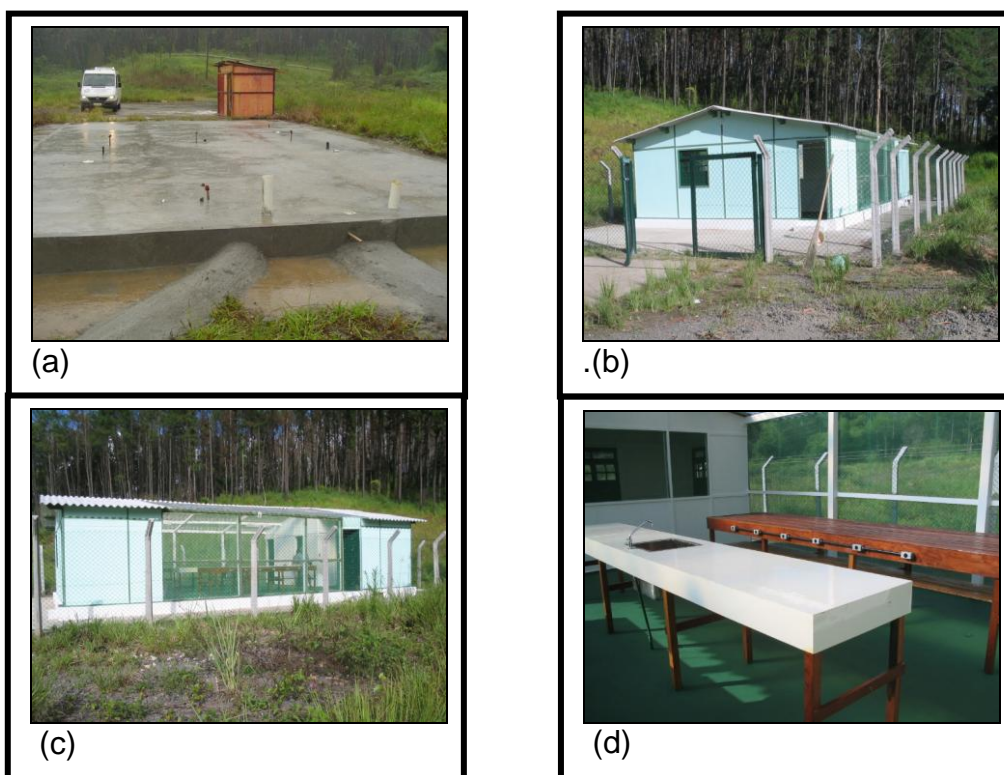


Figura 2 - a) Antiga base de poço onde foi construído o Laboratório de Simulação, (b) vista frontal, (c) vista lateral evidenciando o Laboratório, construído e cercado e (d) vista interna evidenciando as bancadas.

No seu interior existem bancadas, onde ficam apoiados aquários (unidades de simulação) cada um contendo 8 tubos de ensaio (provetas), 2 barras de madeiras para o sustento das provetas (Figura 3a, b) e bombas de aquário usadas para movimentação e oxigenação da água.



Figura 3 - Aquário com tubos de ensaio sustentados em barras de madeira (a) vista em planta, (b) vista em perfil.

### 1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área escolhida como foco das atenções durante a realização deste projeto (área piloto) é representativa do ecossistema manguezal, localizada na região da Baía de Todos os Santos - BTS, onde estão instaladas desde a década de 1950, diversas atividades ligadas à indústria petrolífera (campo de produção, refinaria, porto), mais especificamente nas proximidades da Estação de Produção da UO-BA (Petrobras) denominada “*Estação Pedra Branca*”. O manguezal do estuário do rio São Paulo, objeto deste estudo, situa-se na área de influência dos Municípios de Candeias e São Francisco do Conde. Na sua bacia de drenagem se desenvolvem diversos tipos de atividades vinculadas principalmente às atividades de exploração, refino e armazenamento de petróleo (Figura 4).

O acesso à área se dá através da BR 324, onde no entroncamento com a BA-592 se toma à direção para Candeias em seguida à direção para Refinaria Landulfo Alves (RLAM). Nas proximidades da RLAM se dirige até imediações da Estação Pedra Branca e a exata localização da área é apresentada nas coordenadas geográficas: 12° 44' 26,0" S e 038° 31' 53,9" W.

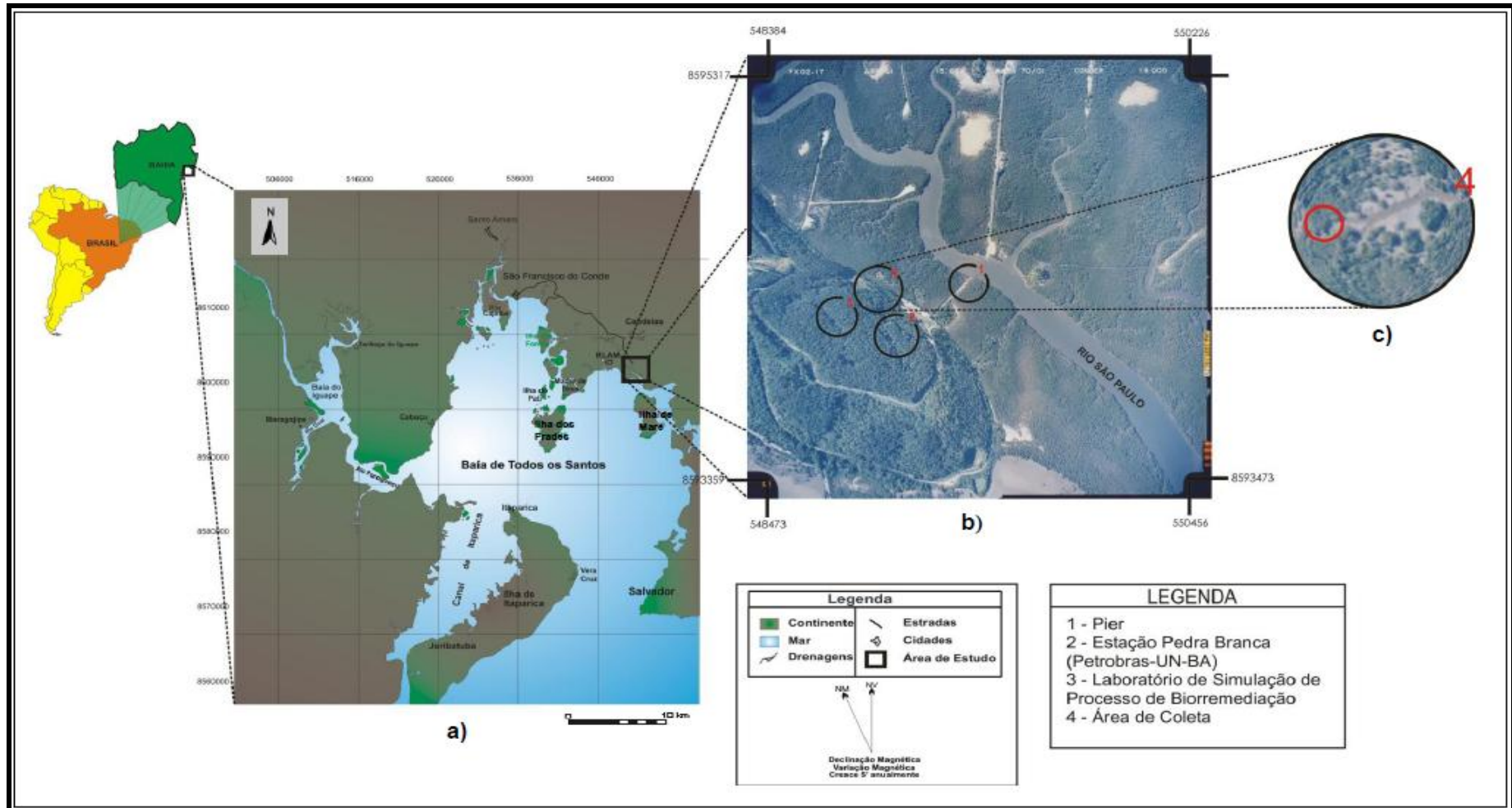


Figura 4 - Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) Fotografia aérea da área e em destaque c) Local de coleta. Fonte: Modificado da folha da Baía de Todos os Santos: SD-24-X-A-IV (BAHIA, 2004).

Nas proximidades da Bacia do rio São Paulo são encontrados diversos poços de petróleo, com registro histórico de incidentes do tipo “*blow-out*” (explosão de poços) que levou a diminuição de grandes áreas de manguezais bem como a contaminação dos remanescentes com óleo cru (petróleo) (CRA, 2001; SANTOS, 2002 apud LIMA, 2010).

Alguns trabalhos desenvolvidos na região norte da Baía de Todos os Santos – BTS (QUEIROZ, 1992; BAHIA, 2002; VEIGA, 2003) caracterizaram a flora da área em questão com presença típica das espécies *Laguncularia racemosa* R. Gaeth (mangue branco), associada à *Avicennia schaueriana* (mangue siriúba) e *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho). Na região do rio São Paulo predomina o tipo de vegetação formada por arbustos, gramíneas e principalmente na região estuarina a vegetação típica de manguezal. Pode ainda ser encontrado o *Pinus sp*, implantado pela Petrobras no processo de reflorestamento (BAHIA, 2002).

Araujo e Silva (2008) em estudo de caracterização físico-oceanográfica do Estuário do Rio São Paulo demonstraram que o referido estuário se comporta globalmente como um sistema homogêneo na vertical, com a ocorrência de períodos de fraca estratificação térmica. Foram registrados valores de intensidade de corrente no intervalo  $1,0 \leq |\vec{v}| \leq 79,6 \text{ cm.s}^{-1}$ , com uma média de  $12,4 \text{ cm.s}^{-1}$ . No que se refere aos processos de troca entre o estuário do rio São Paulo-BA e a BTS, as medidas de velocidade indicam que existe um fluxo preferencial dos volumes d’água na porção sudeste da área de estudo, através do canal situado entre o povoado Roça Grande e a ilha de Maré. Através deste canal escoam a grande maioria das águas provenientes do estuário (ou da BTS) durante o estágio de vazante (ou de enchente) (Figura 5).



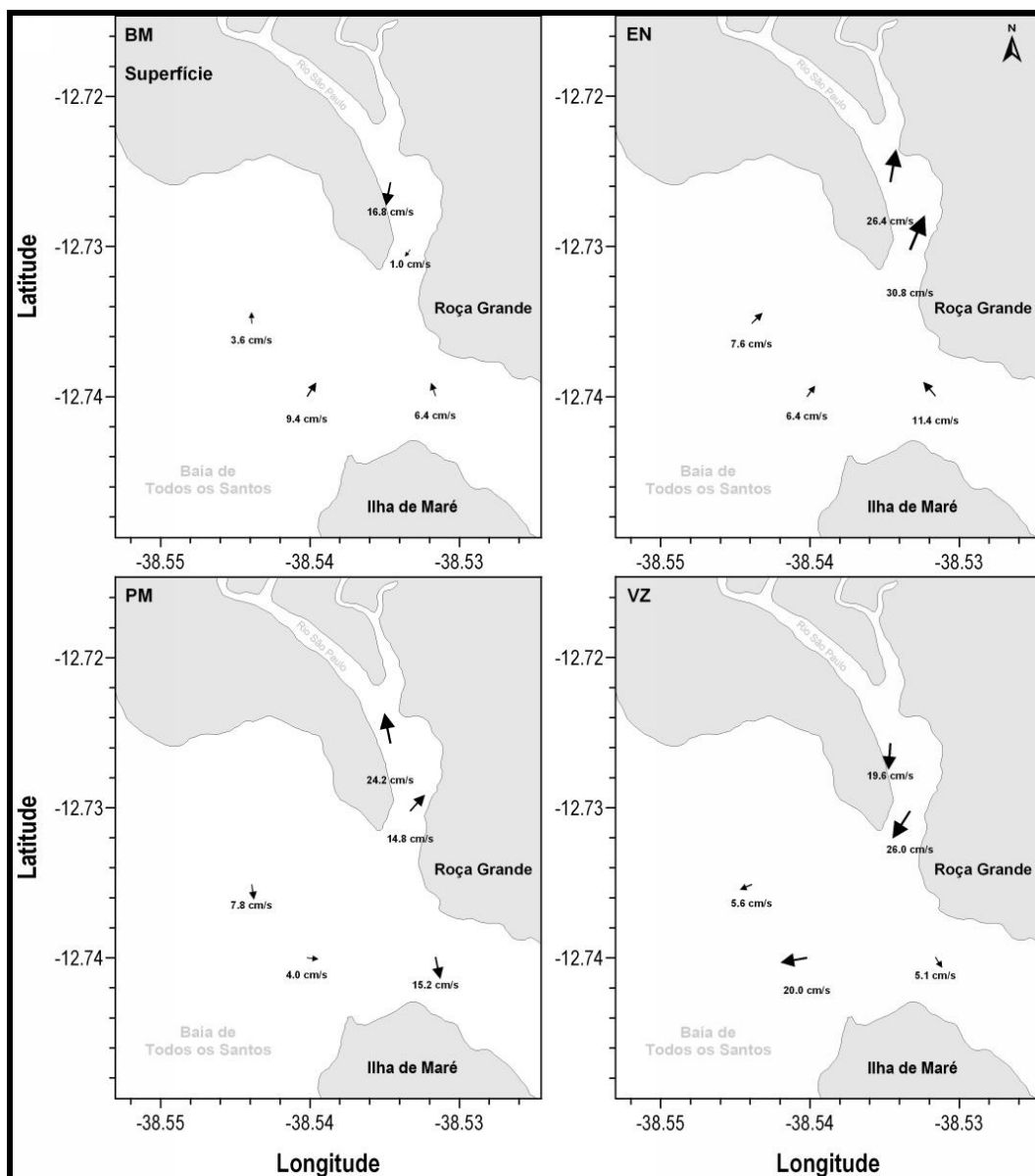


Figura 5 - Intensidade e direção das correntes na superfície ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante os estágios de maré baixa-mar, enchente, preamar e vazante. Estuário do rio São Paulo-BA (Fonte: ARAUJO e SILVA, 2008).

A existência dos terminais marítimos na ilha de Madre Deus, em especial o Terminal Marítimo Almirante Câmara - TEMADRE, representa um risco constante de acidentes ambientais na região. Além do TEMADRE está em operação uma fábrica de asfalto da Petrobras, localizada nas proximidades da região portuária e às margens de uma zona de manguezal. Nos arredores das instalações são evidentes os sinais de degradação ambiental, podendo ser visivelmente observadas pela erosão das encostas, depósitos de aterros sobre o manguezal e descaracterização da paisagem (VEIGA, 2003).

Conforme mostra o Mapa de Sensibilidade Ambiental para a região norte da BTS (Figura 6), verifica-se que o estuário do rio São Paulo foi classificado como área muito sensível, conforme o índice 10D (terras úmidas com vegetação arbustiva – manguezal) (CARVALHO, 2006). Anjos (2002) em seu estudo de Sensibilidade Ambiental da BTS classificou a região de influência do estuário do rio São Paulo com risco de derrames de óleo, colocando neste estudo a região norte da BTS como a área mais sensível. Vale ressaltar, que as Cartas de Sensibilidades Ambientais – SAO baseiam-se em diversos fatores, tais como: 1) grau de exposição; 2) tipo de substrato e 3) declividade.

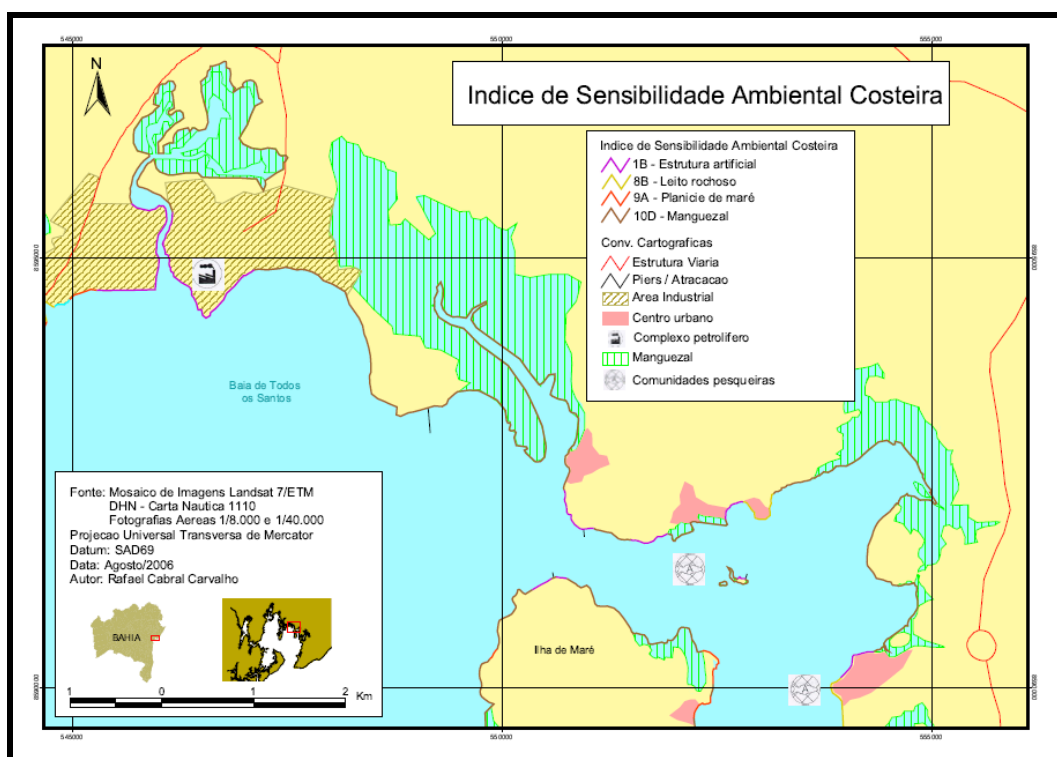


Figura 6 – Cartas Sensibilidade Ambiental – SAO para a região Norte da Baía de Todos os Santos, Bahia (Fonte: PETROMAR/FINEP, Rede 05, PETRORISCO elaborado por Carvalho, 2006).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos gerais

Monitorar os processos e os parâmetros físico-químicos não conservativos em águas do estuário do rio São Paulo, presentes nos aquários de simulação e

avaliar a utilização de produtos contendo nitrogênio e fósforo como bioestimulantes ou aceleradores utilizados em procedimentos de biorremediação.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Monitorar os parâmetros físico-químicos não conservativos – temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.) e potencial hidrogeniônico (pH) presentes na água dos aquários de simulação, capazes de gerar condições adequadas aos microorganismos;
- Monitorar os nutrientes amônia, fósforo e nitrato durante a simulação;
- Analisar de forma qualitativa a eficiência dos fertilizantes agrícolas NPK e OSMOCOTE no processo de bioestimulação utilizados na aceleração da biodegradação de petróleo;
- Avaliar qualitativamente a degradação dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$  e  $m/z=217$ ), biomarcadores aromáticos (HPA) ( $m/z=170$ ,  $m/z=192$ ,  $m/z=228$  e  $m/z=231$ ) através de técnicas cromatográficas;

## 2 REVISÃO DO TEMA

### 2.1 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO PETRÓLEO

O óleo cru corresponde à fração do petróleo, cuja composição é de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, compostos sulfidrilados, oxigenados e nitrogenados, e alguns metais dissolvidos em água (OLIVEIRA, 2001). De acordo com a origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo cru podem variar demasiadamente, e é devido a esses fatores (composição complexa e variabilidade na composição) que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas por tal substância (DAL FORNO, 2006).

O petróleo pode ser dividido em frações saturadas, aromáticas e polares (compostos com nitrogênio, enxofre e oxigênio - NSO). Adicionalmente, além da fração saturada, possuem frações insaturadas com ligações duplas e triplas entre os átomos de carbono (MAHAN, 1972; SOUZA, 2003; PETERS e MOLDOWAN, 2005).

Segundo Hunt (1996) dentre as classes de hidrocarbonetos presentes no petróleo, destacam-se as seguintes: n-alcanos, iso-alcanos, cicloalcanos, aromáticos e cicloalcanoaromáticos. A relativa biodegradabilidade dos hidrocarbonetos tem sido reportada (em ordem de decréscimo de degradabilidade): alcanos lineares (C<sub>10</sub> a C<sub>19</sub>), gases (C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>), alcanos (C<sub>5</sub> a C<sub>9</sub>), alcanos ramificados com até 12 carbonos, alcenos (C<sub>3</sub> a C<sub>11</sub>), alcenos ramificados, aromáticos e cicloalcanos (Figura 7). A tendência é encontrar menos microorganismos com o aumento da dificuldade de degradação (HEELY et al., 1992; SOUZA, 2003; PETERS e MOLDOWAN, 2005, SILVA, A., 2008).

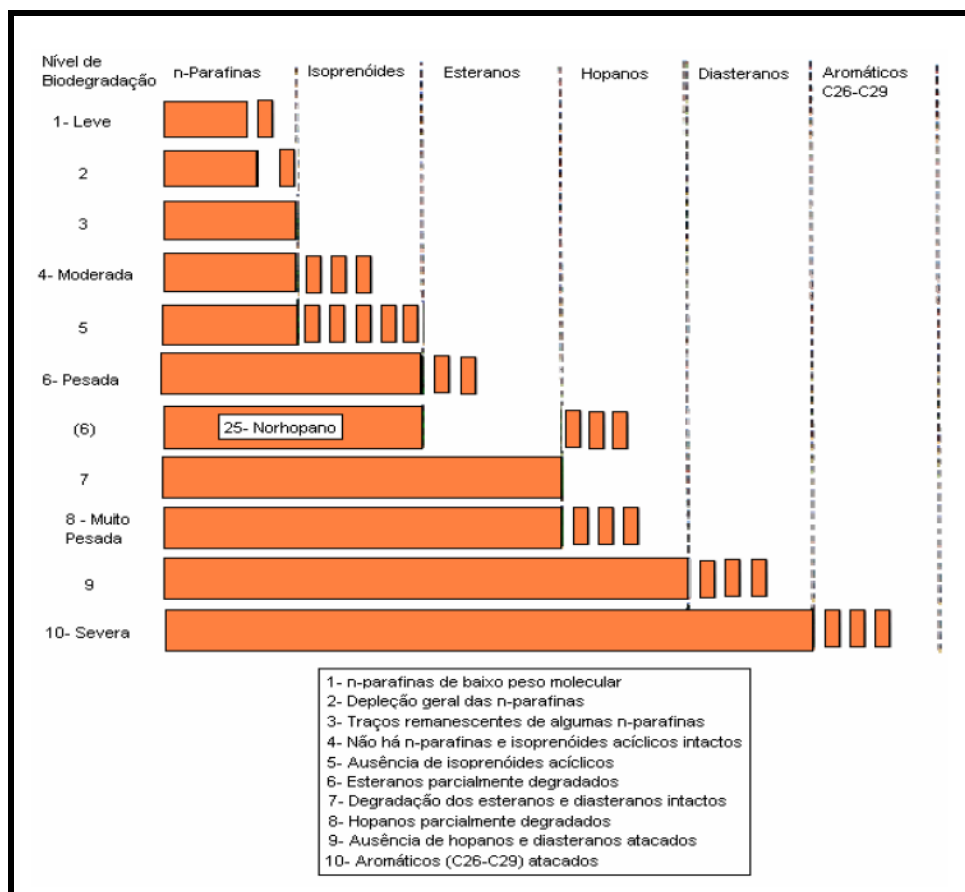


Figura 7 – Efeitos progressivos do nível de biorremediação sobre a composição dos óleos em função da intensidade da alteração em uma escala de 1 a 10. (Fonte:modificado de PETERS e MOLDOVAN, 1993).

Uma importante classe de substâncias orgânicas são os biomarcadores ou marcadores biológicos, são compostos que ocorrem como mistura complexa no petróleo. Esses compostos possuem relação direta com substâncias que ocorrem em organismos vivos. Desta forma os biomarcadores são capazes de transmitir informações específicas com relação à origem da matéria orgânica sedimentar, sua evolução térmica e estágio de degradação (BORIN, 2003).

Entre os marcadores biológicos estão os hidrocarbonetos saturados tais como: os isoprenóides, os terpanos bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos, os hopanos e os esteranos. São os biomarcadores mais estudados encontrados em rocha, sedimentos e óleos, esses desempenham um papel fundamental na geoquímica de exploração do petróleo, fornecendo importantes parâmetros capazes de inferir a idade e paleoambiente deposicional da rocha geradora, grau de evolução

térmica e estágio de biodegradação, além do *input* de matéria orgânica que gerou o óleo (SILVA, A., 2008).

Outra classe importante para a geoquímica ambiental são os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) são produtos primários de processos de combustão incompleta a diferentes temperaturas e compreendem moléculas com 2 a 6 anéis aromáticos. Podem ter origem natural ou antropogênica, tendo duas fontes principais, pirolíticas ou petrogênicas e são considerados recalcitrantes, essas substâncias só sofrem alterações em escalas severas de biodegradação (ZAKARIA et al., 2001).

Alguns autores relatam a importância dos biomarcadores para a geoquímica orgânica, pois algumas classes desses compostos presentes na estruturas moleculares dos organismos quando incorporados ao sedimento, sofrem pequenas modificações durante o período de formação do petróleo (diagênese e catagênese), preservando desta forma seu esqueleto básico de carbono (PETER e MOLDOWAN, 1993; MINGUZZI, 1997; BORIN, 2003; SILVA, A., 2008).

## 2.2 PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO ASSOCIADOS A DERRAMES DE ÓLEO

### 2.2.1 Processos Ambientais

Após um derramamento de óleo no mar inicia-se uma série de processos associados à degradação, sendo os principais: evaporação, dissolução, espalhamento, oxidação, emulsificação, sedimentação e biodegradação (Figura 8). Os impactos causados por um derramamento de óleo são dependentes do tipo de hidrocarboneto, volume derramado, clima, tempo, estações do ano, fatores biológicos, atividades de limpeza e reabilitação (IPIECA, 1993; SOUZA, 2003). A combinação desses fatores contribuirá para um maior ou menor intemperismo sobre o óleo (ITOPF, 2002).

Em um estágio inicial, os processos mais importantes que alteram a composição e o comportamento de um derrame de óleo no mar são: i) evaporação dos componentes mais voláteis do óleo, ii) formação de emulsão óleo em água e iii) dispersão natural (IPIECA, 1993; SOUZA, 2003).

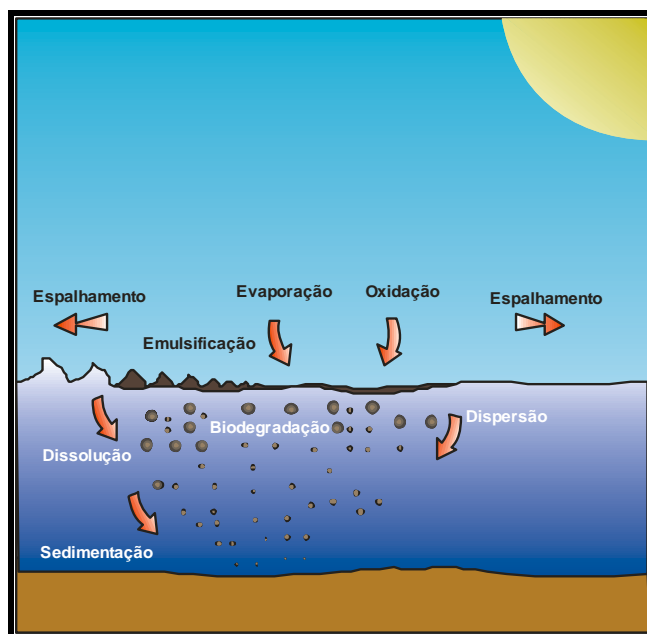


Figura 8 - Processos de intemperismo que ocorre com o óleo derramado no mar. Fonte: modificado de IPIECA (1993).

Nos ambientes tropicais, as temperaturas elevadas fazem com que a perda por evaporação dos componentes voláteis do petróleo seja mais rápida, diminuindo seus efeitos tóxicos sobre a microflora local (FINGAS, 1998). A evaporação acelera o processo de sedimentação precipitando compostos de pesos moleculares elevados; a dispersão natural é caracterizada pelo movimento de gotas de óleo na coluna d'água, intensificado pela turbulência das ondas. A emulsificação envolve mudanças no estado de uma dispersão óleo-água para uma emulsão água-óleo, com formação de uma mistura. O processo de dissolução é considerado um parâmetro importante, pois envolve a solubilização parcial dos compostos aromáticos de baixos pesos moleculares (ITOPF, 2002). Outros fatores como foto-oxidação também contribuem para alterações químicas do óleo.

## 2.2.2 Processos Microbiológicos

O processo de tratamento biológico é um uma reação bioquímica mediada por microorganismos que transformam substâncias tóxicas em outras menos tóxicas ou não-tóxicas. A aceleração de biodegradação denomina-se biorremediação. Um composto orgânico é oxidado (perde elétrons de hidrogênio) por um acceptor de elétrons, e este é reduzido, ganhando elétrons de hidrogênio. Vários aceptores de elétrons têm sido identificados como o oxigênio, nitrato, sulfato ou dióxido de carbono. A utilização do oxigênio como um acceptor de elétrons é denominado biodegradação aeróbica; enquanto com os outros elementos, biodegradação anaeróbica. (AZEVEDO, 2006).

Os microorganismos envolvidos no processo de biodegradação do petróleo devem possuir características tais como: a presença de um grupo específico de enzimas oxigenases ligadas à membrana citoplasmática e mecanismos para a otimização do contato com os hidrocarbonetos insolúveis em água (SOUZA, 2003). A transformação dos hidrocarbonetos pelos microorganismos pode ser facilitada através da produção de enzimas como catalisadores biológicos (UNA e GARCIA, 1993).

A biodegradação de componentes do petróleo nos mais variados ambientes naturais é mediada primariamente por microorganismos dos grupos das bactérias e dos fungos; esses microorganismos possuem a habilidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. A degradação do petróleo por microorganismos é bastante conhecida, podendo ser comprovada pela ocorrência de reservatórios de óleos biodegradados, resultantes do contato do óleo com água enriquecida em microorganismos degradadores de hidrocarbonetos (MORGAN e WATKINSON, 1994). Porém os processos de biorremediação são dependentes de fatores abióticos tais como: temperatura, salinidade, pH do ambiente, quantidade de oxigênio dissolvido e nutriente (ADAMASSU e KORUS, 1996).

### **2.2.3 Processos Químicos**



Alguns estudos (PETERS e MOLDOWAN, 1993; WANG et al., 1998; SOUZA, 2003, COELHO, 2005) têm mostrado que os hidrocarbonetos saturados e aromáticos e as frações de resinas e asfaltenos, diferem em relação à suscetibilidade ao ataque microbiano, seguindo uma ordem de biodegradação, na qual, os *n*-alcanos são os primeiros; seguidos pelos *iso*-alcanos e aromáticos de baixo peso molecular, e os demais compostos (alcanos cíclicos, aromáticos de elevado peso molecular, resinas e asfaltenos) são mais difíceis de serem biodegradados.

A degradação dos constituintes do óleo é muito complexa e envolve muitas etapas, algumas mais rápidas, outras mais lentas. Ao longo dos últimos 20 anos houve aumento no interesse pelo conhecimento de áreas contaminadas por HPA devido às suas características de resistência à biodegradação microbiológica, persistência e porque vários desses compostos apresentam natureza tóxica, mutagênica e carcinogênica (EDGEHILL, 1999).

### 2.3 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO APLICADAS A DERRAMES DE ÓLEO

Para a redução ou minimização dos danos ambientais causados pelos derramamentos de óleo, diversos métodos de limpeza são utilizados internacionalmente. A opção pelo método a ser empregado vincula-se fortemente ao tipo de ecossistema impactado, levando-se em conta suas características e sensibilidade. Envolve também o tipo de óleo derramado e fatores técnicos, tais como acesso e tipo de equipamento passível de ser utilizado, além do custo da operação (CETESB, 2003). Deve ser evidenciado que uma escolha do método de limpeza não adequado pode maximizar os danos ambientais (DUA et al., 2002).

O sucesso da técnica de biorremediação em derramamento de óleo depende de habilidades para otimização das variáveis físicas, químicas e condições biológicas do ambiente contaminado, distribuição e natureza do óleo derramado (NIKOLOPOULOU et al., 2007).

Segundo Baker e Herson (1994), Boopathy (2000), Oliveira (2001) as técnicas de biorremediação e remediação no geral podem ser classificadas quanto a ação e local de tratamento:

### 2.3.1 Quanto à ação de tratamento:

- **Landfarming**

O *landfarming* é uma técnica de biorremediação muito utilizada para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os microorganismos heterotróficos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os contaminantes ali presentes, transformando-os em substâncias inertes como o material orgânico estabilizado, água e CO<sub>2</sub>. Esta estimulação ocorre através do revolvimento do solo por operações de aração (visando aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes), além da adição de corretivos, fertilizantes e, se necessário, de água através da irrigação. Pode-se ainda bioaumentar o solo com microorganismos de reconhecida capacidade de degradação desses contaminantes e adicionar surfactantes, visando aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes. Esta técnica pode ser realizada *in-situ* visando à descontaminação do solo no local onde este foi contaminado, ou pode ser realizada *ex-situ*, se o solo contaminado foi removido para outro local onde o *landfarming* será operado (DOELMAN e BREEDVELK, 1999 apud JACQUES et al., 2005).

O *landfarming* pode ser considerado um sistema de tratamento de resíduos. Nesse caso, uma área é destinada exclusivamente para este fim. Os resíduos com alta concentração de carbono orgânico são aplicados periodicamente no solo, visando à degradação de seus constituintes. Quando o monitoramento indicar a redução da concentração dos constituintes do resíduo no solo, deve ser feita nova adição de resíduo (WARD et al., 2003). Além disso, para evitar a contaminação do ambiente, a área deve ser impermeabilizada com uma camada de argila

compactada a uma profundidade de 0,6 a 1,0m abaixo da superfície, assim como, contenção do escoamento superficial.

Foi à primeira técnica *ex-situ* aplicada em grande escala e surgiu nos EUA. O processo pode ser aplicado com grande sucesso quando o material é contaminado com substâncias de fácil degradação aeróbica (BERG, 2005).

As vantagens dessa estratégia segundo Schneider et al. (2002) e Maila e Cloete (2004), baseiam-se na forma simples de planejar e executar; além de exigirem tempo de tratamento curto. Esta técnica pode tratar grandes volumes do solo e é eficiente para a redução de constituintes orgânicos com velocidade de biodegradação baixa. Essa técnica possui limitações para conseguir taxas de degradação superiores a 90% e para constituintes com baixa (<0,1 ppm) e elavadas (50.000 ppm) concentrações. A presença de metais pesados em concentrações superiores a 2.500 ppm pode ser tóxica para a biota. Este fato pode inibir a degradação dos compostos orgânicos e compostos voláteis tendem a evaporar durante o processo. Além disso, requer uma grande área para o tratamento dos resíduos e geração de poeira que podem afetar a qualidade do ar.

- **Biorreatores**

O uso de biorreatores é uma técnica aplicada *ex-situ* para biorremediação de substratos contaminados com altas concentrações de hidrocarbonetos. Existe diverso tipos e configurações de biorreatores que ilustrativamente podem ser comparados a tanques aéreos fechados. O substrato contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada através de rotações. A formação desta suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos microorganismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo, duas grandes limitações da biorremediação *in-situ* (MACLEOD e DAUGULIS, 2005). Além disto, no interior do biorreator, as condições ambientais de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo crescimento microbiano, sendo possível também a

inoculação de microorganismos comprovadamente degradadores dos contaminantes. Após a concentração dos contaminantes terem sido reduzidas aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator (JACQUES, 2007).

Em geral, as taxas e a extensão da biodegradação nesta técnica são muito altas, em vista do controle sobre fatores abióticos, e até bióticos, no interior do biorreator, o que resulta em tratamento em curto período de tempo. Concomitantemente a isso, algumas desvantagens estão relacionadas a esta técnica, como a limitação da quantidade de substrato tratado devido ao tamanho dos biorreatores e a necessidade, em alguns casos, de pré-tratamento para a remoção de compostos tóxicos aos microorganismos (como metais pesados) e para a redução do tamanho dos agregados. Porém, o fator que normalmente limita a utilização desta técnica é o elevado custo de remediação, em vista da alta tecnologia utilizada nos biorreatores. Assim, o uso dessa técnica restringe-se aos casos em que o substrato está contaminado com altas concentrações do poluente e há necessidade de se realizar a biorremediação em curto período de tempo. Segundo Doelman e Breedvelk (1999), sob essas exigências, a utilização de outras técnicas de biorremediação provavelmente não traria resultados satisfatórios.

- **Atenuação Natural**

Uma das técnicas *in-situ* é a biorremediação passiva ou intrínseca, também denominada atenuação natural, na qual o contaminante permanece no local e, através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção, ocorrem a descontaminação do ambiente (MULLIGAN e YONG, 2004). Por depender exclusivamente destes processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta, exigindo o uso conjunto de outras técnicas e obrigatoriamente, o monitoramento do local por longos períodos de tempo, visando à proteção da saúde do homem e do ambiente (BENTO, 2005).

Bento (2005) conduziu um experimento por 84 dias, no qual a biorremediação passiva reduziu em 47% a concentração de hidrocarbonetos no solo. Já a

contaminação de querosene tem sido rapidamente eliminada pela biorremediação passiva devido à alta volatilidade deste combustível (DROR, 2001).

Segundo Prizzia (2001) as vantagens da atenuação natural podem ser explicadas pelo baixo custo, geração de menos resíduos, risco reduzido de exposição humana. Porém, exigem maiores prazos para realização da limpeza ou descontaminação. Essa técnica é mais recomendada para ambientes com altas sensibilidades, tais como, os manguezais e marismas.

- **Fitorremediação**

A fitorremediação é uma técnica emergente, que utiliza plantas para remediar o solo contaminado por metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos. A maioria das pesquisas em fitorremediação estuda a utilização de plantas hiperacumuladoras, que têm a capacidade de estocar grandes quantidades de metais pesados sem um uso aparente em seu metabolismo (WEIS e WEIS, 2004). Porém, a observação de que os solos vegetados mostraram maiores taxas de desaparecimento de compostos orgânicos que os solos não-vegetados resultou no incremento das pesquisas visando à biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), solventes orgânicos e combustíveis (ALKORTA e GARBISU, 2001).

Segundo Pilon-Smits (2005), a fitorremediação pode ser dividida em cinco mecanismos principais, que são: a) rizofiltração, que é uma técnica de tratamento de água em que os contaminantes são removidos e retidos ou degradados no tecido vegetal; b) fitoextração, em que os contaminantes são removidos do solo e retidos no tecido vegetal; c) fitotransformação ou fitodegradação, uma técnica que pode ser aplicada ao tratamento da água e do solo, na qual ocorre a degradação dos contaminantes através do metabolismo da planta; d) fitoestimulação, em que ocorre a estimulação da atividade dos microorganismos degradadores dos contaminantes pela rizosfera da planta; e e) fitoestabilização, através de algumas enzimas específicas, quando as plantas são utilizadas para reduzir a migração dos contaminantes no solo.

A fitorremediação tem atraído o interesse devido à sua eficiência, adequação a aplicações em longo prazo, pouca manutenção exigida e vantagens estéticas, e ainda tem o atrativo de apresentar um custo baixo e de ser mais bem aceita pela população, pois utiliza plantas em um processo reconhecido como mais “ecologicamente correta” (VIANA et al., 2007).

Algumas limitações são apontadas na fitorremediação, sendo as mais importantes, a falta de resultados mais concretos ou suficientes de pesquisas realizadas, essa técnica ainda não é muito aceita por algumas entidades reguladoras, além de exigir um monitoramento contínuo. O clima é um fator que pode restringir o crescimento das plantas e o tempo requerido para obtenção de uma despoluição satisfatória pode ser longo. (ANSELMO, 2005).

- **Bioaumentamento**

A baixa taxa de degradação de um contaminante pode ser resultado do número reduzido ou inexistente de microorganismos com habilidade de degradação do composto (HUESEMANN et al., 2002). Isto é particularmente importante quando o substrato recebe um xenobiótico e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto. Nestes casos, a bioaumentação, que é a inoculação de um local contaminado com microorganismos com alto potencial de degradação dos contaminantes, torna-se uma prática recomendada (EDGEHILL et al., 1999).

A bioaumentação representa umas das principais tecnologias de remediação usada e apresenta algumas vantagens em relação às outras tecnologias, pois é de baixo custo e de solução permanente. Além de ser fundamentada em processos naturais, essa técnica é aplicável a uma grande variedade de contaminantes e tem uma aceitação pública (MARIANO, 2006).

A desvantagem desta técnica reside na incerteza de que nas condições do ambiente em que serão adicionados, os microorganismos possam decompor o

contaminante, ou mesmo sobreviver à competição com os microorganismos nativos (SILVA, E., 2004).

- **Bioestimulação**

A bioestimulação é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado (ROSA, 2001, 2006).

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o Carbono (C), sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999). No entanto, a presença de elevadas concentrações de HPA com potencial para serem utilizados como substrato para o crescimento dos microorganismos pode fazer com que outros nutrientes, que não o C, tornem-se limitantes. A relação C:N:P de 100:10:1 no substrato a ser biorremediado tem sido normalmente recomendada (CHENG e MULLA, 1999).

A utilização do fertilizante OSMOCOTE que tem liberação lenta (*slow-release*) aumentou drasticamente as atividades metabólicas dos microorganismos e acelerou a biodegradação dos hidrocarbonetos em substratos contaminados por atividades petrolíferas (XU et al., 2004). Santana (2009) utilizou OSMOCOTE em experimento realizado com sedimentos de manguezais extraídos da Baía de Todos os Santos (BTS)/BA. Os resultados evidenciaram um óleo em estado avançado de degradação. Porém não foi possível estabelecer o grau da influência do OSMOCOTE nessa degradação.

A bioestimulação se fundamenta no favorecimento da microbiota nativa para degradar mais facilmente o contaminante em questão. Dentre as vantagens deste tipo de técnica de tratamento destacam-se a certeza de que os microorganismos nativos já estão adaptados às condições climáticas do local, que pode ser determinante no sucesso do tratamento e os custos são baixos, podendo ser usada

em áreas extensas (OLIVEIRA, 2001). Porém, esse método pode provocar degradação de alguns HPA e geração de subprodutos tóxicos (SOUZA, 2003).

A escolha da estratégia de biorremediação mais apropriada para um determinado local, é determinada por vários fatores, tais como, as características dos poluentes presentes (natureza, concentração e biodisponibilidade) e a composição em termos de nutrientes e população microbiana presente no local (DUA et al., 2002). A solução mais eficaz poderá passar por uma combinação de diferentes técnicas de biorremediação (KUIPER et al., 2004; SILVA et al., 2004).

## 2.4 APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO

### 2.4.1 Internacionalmente

Diversos estudos e pesquisas realizadas (ATLAS e BARTHA, 1972, ATLAS, 1977, 1981; BOEHM e FIEST, 1982; HOFF, 1993; PRITCHARD et al., 1992; ROSA, 2001; SOUZA, 2003; COELHO, 2005 e Lima 2010) permitem dividir o histórico das técnicas de biorremediação em duas fases principais: *Pré-Exxon Valdez* e *Pós-Exxon Valdez*.

- **Pré-Exxon Valdez (antes de 1989)**

Os acidentes associados ao derramamento de grandes volumes de petróleo começaram a ser divulgados pela imprensa na década de sessenta, na mesma época em que os primeiros superpetroleiros foram lançados ao mar. O primeiro acidente noticiado ocorreu em março de 1967, em águas territoriais inglesas, devido ao choque do navio tanque *Torrey Canyon* contra as rochas de uma pequena ilha, despejando 85 mil toneladas de petróleo no mar, contaminando as praias da região (PRINCE, 1993; HOFF, 1993).

Os derrames de óleos provocaram incipientes pesquisas voltadas para técnicas que pudessem remediar as contaminações geradas por hidrocarbonetos.



Esse período foi marcado por pesquisas acadêmicas, sendo a biorremediação ainda pouco conhecida.

Durante a década de 1980 inúmeros produtos comerciais foram desenvolvidos para serem utilizados como agentes de biorremediação. Alguns destes produtos utilizados foram principalmente nutrientes, mas a maioria foi obtida a partir da crescente indústria biotecnológica, mas neste período não se tem conhecimento da aplicação da técnica em derrames de óleo no mar (HOFF, 1993). As pesquisas sobre biorremediação continuaram evoluindo, mas a técnica era usada somente no tratamento de solos contaminados por óleos provenientes de vazamentos de tanques de reserva.

- **Pós-Exxon Valdez (1989 até os dias atuais)**

O derrame causado pelo petroleiro *Exxon Valdez*, em março de 1989, na Baía Prince William, Alasca, teve a marca de 37 mil toneladas de óleo. Foi considerado um dos mais sérios acidentes ecológicos ocorridos no mundo, em função da vulnerabilidade do ecossistema atingido pelo derrame (PRITCHARD et al., 1992; BRAGG et al., 1994). Neste período a técnica de biorremediação recebeu grande atenção, despertando muito interesse da classe acadêmica e do público em geral. Por isso, o derrame de óleo provocado pelo *Exxon Valdez* é considerado um marco para o desenvolvimento das técnicas de biorremediação. Foi possível fazer diversos testes com dispersantes químicos, bioaumento e bioestimulação (PRITCHARD et al., 1992).

Em 1990 ocorreu uma explosão durante a transferência de óleo do navio tanque *Mega Borg*, próximo a Galveston, Texas. O óleo foi derramado continuamente durante os nove dias seguintes. A Companhia *Texas Water Commission* recebeu autorização para aplicar sobre a mancha microorganismos produzidos especificamente para biorremediação, cujo nome comercial é *Alpha BioSea*. Os resultados das análises cromatográficas não foram conclusivos, pois mostraram uma grande variabilidade entre as amostras coletadas, comprovando a dificuldade de se conseguir amostras representativas em mar aberto (HOFF, 1992;

ATLAS, 1995).

Ainda durante a década de 1990, mas especificamente em 1992, aproximadamente 100 ton de óleo bruto foram acidentalmente, derramados em Israel. A técnica escolhida para recuperação foi a biorremediação por bioaumento e bioestímulo onde foram utilizadas bactérias selecionadas e adicionados compostos de nitrogênio e fósforo (GRAWFORD e GRAWFORD, 1996).

Nas últimas décadas ocorreram graves acidentes com petroleiros, entre eles destaca-se o que ocorreu no fim de 2002 quando o navio *Prestige* afundou na costa da Galícia, Espanha, com 63 mil toneladas de hidrocarbonetos causando um grande impacto ambiental e transtornos econômicos irreparáveis (DRAGO, 2003). Foi efetuado um estudo durante dois anos, em dois locais altamente contaminados, a fim de acompanhar a atenuação natural e para testar a eficácia de biorremediação com um fertilizante. A metodologia incluiu uma abordagem inovadora para o cálculo de carga de petróleo (com base em análise de imagem), a análise do destino de hidrocarbonetos através de biomarcadores químicos e microbiológicos, diferentes técnicas para isolar e estudar degradação de hidrocarbonetos. Além disso, um dos principais resultados refere-se a esgotamento notável de hidrocarbonetos alcançados em pontos onde a água doce fluiu através da costa (GALLEGO et al, 2006).

#### **2.4.2 Nacionalmente**

No Brasil foram registrados, até o momento, quatro importantes derrames de petróleo. Em março de 1975 o petroleiro grego *Tarik Ibn Ziyad* derramou 2,8 mil toneladas de óleo na entrada da Baía de Guanabara. A mancha atingiu várias praias oceânicas das cidades do Rio de Janeiro e Niterói, e a contaminação afetou seriamente a biota da zona intermarés (CRAPEZ et al., 2002 apud SOUZA, 2003). No litoral norte do estado de São Paulo, em maio de 1994, aproximadamente 1,5 mil toneladas de óleo vazaram no rompimento do oleoduto do terminal Marítimo Almirante Barroso (VIEIRA, 2000).

Os derrames mais recentes ocorreram em 2000. Aproximadamente 736 toneladas de óleo combustível vazaram de um duto da Petrobras que liga o terminal da Ilha D'água à refinaria Duque de Caxias (REDUC). O local do rompimento, na parte interna da Baía de Guanabara, levou a contaminação às praias adjacentes e colocou em risco a Área de Proteção Ambiental de Guapimirim, uma das poucas regiões de manguezal ainda preservadas (OLIVEIRA e CÂMARA, 2000).

Segundo Souza (2003), as pesquisas sobre as diversas aplicações da técnica de biorremediação de locais contaminados por petróleo e derivados, vêm sendo desenvolvidas por universidades, isoladamente ou em conjunto com a Petrobras. A seguir são listadas as principais instituições responsáveis pelo desenvolvimento das técnicas de biorremediação no país.

O Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Fluminense, pioneiro na identificação e no isolamento de bactérias hidrocarbonoclásticas, presentes nas águas e nos sedimentos das baías da Ilha Grande e da Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. Há também, pesquisas sobre as respostas da microbiota das praias da Boa Viagem, do Forte do Rio Branco e da área da Estação Hidroviária de Niterói (RJ), aos efeitos agudos e crônicos da exposição a hidrocarbonetos aromáticos do petróleo. Os resultados revelaram que aumentando a frequência de entrada de benzeno, tolueno e xileno no sistema, as bactérias tornam-se capazes de degradar quantidades crescentes desses poluentes (CRAPEZ, 2001).

Outras linhas de pesquisa, associadas à biorremediação e à biodegradação de petróleo, derivados e seus resíduos, estão sendo conduzidas no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Entre essas pesquisas encontra-se a de Cunha e Leite (1997) que teve como objetivo a otimização de condições ambientais para acelerar o processo de biodegradação de gasolina em microcosmos constituídos de solos bioaumentados com *Pseudomonas putida*, obtida de uma coleção de cepas (SOUZA, 2003).

Pesquisadores da Universidade Federal do Paraná desenvolveram microorganismos especializados para biorremediação de solos contaminados, com utilização tanto em áreas industriais como em áreas urbanas. O produto é constituído por microorganismos acondicionados em meio argiloso, sob baixos teores de umidade, o que facilita seu manuseio e aplicação. Eles podem ser usados também em *landfarmings*, contendo resíduos de refinaria, no tratamento de resíduos oleosos de atividades petrolíferas e petroquímicas, ou em solos contaminados por derivados de petróleo em geral, como os de postos de gasolina. Esses microorganismos foram usados na recuperação de solos contaminados pelo derrame de petróleo resultante do rompimento de um oleoduto da REPAR, ocorrido em 16 de julho de 2000 no rio Barigüi, afluente do rio Iguazu (LIMA, 2010).

O Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente da Universidade Estadual Paulista desenvolveu estudo com objetivo de avaliar o potencial de biorremediação em solos e em águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. A partir de amostras de solo e água subterrânea coletadas em diferentes postos de combustíveis, avaliou-se a biorremediação natural da água subterrânea em local onde ocorreu vazamento de óleo diesel, mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos durante 2 anos. Diferentes técnicas de biorremediação (bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante e bioaumento com injeção de microorganismos) foram comparadas quando aplicadas de forma isolada e em conjunto a solos contaminados com óleo diesel e comparou-se também a capacidade de diferentes microorganismos em biodegradar óleo diesel comercial e intemperizado. Avaliou-se a eficiência da utilização da vinhaça e a capacidade de diferentes culturas de bactérias (MARIANO, 2006).

Dias (2007) atualmente no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas utilizou-se de um consórcio microbiano formado por bactérias de ocorrência natural, especialmente selecionadas. Teve como objetivo acelerar os processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, removendo os compostos tóxicos e de difícil degradação. Tendo bons resultados na remoção dos compostos do petróleo principalmente nos teores de HPA.

No Curso de Pós-Graduação do Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo - UENF, tem sido desenvolvidas pesquisas, juntamente com a Petrobras. Destaca-se o trabalho elaborado por Souza (2003) em testes laboratoriais que buscou desenvolver métodos de biorremediação para aplicação em derrames de óleo no mar. Outro trabalho relevante foi elaborado por Rosa (2001) que simulou, em laboratório, o derrame de petróleo em sedimentos costeiros com o objetivo de testar a eficiência da técnica de biorremediação, com a aplicação de nutrientes como fosfato de amônio e fertilizante do tipo NPK. Os resultados das análises geoquímicas realizadas nas amostras de óleo biodegradado, ao final de 30 dias de tratamento, revelaram a remoção completa dos *n*-alcanos e a degradação parcial dos isoprenóides.

- **O Pioneirismo da Bahia**

Segundo Veiga (2003) a primeira refinaria moderna de petróleo do Brasil foi inaugurada em 17 de setembro de 1950, sob o nome de Refinaria Nacional de Petróleo S.A., sendo depois batizada de Refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM). Localizada às margens da Baía de Todos os Santos e dentro de uma região de manguezal no município de São Francisco do Conde.

O pioneirismo vivido pela Baía de Todos os Santos deixou um grande passivo ambiental, sentido atualmente pelos ecossistemas locais. De acordo com Veiga (2003) à época da criação da RLAM, a componente ambiental ainda não era considerada como parte integrante da tomada de decisões pelas empresas, por isso nota-se que a posição geográfica da refinaria não levou em conta a preocupação com as peculiaridades do meio ambiente local.

Diversos estudos retratam poluição por derramamentos ou vazamentos de óleos na região norte da BTS (TAVARES et al., 1996; MACHADO et al., 1996; PESO-AGUIAR et al., 2000; VEIGA, 2003), segundo esses autores, desde a criação da RLAM, a qualidade de vida da população têm sido comprometida, por um passivo

ambiental que se reflete na contaminação dos elementos naturais, incluindo a biota comestível.

Ao longo dos anos, estudos realizados na região norte da BTS têm mostrado sensíveis alterações nas condições ambientais. Dentre estes, podemos citar o trabalho realizado por Martins (2001), que avaliou a ocorrência de impactos ambientais crônicos na região norte da BTS em decorrência da presença do complexo petrolífero, relacionando níveis de hidrocarbonetos em sedimentos e as respostas induzidas pela toxicidade em moluscos. Silva, S. (2002) avaliou o grau de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em sedimento de meso-litoral da BTS e suas possíveis fontes. Outro estudo relevante foi feito por Veiga (2003) que avaliou a origem e os níveis de contaminação de sedimentos superficiais de manguezais da porção norte BTS, encontrando valores médios de HTP ( $285.688 \text{ ng.g}^{-1}$ ) principalmente em região de produção de petróleo. Também deve ser destacado o trabalho realizado por Celino et al. (2007), que avaliou as 17 fontes de matéria orgânica e o grau de contaminação por hidrocarbonetos totais na parte norte da BTS. Estudos recentes feitos na mesma região (SANTANA, 2008; LIMA, 2010) verificaram índices de contaminação por petróleo, fatos evidenciados por meio de cromatografia.

A falta de planejamento, a perda de habitat, fragmentação de manguezais, expansão industrial, falta de ordenamento urbano, baixa qualidade do ar da região norte da BTS, todos esses fatores demonstram como esta região é complexa. Mesmo com quantidade consideradas de petróleo extraídas da região, pouco se investiu em melhoria da qualidade ambiental, o que torna o modelo de produção atual, para esta região, insustentável ecológica e socialmente.

Estudos de biorremediação para a parte norte da BTS são ainda incipientes e com poucas publicações com resultados plausíveis, esse fato, por si só, já demonstra a importância de se investir nessa técnica, gerar banco de dados robustos que possam dá sustentação em uso real (*in-situ*) num futuro próximo.

Pesquisas com esta temática estão sendo desenvolvidas em várias Instituições de Ensino Superior. A Rede de Recuperação de Áreas Impactadas por

Atividades Petrolíferas (RECUPETRO) reúne várias entidades nacionais de pesquisa e extensão, dentre as quais a Universidade Federal da Bahia (UFBA) tem desenvolvido e aprimorado diversos estudos (SANTANA, 2008; LIMA, 2010; MOREIRA, 2011) relacionadas com as técnicas de biorremediação (bioaumento e bioestímulo). Tais pesquisas visam trazer resultados positivos e novas perspectivas para as tecnologias de remediação de áreas impactadas por petróleo.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A metodologia aplicada no presente trabalho foi baseada na técnica de biorremediação de substratos de manguezais afetados por ações petrolíferas, através da adição de nutrientes (bioestimulação) nos aquários do Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação, construído para testes em nível de bancada. Teve como suporte para as partes analíticas o LEPETRO (Laboratório de Estudos do Petróleo) vinculado ao Dept<sup>o</sup> de Geoquímica, Instituto de Geociências na Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo-LENEP da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF).

As semanas que antecederam ao campo foram fundamentais para realização dos planejamentos antes das coletas, onde foram separados todos os materiais necessários, descontaminação dos frascos para coletas, calibração dos equipamentos utilizados para medir os parâmetros não conservativos.

#### **3.1 AMOSTRAGEM**

Os locais de amostragem foram selecionados de forma a se obter a melhor representatividade possível da área de estudo (Figura 9). Tendo como suporte para determinação das estações: equipamentos de GPS (Sistema de Posicionamento Global), mapas topográficos para localização da área, na escala de 1:25.000 e tábuas de marés. Vale ressaltar que durante o ano de 2007 e 2008 foram realizados

vários pré-testes e coleta na referida área, isso facilitou a determinação dos locais de amostragem no atual estudo.

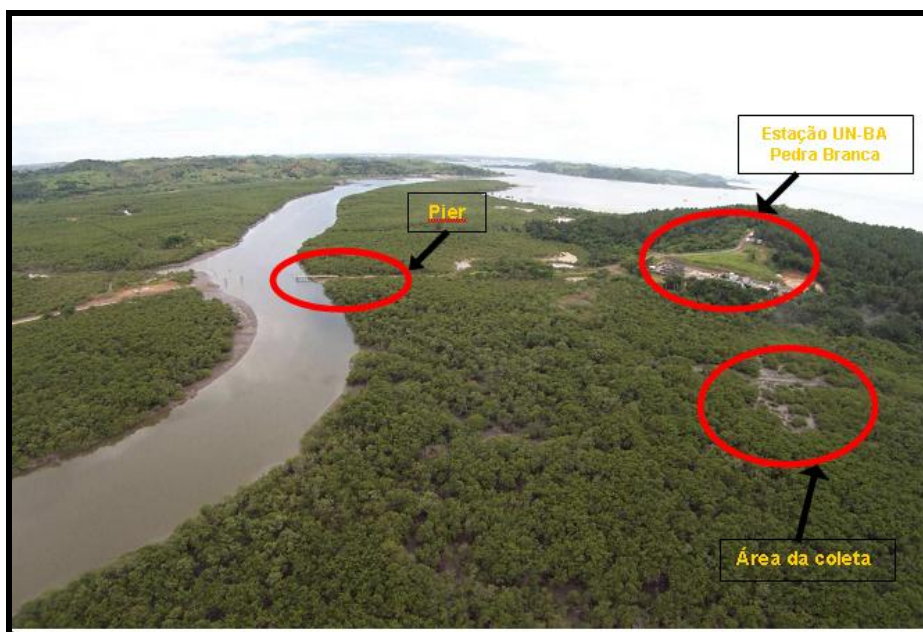


Figura 9 – Fotografia aérea da foz do rio São Paulo localizado no município de São Francisco do Conde-BA desaguando na BTS, mostrando em destaque a localização do pier, da estação Pedra Branca e área das coletas (Fonte: modificado de BMA, 2005)

A coleta do sedimento foi realizada no dia 04 de setembro de 2008 em locais de deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais, em locais geralmente inundáveis, que o tempo entre a subida e descida da maré leva em torno de (02) duas horas. Foram coletados 76 testemunhos de sedimento com auxílio de um testemunhador, que consta de um tubo de aço inoxidável de 10cm de diâmetro e capacidade para coletar testemunhos de até 30cm (Figura 10a, b). Em seguida os de sedimento foram homogeneizados em um recipiente metálico (Figura 10c).

Após ser homogeneizado, o sedimento foi dividido em três porções: 1º porção foi mantida a composição natural do sedimento (referência); na 2º porção utilizou-se NPK (0,5g para cada kg de sedimento) e na outra porção do sedimento utilizou-se OSMOCOTE (0,5g para cada kg de sedimento). Esses fertilizantes são compostos de nitrogênio, fósforo e potássio, na proporção 10:10: 10. A diferença entre os fertilizantes está na forma de liberação de seus nutrientes. O NPK libera os nutrientes mais rapidamente, sendo facilmente solubilizado, e o OSMOCOTE, por



ser envolvido por uma cápsula, libera os nutrientes de forma lenta e contínua - *slow release* (Figura 10d).

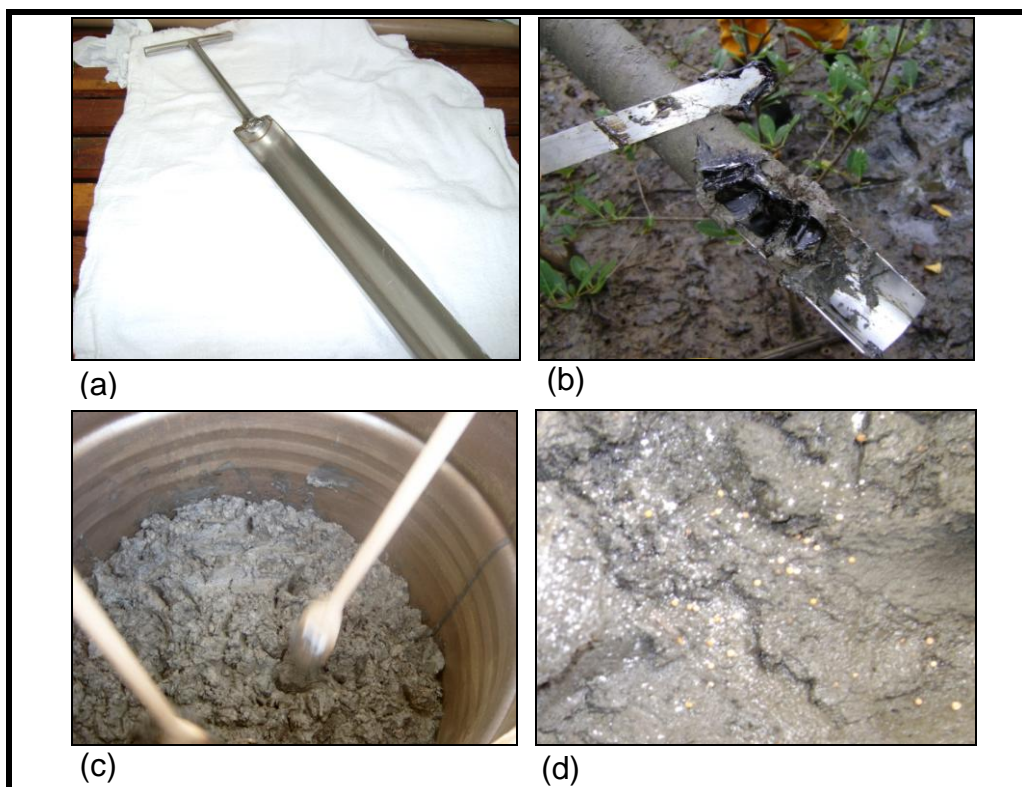


Figura 10 – a) Testemunhador de metal, b) Testemunhador com sedimento contendo óleo, c) Homogeneização do sedimento e d) Detalhe do sedimento com OSMOCOTE.

O NPK é um fertilizante solúvel em água, composto por fosfato monoamônico ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , sulfato de amônia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cloreto de potássio (KCl) e farelo de algodão (LIMA, 2010). O OSMOCOTE também é um fertilizante solúvel, possui a mesma composição se diferenciando por ser do tipo *slow release* (liberação lenta), onde os nutrientes inorgânicos ficam revestidos com materiais hidrofóbicos como parafina ou vegetal.

### 3.2 MONTAGEM E FUNCIONAMENTO DO EXPERIMENTO

O estudo foi simulado em aquários (Figura 11) que consistiam em cubas de vidro contendo 50 cm de altura, 30cm de largura e 40cm de comprimento, cada uma contendo: 08 (oito) provetas de vidros; suporte de madeira para as provetas; uma torneira na parte inferior para drenar a água e 2 (duas) bombas para aeração. A

água para simular a maré foi bombeada diretamente do estuário do rio São Paulo e armazenada em um tanque de 1000L e foi renovada todos os dias de simulação.

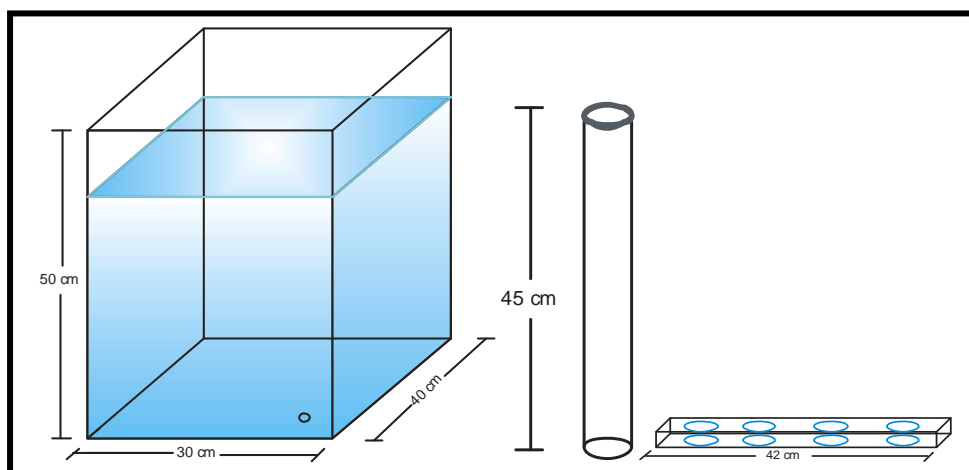


Figura 11 - Figura esquemática mostrando da esquerda para a direita: as dimensões do aquário, da proveta e do suporte de madeira para as provetas.

Após a coleta do sedimento e a separação nas três parcelas (REFERÊNCIA, NPK, OSMOCOTE) procedeu-se à montagem do experimento. Todas as provetas de vidro foram revestidas com sacos de algodão e estes foram presos com braçadeiras de nylon na parte inferior e elástico na parte superior da proveta (Figura 12a). Foram montadas as Unidades de Simulação compostas pelos Aquários REFERÊNCIA, NPK e OSMOCOTE denominados REF, NPK e OSM. Nas unidades referências foi avaliada a atenuação natural do petróleo, e nas unidades de biorremediação, a aceleração da biodegradação do petróleo como resultado da aplicação de nutriente NPK e OSMOCOTE.

### 3.3 MONITORAMENTO DA UNIDADE DE SIMULAÇÃO

A rotina diária de simulação consistiu nas seguintes etapas: ligar o sistema de torneira com uma pequena vazão (simular a subida da maré) proveniente do tanque de armazenamento de água; após atingir o limite do aquário (22 litros) todas as bombas de oxigenação (duas para cada aquário) eram ligadas e contadas duas horas de simulação; depois os parâmetros físico-químicos (salinidade, OD, pH e temperatura) eram mensurados (Figura 12b); por fim os aquários eram esvaziados, também com uma pequena vazão para simular a descida da maré. Os aquários não

eram esvaziados totalmente com o intuito de deixar o sedimento sempre em contato com a água conforme organograma proposto para a simulação (Figura 13).

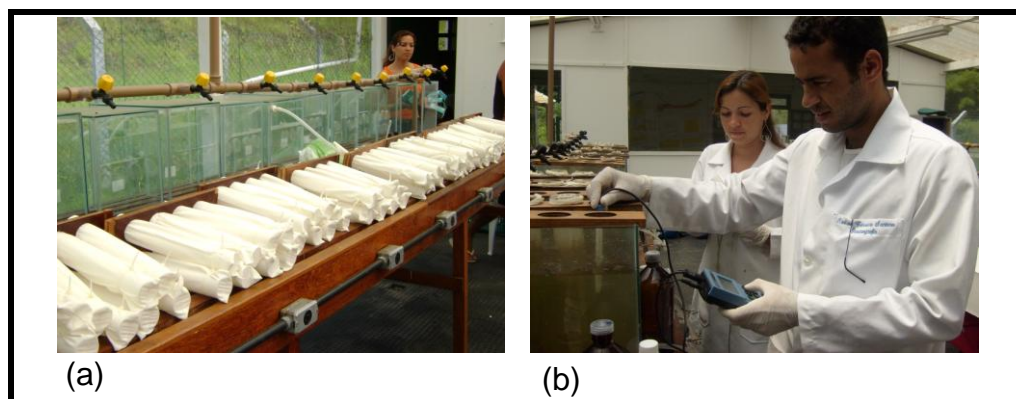


Figura 12 – a) Provetas de vidros revestidas com pano de algodão e com lacre e elástico, b) mensuração dos parâmetros físico-químicos.

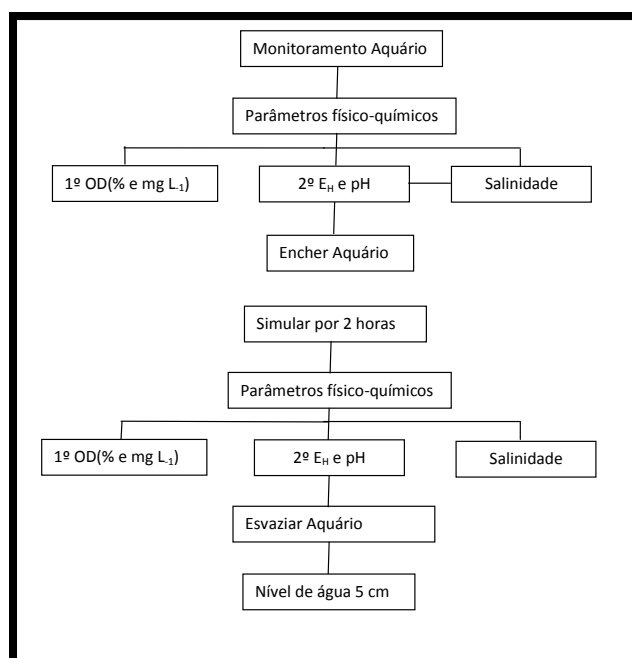


Figura 13 – Organograma mostrando passo a passo do monitoramento que era feito diariamente no Laboratório de Simulação.

A retirada das amostras de sedimento das unidades de simulação foi realizada com intervalo de 1 (tempo inicial), 2, 8, 15, 30, 45, 60, 90 dias (tempo final), o tempo utilizado neste trabalho foi o tempo inicial 1 (05/Set) e tempo final 90 dias (04/Dez). Foram determinados, para esta dissertação, os seguintes parâmetros: biomarcadores saturados ( $m/z=191$  e  $m/z=217$ ), biomarcadores aromáticos (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA) para os compostos íon/carga

( $m/z=192$ ,  $m/z=228$ ,  $m/z=231$ ), amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria.

A coleta das amostras foi realizada após o período de 2 (duas) horas de simulação. Após esse período o aquário era esvaziado lentamente e retirado uma proveta de cada aquário de simulação, essas amostras foram homogeneizadas individualmente, em um recipiente de revestimento inox. Sendo que, para cada triplicata de aquário existia um recipiente diferente com a finalidade de evitar mistura entre as amostras REFERÊNCIA, NPK e OSMOCOTE. Ressalta-se que entre amostras da mesma triplicata os recipientes foram lavados com água do próprio manguezal (ambientação).

As amostras para análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria foram coletadas em recipientes de vidro. Todas as amostras foram acondicionadas a temperatura baixa em caixas térmicas.

Durante os três meses de simulação as unidades foram monitoradas diariamente. Os parâmetros físico-químicos não conservativos (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido) foram mensurados quando a água chegava ao aquário e após 2 horas de simulação com auxílio dos seguintes equipamentos: Refratômetro Hand Refractometer ATAGO modelo S/Mill-E; Condutivímetro Handylab 1, com precisão de  $0,05\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; pH-metro Handylab LF1, com precisão de 0,01 unidade de pH e/ou mVe; Oxímetro WTW OXI 3151, marca SCHOTT-GERATE, precisão de  $0,01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 14).



Figura 14 - Equipamentos utilizados para mensurar os parâmetros físico-químicos. Da esquerda para a direita: refratômetro, condutivímetro, pH-metro e oxímetro.

### 3.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Estudos de Petróleo (LEPETRO) do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA/IGEO/UFBA) para processamento das amostras do sedimento, análises granulométricas e determinação dos nutrientes. A determinação dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$  e  $m/z=217$ ), os biomarcadores aromáticos – HPA ( $m/z=170$ ,  $m/z=192$ ,  $m/z=228$  e  $m/z=231$ ) para avaliar a eficácia do processo de biorremediação foi realizada no Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo-LENEP da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Nos itens seguintes serão descritos os procedimentos realizados nas amostras coletadas no Laboratório de Simulação e no manguezal do estuário do rio São Paulo.

#### 3.4.1 Processamento das Amostras de Sedimentos

Após a coleta, as amostras de sedimentos foram liofilizadas em um Liofilizador L101 da marca LIOTOP com a finalidade de retirar toda umidade. Em seguida a amostra foi macerada, desagregada e peneirada em malha de 2mm.

### 3.4.2 Nutrientes

Foram realizadas análises de carbono orgânico total, nitrato, amônia e fósforo assimilável. As determinações de nitrogênio total, nitrato e amônia foram realizadas segundo o Método de Kjeldahl por via úmida (EMBRAPA, 1999).

#### Nitrato e Amônia

O procedimento utilizado para determinação de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) trocáveis envolve destilação por arraste de vapores contendo MgO e liga de Devarda como forma de nitrogênio mineral. O  $\text{NH}_4^+$  é convertido em amônia ( $\text{NH}_3$ ) que é arrastada por vapores, condensada e depositada em solução avermelhada de ácido bórico. O uso da liga de Devarda tem por finalidade reduzir o nitrato a amônio. A quantificação do N nas formas de amônio e nitrato se dá indiretamente por titulação ( $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,005\text{mol L}^{-1}$ ), via restituição do ácido bórico utilizado na formação de borato de amônio, composto que confere a cor verde-azulada.

Para extração do nitrato e amônia das amostras pesou-se, aproximadamente, 10g de amostra do sedimento em erlenmeyer de 125mL, adicionou-se 100mL de solução de cloreto de potássio  $1\text{mol L}^{-1}$  e agitou-se por 1 h em agitador mecânico. Após, deixou-se em repouso por 1h.

Para determinação de amônio pipetou-se 30mL do sobrenadante límpido, adicionou-se em tubos de digestão com 0,2g de óxido de magnésio e procedeu-se à destilação em destilador de arraste de vapores. Coletou-se o condensado em um erlenmeyer de 125mL contendo 5mL de solução indicadora de ácido bórico 2% (m/v). Em seguida titulou-se com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,005\text{mol L}^{-1}$  até o aparecimento de uma coloração rosa ou lilás.

Para a determinação de nitrato utilizou-se a mesma alíquota de 30mL em tubos de digestão com 0,2g de liga de Devarda. Procedeu-se a destilação por arraste de vapores em um novo elenmeyer com 5mL de ácido bórico 2% (m/v). Em seguida titulou-se com solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,005\text{mol L}^{-1}$  de até o aparecimento de uma coloração rosa ou lilás.

### **Fósforo assimilável**

O método consiste na determinação de ortofosfatos ( $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ), utilizando a Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do visível. O molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio reagem em meio ácido com o ortofosfato para formar um ácido heteropoli - fosfomolibdico que é reduzido pelo ácido ascórbico formando o complexo azul de molibdênio intensamente colorido. A absorvância do complexo é medida espectrofotometricamente a 880nm e é proporcional à concentração de fosfato presente na amostra.

Para a determinação pesou-se em um tubo de ensaio graduado aproximadamente 0,4g de amostra de sedimento, adicionou-se 10mL de HCL  $1\text{mol L}^{-1}$  e agitou-se por 16h em mesa agitadora. Centrifugou-se a amostra por 15min em 3000 RPM. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1mL, adicionou-se 0,8mL de solução ácida de molibdato + tartarato, 10mL de água deionizada e 0,2mL de ácido ascórbico  $25\text{mg L}^{-1}$  e misturou-se. Após 10min de reação fez-se determinação do complexo azul de molibdênio utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular de marca VARIAN CARY 50 PROBE com comprimento de onda de 880nm, usando água como branco. A precisão do método de fósforo assimilável foi calculada através da reprodutibilidade, sendo as amostras feitas em triplicatas.

As análises destes nutrientes são muito importantes, pois em ambientes naturais contaminados por petróleo o carbono (C) deixa de ser o elemento limitante e o nitrogênio e fósforo passam a ter um peso maior, para a sobrevivência e desenvolvimento dos microorganismos degradadores de hidrocarbonetos.

### **3.4.3 Biomarcadores Saturados e Aromáticos (HPA)**

Para a extração, as amostras liofilizadas e desagregadas em gral de ágata. Para realizar a extração pesou-se 10g de sedimento e em um sistema *Soxhlet* (Figura 16) procedeu-se a extração com 150mL de uma mistura de solventes n-hexano e acetona (1:1v/v) por 4hs. Decorrido esse tempo colocou-se o volume do extrato para evaporar em capela e posteriormente pesou-se 0,004g, aproximadamente, desse extrato final (sem solvente) que posteriormente foi misturado com alumina. Transferiu-se a mistura para coluna *clean up* onde as frações dos saturados (F1) foram eluídas com hexano, os aromáticos (F2) foram eluídas com diclorometano (30ml) e os compostos contendo heteroátomos (NOS) foram eluídos com metanol. Depois de evaporadas pesaram-se os béqueres em balança analítica e anotaram-se as massas.



Figura 15 - Sistema *Soxhlet* utilizado na extração dos hidrocarbonetos contidos nos sedimentos retirados dos aquírios de simulação.

Para determinação dos Biomarcadores as amostras foram analisadas em CG/ EM através do modo de monitoramento seletivo de íons (MSI). Para a análise por MSI, foram selecionadas os seguintes íons:  $m/z=217$  para os -esteranos e  $m/z=191$  para terpanos. As condições cromatográficas utilizadas para as análises foram: temperatura 70°C a 170°C com taxa de aquecimento 20°C min<sup>-1</sup>, de 170°C a 310°C com aquecimento de 2°C min<sup>-1</sup> e isoterma de 310°C durante 10 minutos. Por fim realizou-se injeção automática de 1µL da amostra, com impacto de elétrons a 70 eV, utilizando hélio como gás de carreador, a uma pressão constante de 10 psi.



Para o monitoramento das alterações ocorridas nos perfis das famílias dos compostos policíclicos aromáticos (HPA), foram conduzidas, neste trabalho, análises por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM) de acordo com as seguintes condições analíticas:

- Cromatógrafo em fase gasosa Hewlett Packard, modelo 6890.
- Coluna capilar de sílica fundida (HP-DB5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).
- Programação da temperatura: 55°C (2 min); 55 a 190°C (30°C/ min); 190 a 250°C (1,5°C/ min); 250 a 300°C (2,0°C/ min) e 300°C (20 min).
- Espectrômetro de massa Hewlett Packard, modelo 5973.
- Temperatura de interface: 280°C.
- Ionização por impacto de elétrons.
- Energia do feixe de elétrons: 70 eV.
- Varredura por monitoramento seletivo de íons (SIM).

Os íons monitorados, ao longo dos experimentos, na fração de hidrocarbonetos aromáticos foram os íons da família dos policíclicos aromáticos alquilados:  $m/z = 156$  e  $170$  para dimetil e trimetil naftalenos,  $m/z = 178$  e  $192$  para fenantrenos e metil fenantrenos,  $m/z = 180$  para metil fluorenos,  $m/z = 198$  para metil dibenzotiofenos,  $m/z = 228$  para criseno e  $m/z = 231$  e  $245$  para os esteróides triaromáticos. Estes, são os principais compostos utilizados na grande maioria dos estudos com essa temática (degradação).

No Anexo IV encontram-se outras metodologias auxiliares que servem de base para a atual dissertação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NÃO-CONSERVATIVOS

Os parâmetros físico-químicos monitorados foram: temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido (O.D.) na água do canal de maré e na água retida nos aquários de simulação, cujas provetas continham sedimento de manguezal (REF), sedimento de manguezal com NPK (NPK) e sedimento de manguezal com OSMOCOTE (OSM). Eles foram mensurados durante os 90 dias de simulações, sendo que os gráficos apresentados nesse trabalho referem-se ao dia inicial (05 de setembro – 05/Set) e final (04 de dezembro – 04/Dez) do procedimento e as tabelas contemplam as médias, medianas e desvio padrão dos 90 dias de simulações.

O monitoramento diário dos parâmetros físico-químicos nesse experimento durante os 90 dias da simulação se justifica pelo fato que esses parâmetros deveriam ser controlados para fornecer condições adequadas para os microorganismos presentes nos sedimentos se reproduzirem (bioestímulo) e degradar hidrocarbonetos presentes nos aquários. Essa degradação seria aferida por análises das abundâncias relativas das frações dos biomarcadores saturados e os compostos policíclicos aromáticos no início (05/Set) e no término (04/Dez) da simulação (90 dias) para verificar o grau de alteração dos fragmentogramas. Os valores desses parâmetros encontram-se no Anexo I, Anexo II, Anexo III e Anexo IV que servirão de apoio para esta dissertação.

Diversos autores (ATLAS e BARTHA, 1972; ATLAS, 1981; BENTO, 2005) citam que os parâmetros monitorados, juntamente com os nutrientes são os mais importantes para o sucesso da degradação de hidrocarbonetos

#### 4.1.1 Temperatura

A Figura 16 permite analisar as variações de temperatura da água do canal de maré e dos aquários (REF, NPK e OSM), ocorridas durante os dias 05 de setembro (início da simulação) e o dia 04 de dezembro (final da simulação – 90 dias). A média de temperatura no canal do rio São Paulo ficou em torno de 26,6°C, bem próximo aos valores encontrados por Carvalho, (2007) – 29,3°C, por Celino (2007) - 29,9°C e Santana (2008) – 28,8°C. Segundo Ricklefs (2001), temperaturas mais altas significam que os organismos podem se desenvolver mais rapidamente, digerir e assimilar mais alimento, apresentando, assim, efeitos positivos na produtividade biológica. Apesar de biodegradação do óleo ocorrer numa ampla faixa de temperatura, as maiores taxas ocorrem entre 25°C e 35°C, sendo que, em temperaturas acima ou abaixo destas, há prejuízos para este processo (HAIDER, 1999).

As temperaturas dos aquários foram maiores em relação à temperatura do canal do rio São Paulo (Figura 16 e Tabela 2). Segundo Santana (2008) o Laboratório de Simulação por ser uma ambiente artificial e as telhas transparentes favorecem o aumento da temperatura, agindo como uma estufa, principalmente em dias ensolarados.

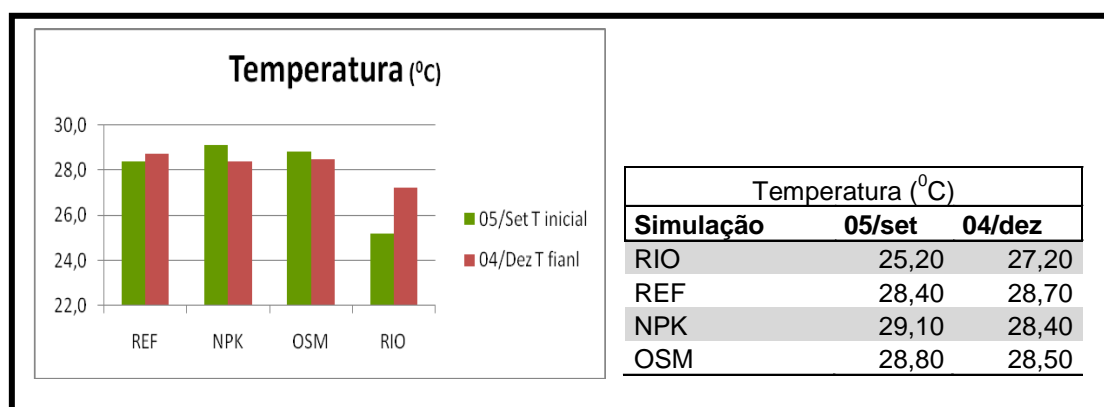


Figura 16 – Variação da temperatura (°C) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação (REF, NPK, OSM). Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

Tabela 2 - Valores da média, mediana e desvio padrão da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) ao longo dos 90 dias de simulação.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	26,60	26,03	1,22
REF	28,90	28,85	1,40
NPK	28,46	28,43	1,45
OSM	28,56	28,69	1,48

#### 4.1.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

A alcalinidade ou a acidez de uma solução é freqüentemente expressa em termos e concentrações de íons  $\text{H}^+$  que é denominada pH. Segundo Esteves (1998), o pH pode ser considerado uma das variáveis mais importantes, pois é um fator limitante à colonização de diferentes organismos aos ecossistemas aquáticos, assim como interfere de diferentes maneiras no metabolismo das comunidades. O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microorganismos, através dos efeitos dos íons  $\text{H}^+$ , na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e de metais pesados, que podem ser tóxicos aos microorganismos (JACQUES et al., 2005).

O gráfico da Figura17 permite analisar as variações de pH da água do canal de maré e das unidades de simulação (aquários REF, NPK e OSM). Os valores de pH (Figura 17) apresentam-se dentro de padrões normais para águas marinhas, variando de 7,0 a 8,0 com uma média de 7,37 para a água estuarina do rio São Paulo, 7,62 para o aquário referência (controle), 7,75 para os aquários NPK e 7,81 para os aquários OSM (Tabela 3). Confirmando a capacidade de tamponamento das águas marinhas, para patamares mais alcalinos (ESTEVES, 1998). Carvalho, (2007), Celino et al. (2007), Santana (2008) obtiveram valores próximos com médias de 7,6 ; 7,0 e 7,7, respectivamente. A Tabela 3 apresenta os valores da média, mediana e desvio padrão para os 90 dias de simulação, os valores dos desvios padrão inferem o baixo grau de alteração desse parâmetro.

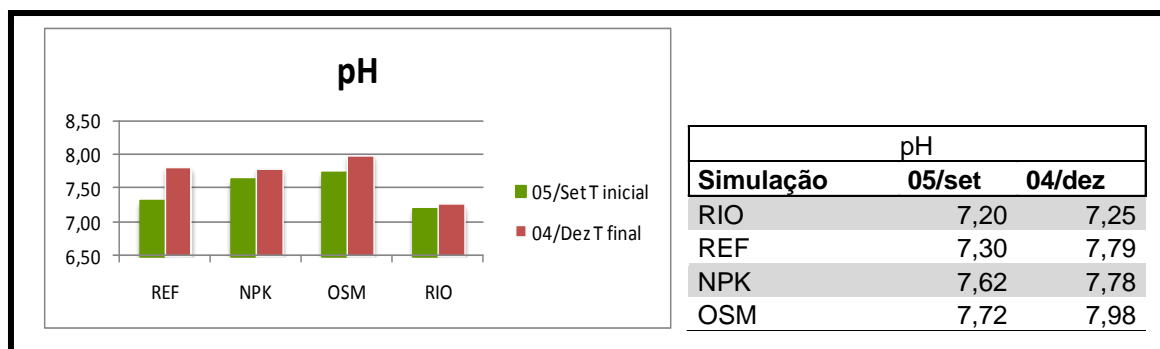


Figura 17 – Variação do pH no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

Segundo Lima (2010), a maior parte dos microorganismos tolera valores de pH na faixa de 5 a 9 e preferencialmente na faixa de 6,5 a 7,5. Quando altas concentrações de compostos orgânicos estão presentes no subsolo com baixa alcalinidade é necessário o controle do pH para que a biodegradação se efetue.

Alguns autores reportam que o pH tem a capacidade de inibir o crescimento dos heterótrofos e degradadores reduzindo as taxa de degradação dos hidrocarbonetos, apontando que um pH entre 5,5 e 8,5 é dado como ótimo para a biodegradação de HTP em solos (HOFFASANM e VIEDT, 1998; VALLEJO et al., 2005).

Tabela 3 - Valores da média, mediana e desvio padrão do pH ao longo dos 90 dias de simulação.

pH			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	7,37	7,37	0,15
REF	7,62	7,67	0,26
NPK	7,75	7,78	0,12
OSM	7,81	7,80	0,10

#### 4.1.3 Salinidade

A média de salinidade no canal de maré ficou em torno de 35,3 (Tabela 4), bem próximo aos valores encontrados por Carvalho, (2007), que variaram em torno de 36,6, por Celino et al. (2007) que obteve uma média de 34,7 e por Santana

(2008) que encontrou uma média de 35,8. O aumento da salinidade nas unidades de simulação com NPK e OSMOCOTE (Figura 18 e Tabela 4) em comparação com as unidades referências pode estar relacionado com o uso de sais nutrientes, tais como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (LIMA, 2010).

Tabela 4 - Valores da média, mediana e desvio padrão para a salinidade ao longo dos 90 dias de simulação

<b>Salinidade</b>			
<b>Simulação</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>
RIO	35,30	35,30	2,10
REF	32,60	32,00	2,40
NPK	34,00	33,00	2,70
OSM	34,50	34,00	3,10

Os valores de salinidades estão compatíveis com os valores de temperaturas, ou seja, uma maior temperatura provoca o aumento da evaporação e um aumento na salinidade (maior concentração de sais). Segundo Britto, (2003), em regiões de manguezal, próximas ao mar, a salinidade é mais elevada e em regiões à montante menos elevada, onde a mistura de águas e interferência marinha são menores.

A pesar de existirem microorganismos que se adaptam a condições de alta salinidade (PETERS e MOLDOWAN, 2005; LIMA, 2010), a alta concentração de sal inibe, na maioria dos casos, a degradação microbiana dos hidrocarbonetos (BORRESEN e RIKE, 2007). Porém nas condições experimentais da simulação realizada neste trabalho as salinidades estão compatíveis com valores normalmente encontrados para os manguezais e a biota degradadora de óleo está adaptada a esta faixa de salinidade, com valores ideais para ambientes de águas salinas, segundo Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005).

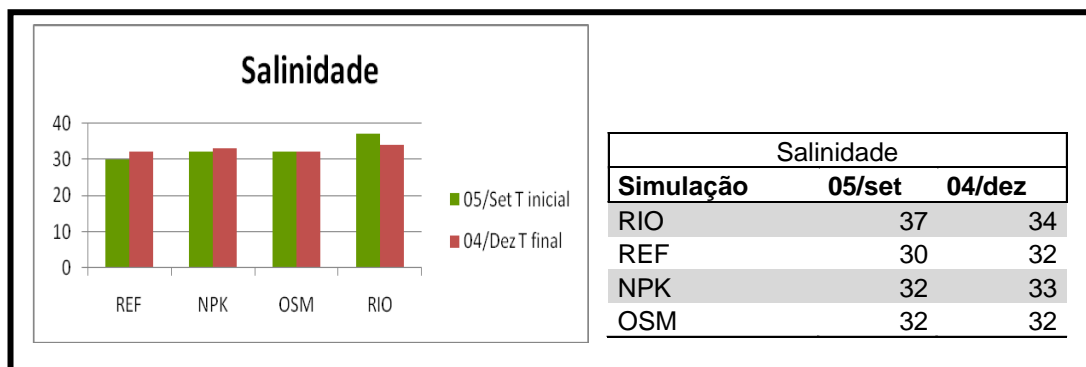


Figura 18 – Variação da salinidade no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

#### 4.1.4 Oxigênio Dissolvido (O.D.)

As principais fontes de oxigênio para o meio aquático são provenientes da difusão exercida pela pressão atmosférica e por processos biológicos das comunidades de fitoplâncton, perifiton e fitobentos. Já as principais perdas são pelo consumo através da decomposição da matéria orgânica, oxidações de íons metálicos, perda para atmosfera e respiração dos organismos aquáticos (ESTEVES, 1998).

A Tabela 5 mostra os valores estatísticos para os aquários (REF, NPK e OSM) e para o rio São Paulo a média dos valores de oxigênio dissolvidos para os aquários REF 7,38 ( $\text{mg L}^{-1}$ ), NPK 7,44 ( $\text{mg L}^{-1}$ ), OSM 7,33 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e para o Rio 6,05 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Tabela 5). Segundo Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) as concentrações de oxigênio dissolvido deverão ser superiores a 6,0 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em águas salinas superficiais. O gráfico da Figura 19 mostra um leve aumento nas concentrações de O.D. no final da simulação (90 dias), esse fato pode estar relacionado com a degradação dos hidrocarbonetos e matéria orgânica nos aquários. Essa situação pode ter provocado uma redução da demanda bioquímica de oxigênio e conseqüentemente redução da necessidade de oxigênio para oxidação da matéria orgânica e a concentração desse elemento conseqüentemente aumentou nos aquários de simulação.

Santana (2008) em seus testes utilizou uma e duas bombas de aeração nas unidades de simulação e concluiu que esta variação não afetou as concentrações de O.D., inferindo que as variações de O.D. podem estar relacionadas aos valores de temperatura, já que o aumento da temperatura reduz a solubilidade do oxigênio na água, provoca também um aumento na intensidade dos processos biológicos, o que acelera o metabolismo dos organismos, acarretando conseqüentemente um maior consumo de oxigênio (CARMOUZE, 1994; ESTEVES, 1998; RICKLEFS, 2001).

Tabela 5 - Valores da média, mediana e desvio padrão para o oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

<b>Oxigênio Dissolvido (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>			
<b>Simulação</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>
RIO	6,05	6,20	0,71
REF	7,38	7,50	0,59
NPK	7,44	7,60	0,49
OSM	7,33	7,33	0,70

De acordo com Mester (1995) um grande número de compostos orgânicos, incluindo o tolueno, são rapidamente degradados sob condições aeróbicas onde o oxigênio serve como aceptor de elétron durante a biodegradação. A falta de oxigênio nas reações de biorremediação é um fator impeditivo (CHAYABUTRA e JU, 2000).

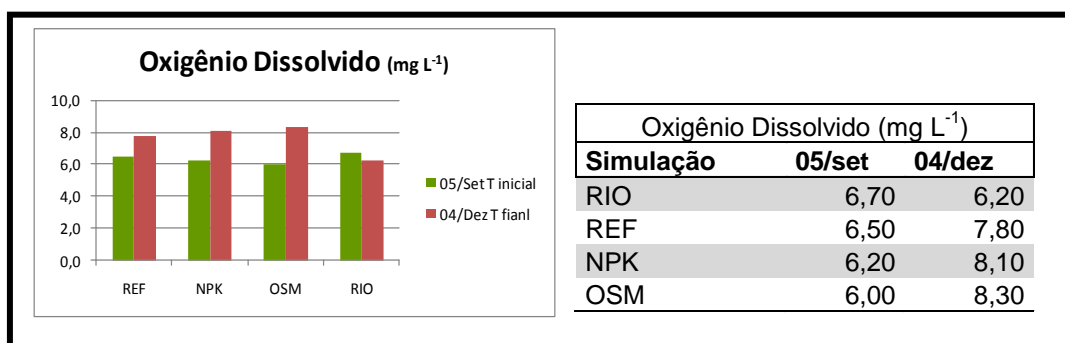


Figura 19 – Variação do oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos, acima abordados, mostraram-se adequados para o desenvolvimento de microorganismos responsáveis pela biodegradação dos contaminantes, não comprometendo, portanto, o processo de biorremediação.



## 4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INORGÂNICOS (NUTRIENTES)

Os nutrientes monitorados durante o experimento foram os teores dos íons de fósforo, amônio e nitrato, em amostras de sedimento extraídas das provetas dos aquários de simulação (REF, NPK, OSM), durante o início (05/Set) e término (04/Dez) do experimento. Foram analisadas concentrações desses nutrientes nas amostras de manguezal para servir de *background*.

### 4.2.1 Fósforo

A Figura 20 mostra as concentrações de fósforo para as unidades de simulação. Percebe-se que no aquário REF diminuiu a concentração de fósforo ao longo dos 90 dias de simulação, isso já era esperado, pois não foi adicionado nenhum tipo de nutriente nesse aquário e pela dinâmica do experimento os nutrientes teoricamente deveriam reduzir, pois estariam sendo consumidos pelos microorganismos degradadores de hidrocarbonetos. Os nutrientes em certos ambientes costeiros são escassos e a ausência principalmente de fósforo biodisponível pode provocar a redução da população microbiana, dificultando assim o processo de degradação do óleo (LEAHY e COLWELL, 1990; PRINCE, 1993).

O gráfico e a tabela auxiliar da Figura 20 mostram um aumento da concentração de fósforo no aquário NPK e uma redução no final de 90 dias de simulação. Isso se deve a alta solubilidade do fertilizante NPK e a contribuição da retirada do fósforo após as duas horas de simulação, pois todos os aquários eram esvaziados e parcelas dos nutrientes eram retiradas do sistema. Porém, para os aquários que foram adicionados o fertilizante OSMOCOTE (OSM) nas provetas com sedimento conseguiram aumentar a concentração do fósforo ao longo do experimento, chegando no 90º dia de simulação com uma concentração de fósforo assimilável de 138,43 mg Kg<sup>-1</sup>. Esses resultados demonstrando que os fertilizantes de liberação lenta (*slow release*) tipo OSMOCOTE, são capazes de fornecer

nutrientes (nitrogênio e fósforo) de forma contínua por mais tempo e pode ser adotado para experimento mais duradouros.

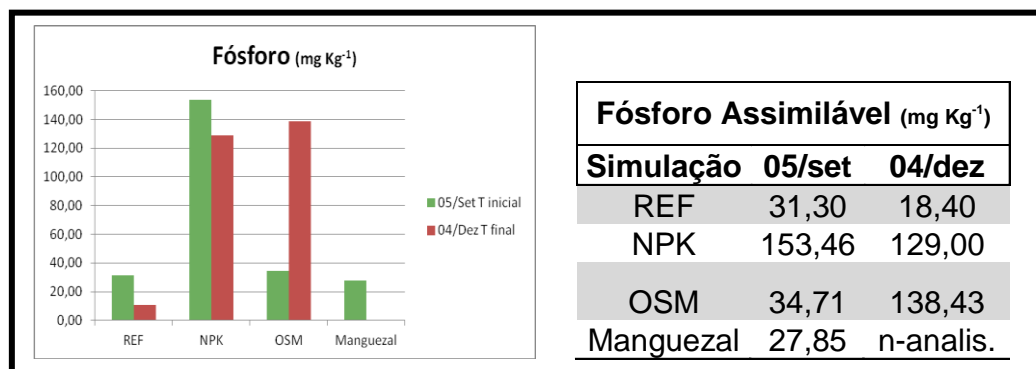


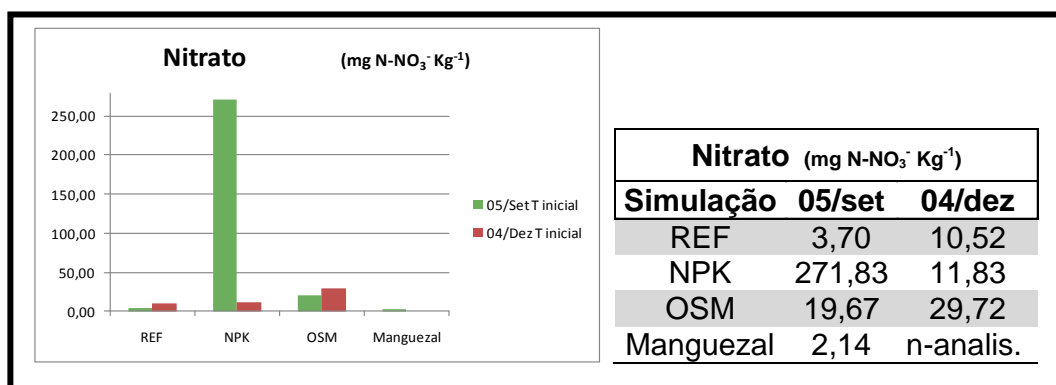
Figura 20 – Variação do fósforo (mg Kg<sup>-1</sup>) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

#### 4.2.2 Nitrato

Os teores para os íons nitrato nas unidades referências variaram ao longo do experimento entre 1,66 á 32,19 mg N-NH<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> (Anexo II) Pela Tabela 6 pode-se inferir que a média dos valores de nitrato para os aquários NPK foram os maiores. Porém a Figura 21 mostra uma redução significativa nos teores deste elemento no final da simulação (04/Dez). Segundo Vallejo et al., (2005) essa redução pode estar relacionada também com a solubilização do nitrato que é maior nesse tipo de fertilizante e em conseqüência disso é assimilado mais rapidamente pelos microorganismos degradadores. Os aquários com OSMOCOTE (OSM) tiveram um aumento nas concentrações de nitrato ao longo da simulação conforme verificado na Figura 21, partindo de uma concentração de 19,67 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Kg<sup>-1</sup> (tempo inicial – 05/Set) e atingindo a concentração de 29,72 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Kg<sup>-1</sup> (tempo final – 04/Dez). Porém, inferior às concentrações de nitratos do aquário NPK.

Tabela 6 - Valores de média, mediana e desvio padrão para nitrato ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{Kg}^{-1}$ ).

<b>Nitrato (<math>\text{mg N-NO}_3^- \text{Kg}^{-1}</math>)</b>			
<b>Simulação</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Manguezal	2,01	2,07	0,18
REF	9,00	7,96	4,70
NPK	123,00	100,97	108,21
OSM	31,04	31,04	12,36

Figura 21 – Gráfico da variação do nitrato ( $\text{mg N-NO}_3^- \text{Kg}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

A influência da adição de nutrientes na biodegradação de um óleo cru foi estudada em microcosmos adicionados ou não de fertilizantes com duas concentrações distintas de nutrientes: alta ( $3000 \mu\text{g N}$ ,  $450 \mu\text{g P}$  e  $1500 \mu\text{g K}$  por quilo de solo seco) e baixa ( $850 \mu\text{g N}$ ,  $85 \mu\text{g P}$  e  $240 \mu\text{g K}$  por quilo de solo seco). O autor observou que a adição de nutrientes no solo propiciou uma maior remoção de hidrocarbonetos em ambas as condições, além de estimular os microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo. Porém, este estímulo teve um limite, pois nas concentrações mais altas de nutrientes, foi observado um efeito inibitório na microbiota. Ao final de 90 dias de experimento, para a alta concentração de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 91, 75 e 37%, respectivamente. Enquanto que para as baixas concentrações de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 100, 85 e 57% (CHAINEAU *et al.* 1999).

### 4.2.3 Amônio

A Figura 22 mostra os valores do íon amônio para manguezal, aquários REF, NPK e OSM, pode-se observar que os teores de amônio nas unidades de simulação têm semelhanças com o comportamento apresentado pelos valores de nitrato (Figura 21) com uma concentração maior para o amônio em relação ao nitrato. Segundo Vallejo et al., (2005) a menor concentração do nitrato em relação às concentrações de amônia sugere que esta possa ser a fonte principal de nitrogênio neste experimento. Analisando a Figura 22, percebe-se que o comportamento do íon amônio foi parecido com o comportamento do nitrato (Figura 21) que pode está relacionado com a adição dos fertilizantes (NPK e OSMOCOTE) ao sistema. A Tabela 7 mostra um elevado valor do desvio padrão ( $132,42 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ) para o aquário com OSMOCOTE, isso está relacionado ao fato, que ao longo da maior parte da simulação (90 dias) o teor desse nutriente esteve elevado, porém nas últimas semanas a redução foi muito brusca (Anexo II), isso acarretou as mudanças no desvio padrão. Já para o aquário de simulação com OSMOCOTE os teores de amônio aumentaram gradativamente durante todo o experimento, demonstrando, mais uma vez, essa capacidade *slow release* do fertilizante OSMOCOTE (Figura 22). Os valores obtidos para média, mediana e desvio padrão se encontram na Tabela 7.

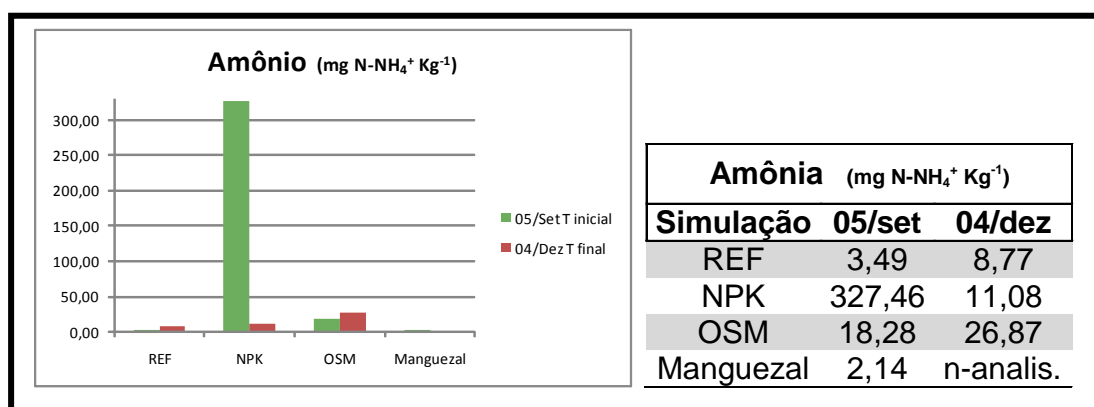


Figura 22 – Variação da amônia ( $\text{mg.N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ ) no canal rio São Paulo e nos aquários da Unidade de Simulação. Tabela auxiliar com os valores relativos ao tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) de simulação que estão plotados no gráfico.

Alguns autores sugerem que em sistemas abertos pode haver deficiência nos teores de nutrientes o que pode resultar na inibição do processo de biodegradação (LINDSTROM et al., 1991; FURNAS, 1992 apud HOFF, 1993; BRAGG, 1992 apud RYTKONEN et al., 1997), fato que pode ser observado pelas baixas concentrações dos nutrientes no aquário REF e no manguezal (*background*).

Tabela 7 - Valores da média, mediana e desvio padrão para amônia (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>).

Simulação	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )		
	Média	Mediana	Desvio Padrão
Manguezal	2,36	2,25	0,54
REF	7,80	5,85	4,23
NPK	141,35	100,92	132,42
OSM	28,60	28,16	11,36

#### 4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS GEOQUÍMICOS

Veiga (2003) caracterizou as fontes de óleos da região norte da BTS como sendo óleo de origem de ambiente lacustre com rocha geradora siliciclástica de idade pré-aptiana, características semelhantes ao óleo produzido na Bacia do Recôncavo. Estudo realizado por Lima (2010) sugere que as amostras de substratos analisadas na sua dissertação, coletadas para a parte norte da BTS, incluindo amostras do estuário do rio São Paulo, tenham origem em ambiente lacustre, característico de óleos da Bacia do Recôncavo.

Pelas características geoquímicas encontradas nos fragmentogramas das frações saturadas m/z=191 e m/z=217 para óleo da Bacia do Recôncavo (Figura 23) apresentado por Veiga (2003), percebe-se similaridades com os fragmentogramas da Figura 26, confirmando que o óleo encontrado nos sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo é oriundo de óleo da Bacia Recôncavo, em estágios diferentes de degradação (Figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31 )

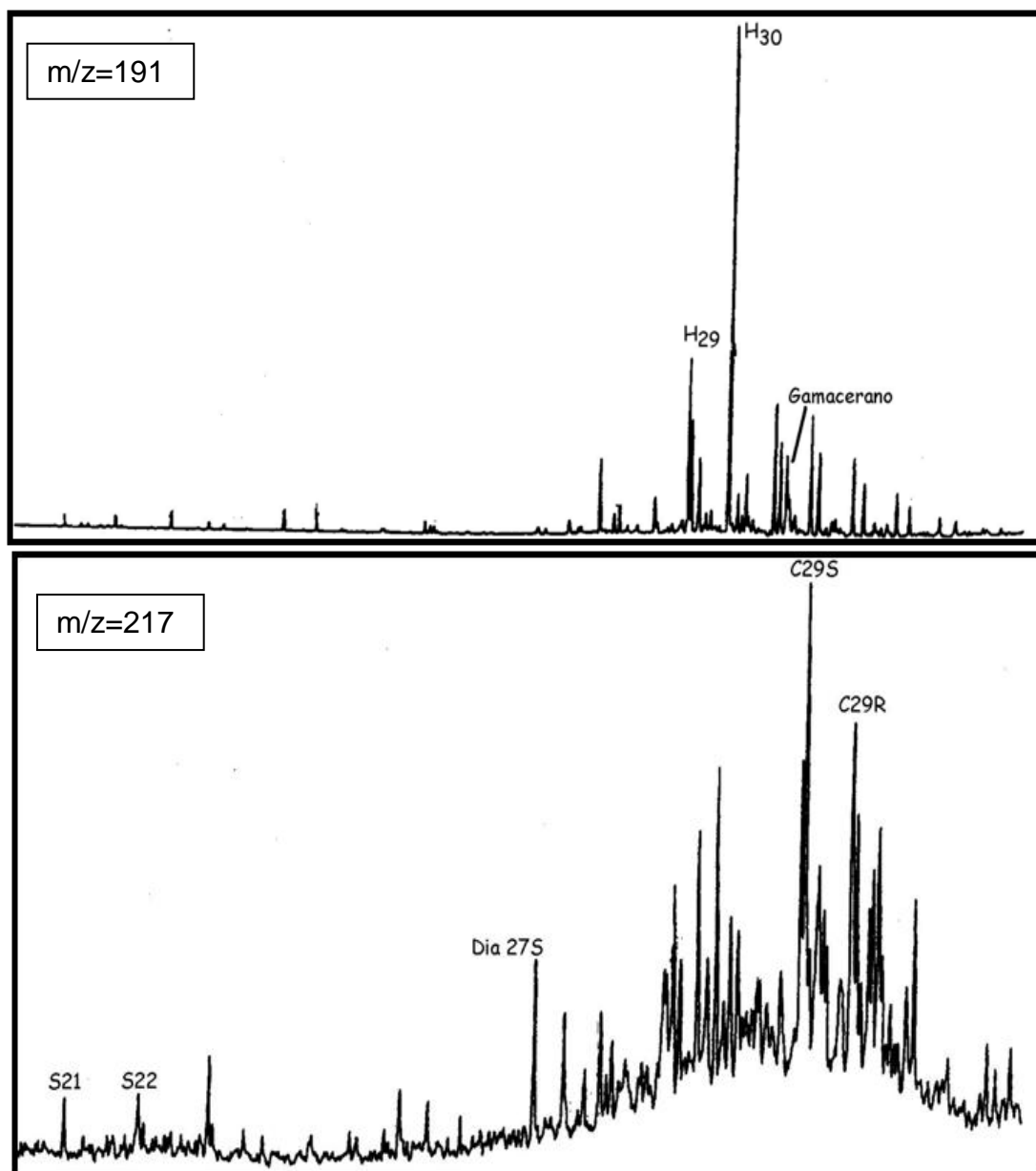


Figura 23 - Características geoquímicas do petróleo produzido na Bacia do Recôncavo para os fragmentogramas  $m/z=191$  (parte superior) e  $m/z=217$  (parte inferior). Fonte:VEIGA, 2003.

#### 4.3.1 Cromatografia Líquida

A análise da biodegradação depende da distribuição inicial das classes de hidrocarbonetos em termos de saturados, aromáticos e NSO (ROSA, 2001). Assim, a quantificação dessas frações ao longo da simulação, efetuada pela cromatografia líquida, torna-se importante na avaliação da biodegradação.

Através da cromatografia líquida, observou-se uma redução relativa na fração dos hidrocarbonetos saturados e um enriquecimento relativo em compostos polares (NSO), em todas as unidades de simulação, conforme verificado na Figura 24. Para os aquários REF, NPK, OSM e a amostra extraída do manguezal (*background* apresentada também na Figura 24) percebe-se um distanciamento entre as amostras, dentro do diagrama triangular, esse fato pode caracterizar óleo em diferentes estágios de degradação. Indicando que cada aquário, teoricamente, possui situações distintas para o tempo inicial da simulação (Figura 24). Esse fato pode ser explicado pela heterogeneidade inicial do sedimento do manguezal. Por mais, que os sedimentos tenham sido homogeneizados durante a montagem do experimento, algumas frações poderiam conter pequenas quantidades de óleos em diferentes estágios de degradação e/ou a homogeneização poderia ter provocado processo de diluição para algumas amostras.

Segundo Killips e Killips (1993) essas alterações no petróleo produzem mudanças em sua composição química, causando aumento na densidade do óleo, talvez não somente em função do desaparecimento progressivo da fração mais leve, mas também pelo aumento da concentração de asfaltenos ou heterocomponentes (NSO) existentes, durante a atividade microbológica.

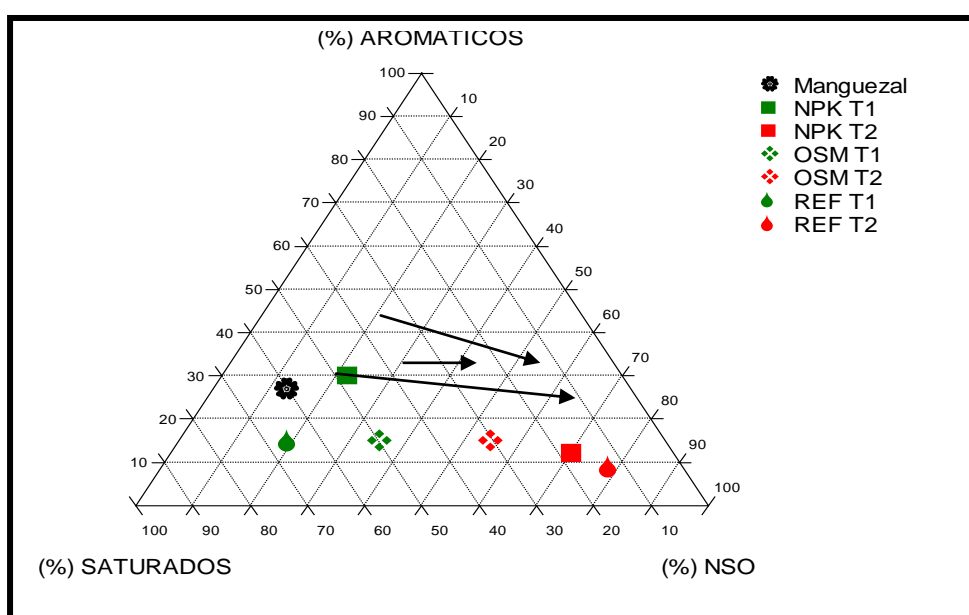


Figura 24 – Diagrama Ternário das amostras de simulação para os tempos inicial (T1) e final (T2) e para amostra do manguezal (*background*), REF, NPK e OSM com as setas indicando a rota dentro do diagrama.

### 4.3.2 Análises do Biomarcadores Saturados $m/z=191$ e $m/z=217$

- **Triterpanos  $m/z=191$**

A classe de compostos dos terpanos ( $m/z=191$ ) fornece uma vasta gama de informações a respeito de óleos, sedimento e estágio de degradação. Segundo Minguzzi (1997) muitos terpanos em óleo são provenientes de membranas lipídicas de bactérias (procarióticas). Nos compostos dessa classe incluem-se os tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos (hopanos). A presença de bactérias em todos os ambientes deposicionais faz com que os terpanos estejam presentes em praticamente todos os óleos. A Figura 25 mostra a estrutura representativa do terpano pentacíclicos mais abundante (hopanol) e de seus precursores o bacteriohopanotetrol.

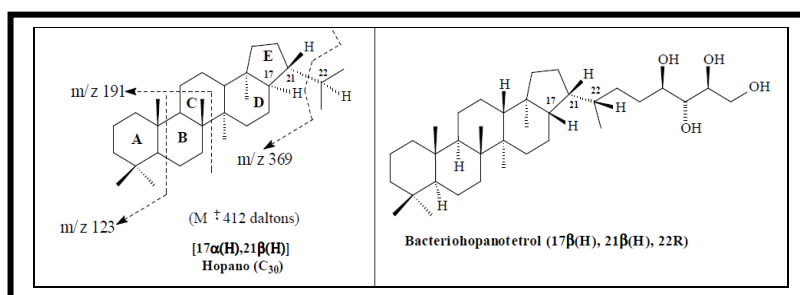


Figura 25 - Estrutura representativa dos terpanos pentacíclicos (Hopano) e do Bacteriohopanotetrol. Fonte: SILVA, A., 2008.

As análises em GC/EM dos terpanos foram feitas na fração saturados (Fração 1) utilizando o monitoramento dos biomarcadores íons/cargas ( $m/z=191$ ). Teve como objetivo identificar esses compostos e inferir estágios de degradação ao longo dos 90 dias de simulação.

O íon/carga ( $m/z=191$ ) obtido das amostras (REF, NPK, OSM) revelou a presença de terpanos tricíclicos e pentacíclicos com uma abundância relativa considerada (Figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31). Esta classe de composto apresentou-se qualitativamente parecida entre as amostras dos aquários (REF, NPK, OSM) que pode ser indicativo de óleos de mesma origem (Bacia do Recôncavo), porém em estágios diferentes de degradação, que podem ser visualizados pelas abundâncias relativas dos diferentes picos deste íon que se repetem em todos os aquários.



Sendo os aquários REF no início do experimento com os picos mais pronunciados (Figuras 26 e 27). Conforme exposto anteriormente, essa diferença no tempo inicial para os aquários pode estar relacionada à homogeneização das amostras e processos de diluição provocados pela maneira como foi homogeneizada.

Após os 90 dias de simulação, os aquários tiveram respostas distintas. Nos aquários que foram adicionados o nutriente NPK obteve-se uma redução bem pronunciada dos picos (Figuras 28 e 29), observando-se especialmente maior efeito na série dos homopanos (terpanos pentacíclicos). O aquário REF teve um comportamento similar ao aquário com NPK, porém a degradação menos pronunciada (Figuras 27 e 29). Os aquários com OSMOCOTE tiveram uma redução muito pequena da abundância relativa, ou seja, não teve um processo de biodegradação eficiente se comparado com os aquários NPK e REF (Figuras 30 e 31).

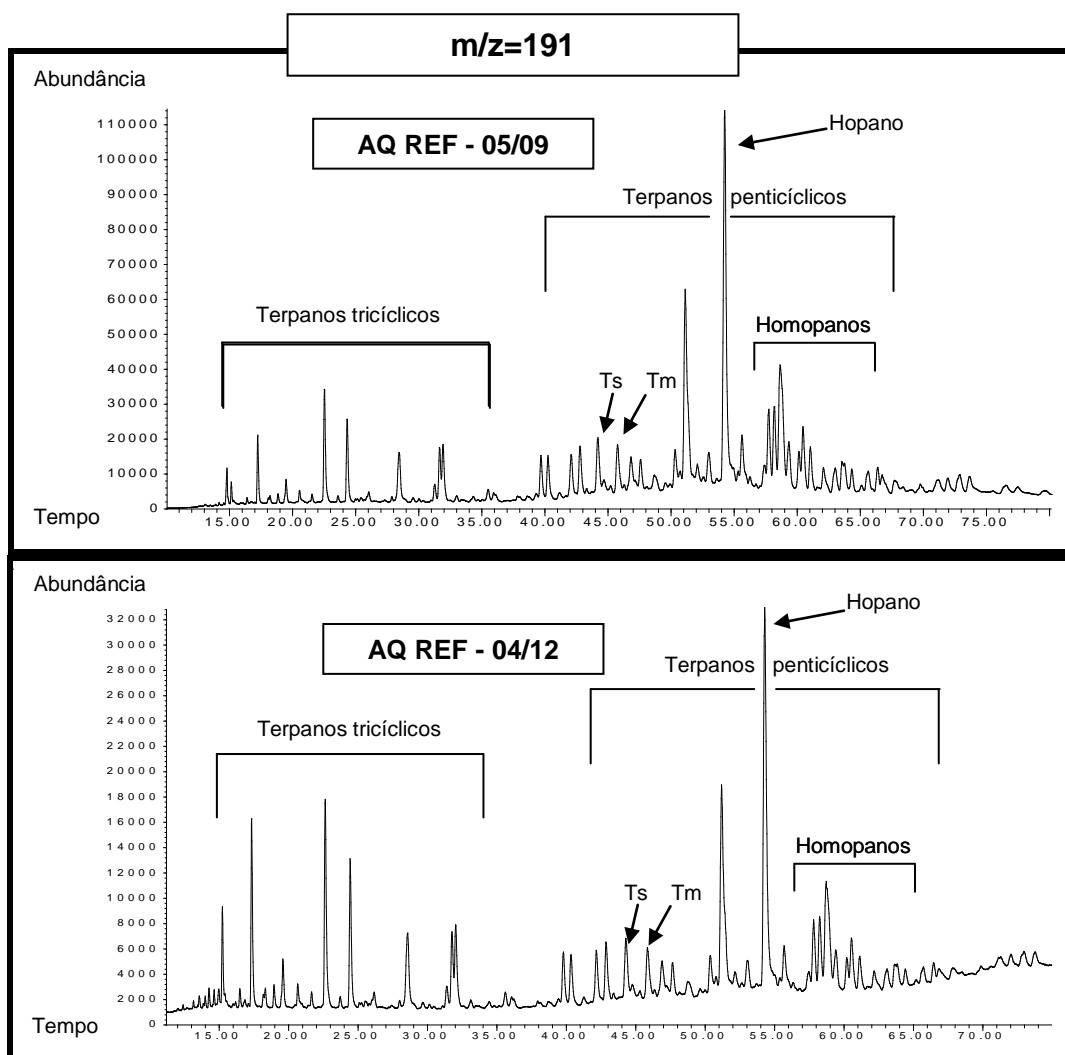


Figura 26 – Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos penticíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário REF nos tempos inicial (05/09) e final (04/12).

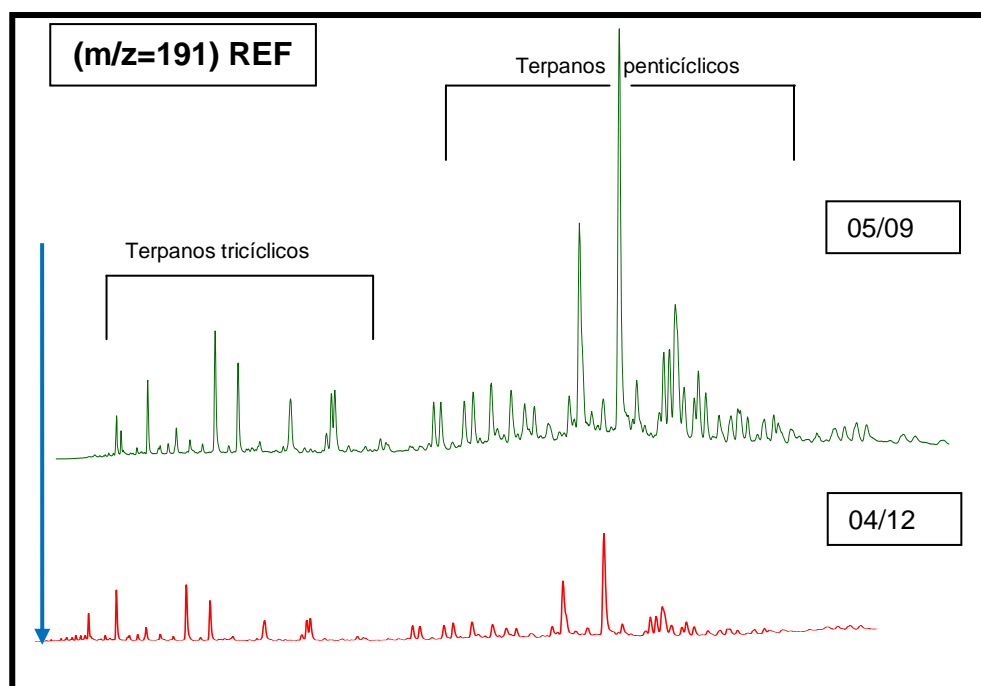


Figura 27 - Fragmentograma projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos (hopano pico de maior abundância), para o Aquário REF nos tempos inicial (05/Set) e final (04/Dez). A seta indica o sentido da degradação.

Podemos sugerir que as amostras estudadas nos aquários REF e NPK sofreram um processo significativo de biodegradação dos compostos pentacíclicos (hopanos), elevando a abundância relativa dos terpanos tricíclicos, fato que pode ser visualizado pelo aumento da razão Tricíclicos/Pentacíclicos (T/P) ao longo do tempo inicial e final da simulação (Tabela 8). Peters e Moldowan (2005) relataram que a razão de ácidos terpanóicos tricíclicos para os pentacíclicos (hopanóicos) é um indicador sensível do grau de biodegradação de óleos, devido à maior resistência dos ácidos tricíclicos relativo aos ácidos hopanóicos, uma vez que a razão aumenta com a biodegradação.

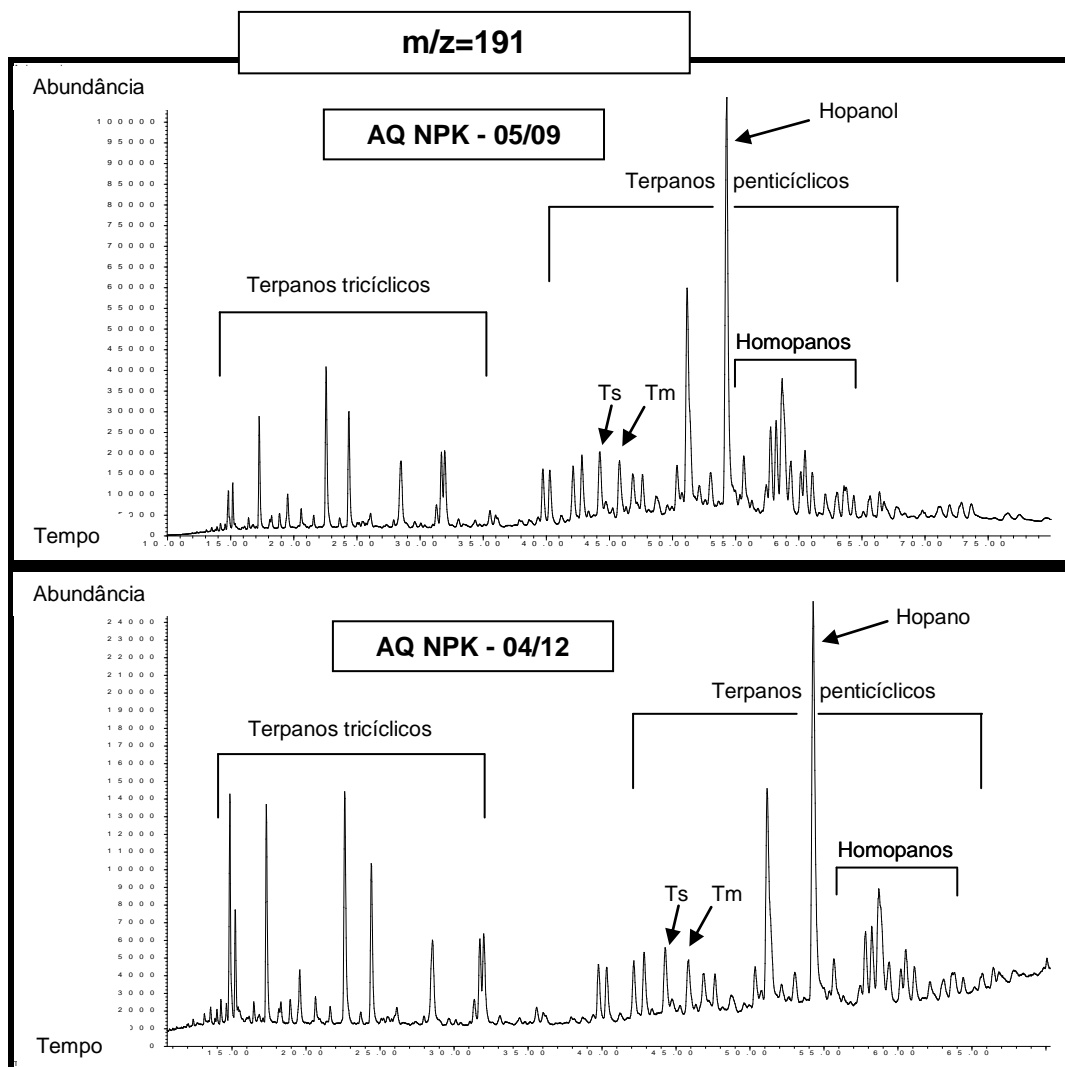


Figura 28 - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos penticíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário NPK nos tempos inicial (05/09) e final (04/12).

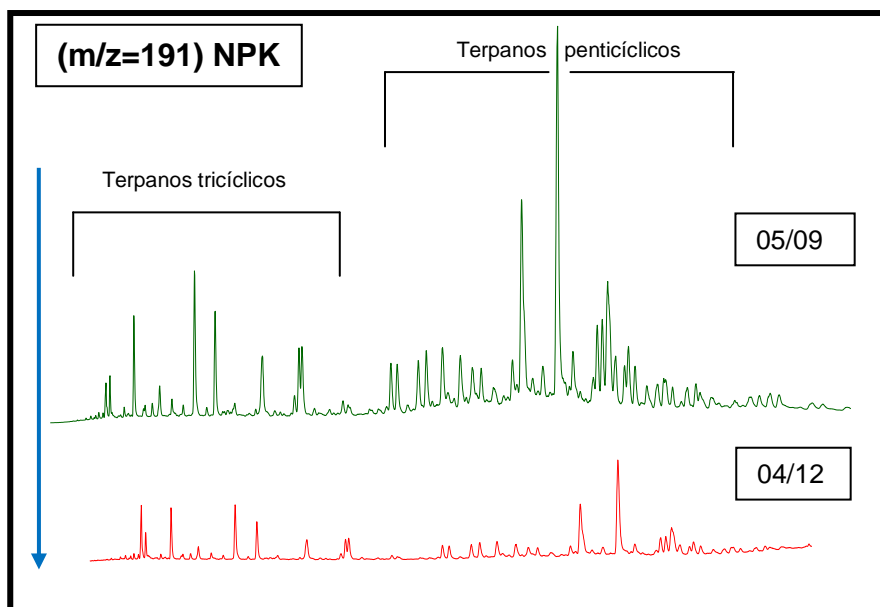


Figura 29 - Fragmentograma projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos, para o Aquário NPK nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). A seta indica o sentido da degradação, perceptível pelas abundâncias relativas dos picos (altura).

Tabela 8 – Valores do pico mais relevante dos tricíclicos (T) e do pico mais relevante dos pentacíclicos (hopano) (P), razão desses dois picos (T/P) e os valores do Ts e Tm para os Aquários REF, NPK e OSM para o tempo inicial e final da simulação.

(05/Set)	Tricíclicos (T)	Pentacíclicos (P)	T/P	Ts	Tm
REF	24000	104000	0,231	16000	14000
NPK	40250	101500	0,397	15750	12250
OSM	22858	62857	0,364	9143	8000
<b>(04/Dez)</b>					
REF	16800	30240	0,556	4480	3920
NPK	13200	22800	0,579	4000	3200
OSM	25200	39710	0,635	7636	6109

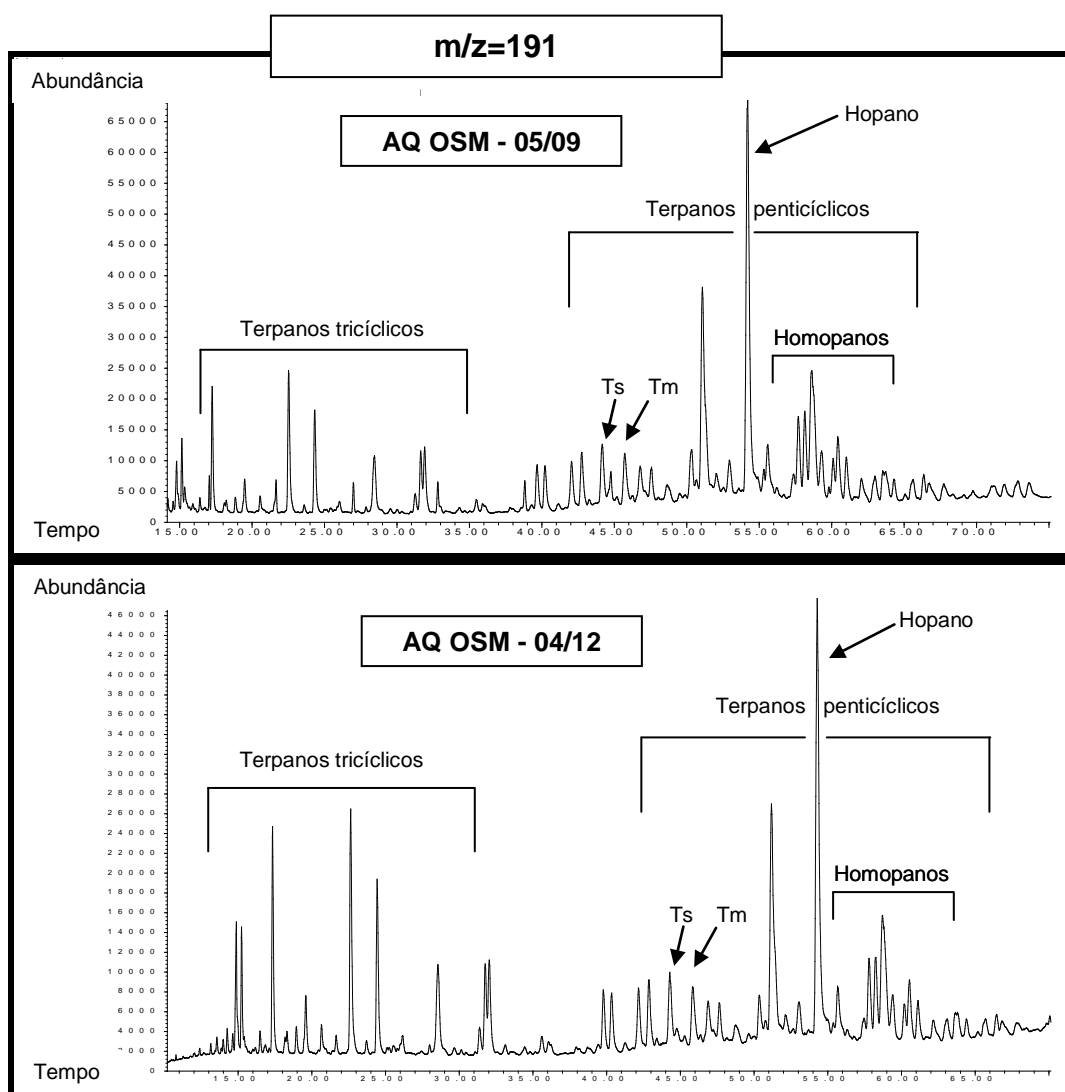


Figura 30 - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos com ênfase no Hopano, para o Aquário OSM nos tempos inicial (05/09) e final (04/12).

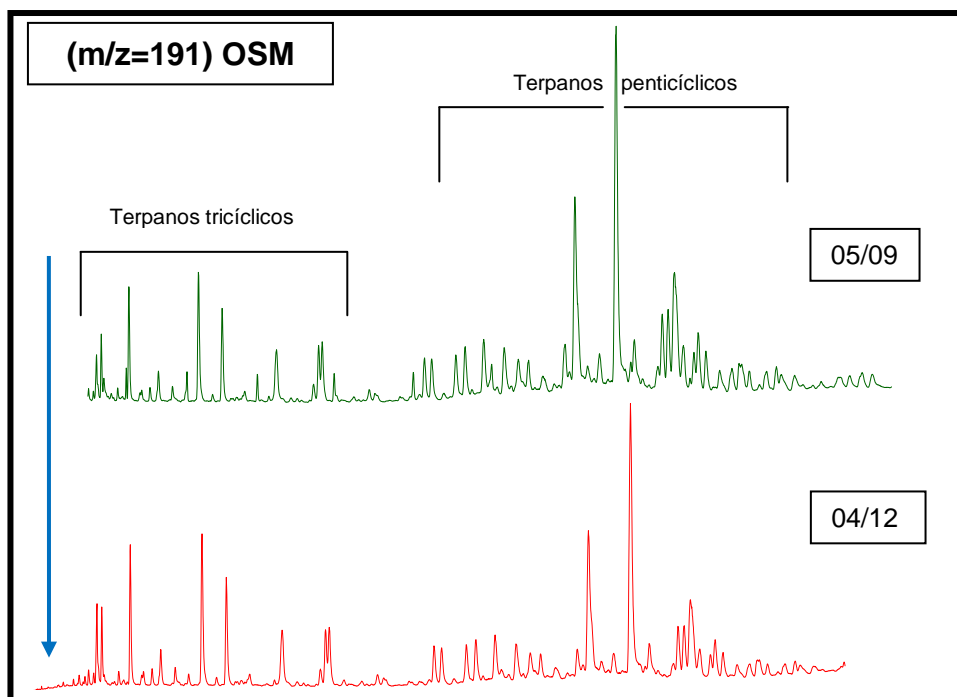


Figura 31 - Fragmentogramas projetados na mesma escala para os biomarcadores saturados ( $m/z=191$ ) mostrando a séries homólogas dos terpanos tricíclicos, dos terpanos pentacíclicos, para o Aquário OSM nos tempos inicial (05/09) e final (04/12). A seta indica o sentido da degradação.

Outros terpanos pentacíclicos hopanóicos de grande importância geoquímica também foram detectados, como por exemplo, os do tipo  $C_{27}$  - 18(H)-trisorneohopano (Ts, isômero geológico rearranjado) e  $C_{27}$  - 17(H)-trisorhopano (Tm, isômero biológico), representado na Figura 32. A relação Ts/Tm é um parâmetro que pode fornecer informação sobre a origem e a maturação de amostras de óleos, pois o Ts é termicamente estável sendo um indicador de fonte e o Tm é um composto natural e pode rearranjar-se para Ts quando submetido à pressão e temperatura durante o processo de catagênese ou em processos de degradação (PETRES e MOLDOWAN, 2005; SILVA, A., 2008).

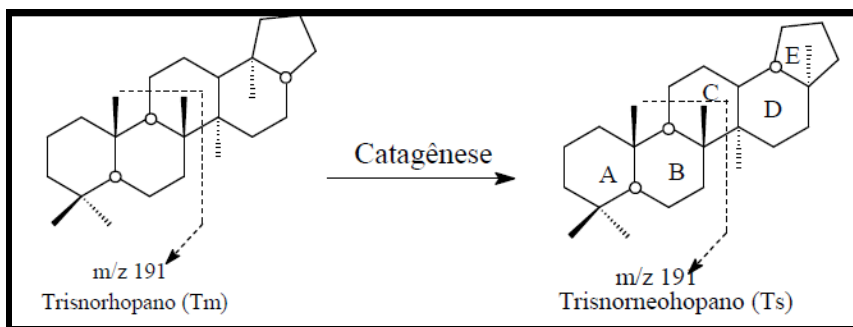


Figura 32 – Processos representativos da transformação de Tm em Ts durante o processo de maturação. Fonte: modificado de PETERS e MOLDOWAN, 2005.

Pelos valores de Ts e Tm das amostras extraídas dos aquários (Tabela 8) percebe-se nitidamente uma redução de ambos os compostos ao longo do 90 dias de simulação, sendo que nos aquários com NPK e OSM a redução do Tm em relação ao Ts foi mais pronunciada. Conforme autores citados no parágrafo anterior, esse fato pode ser indicativo de degradação.

- **Esteranos m/z=217**

Esteranos e diasteranos são classes de compostos comumente encontrados em óleos e sedimentos. Constituem um grupo de biomarcadores vastamente utilizados em estudos de correlação de óleos, como indicadores de fonte e evolução térmica (BROCKS, 2003; PETERS e MOLDOWAN, 2005). Estes compostos são formados a partir da redução de esteróis largamente distribuídos na constituição das plantas superiores, animais e algas e, conseqüentemente foram incorporadas aos sedimentos durante o processo de decomposição da matéria orgânica (PETERS e MOLDOWAN, 1993).

Os esteranos foram monitorados através do íon/carga (m/z=217) ao longo dos 90 dias da simulação, objetivando inferir estágio de biodegradação no final do experimento. Analisando os fragmentogramas (m/z=217) para os aquários REF, NPK e OSM percebe-se que em todos os aquários, para este composto, encontra-se em estágio avançado de degradação, fato que pode ser verificado na ondulação na base do fragmentograma, denominada “*hump*” (Figuras 33 e 34), relaciona-se à MCNR – mistura complexa não resolvida ou *UCM - unresolved complex mixture*,



geralmente considerada uma mistura de vários compostos de estruturas complexas (isômeros estruturalmente complexos, homólogos de estrutura ramificada e cíclica), que não podem ser resolvidos por cromatografia gasosa dada a complexidade química desses compostos (VEIGA, 2003). Essa feição também pode indicar baixa concentração da amostra injetada.

O aquário REF que simula a atenuação natural foi mais eficiente na degradação da fração do íon/carga ( $m/z=217$ ) em comparação ao aquário OSM (Figura 34 e 35). Isso pode ser explicado pelas características do OSMOCOTE que tem uma liberação lenta e contínua dos nutrientes e um tempo de resposta mais demorado, se comparado ao tempo de simulação desse experimento.

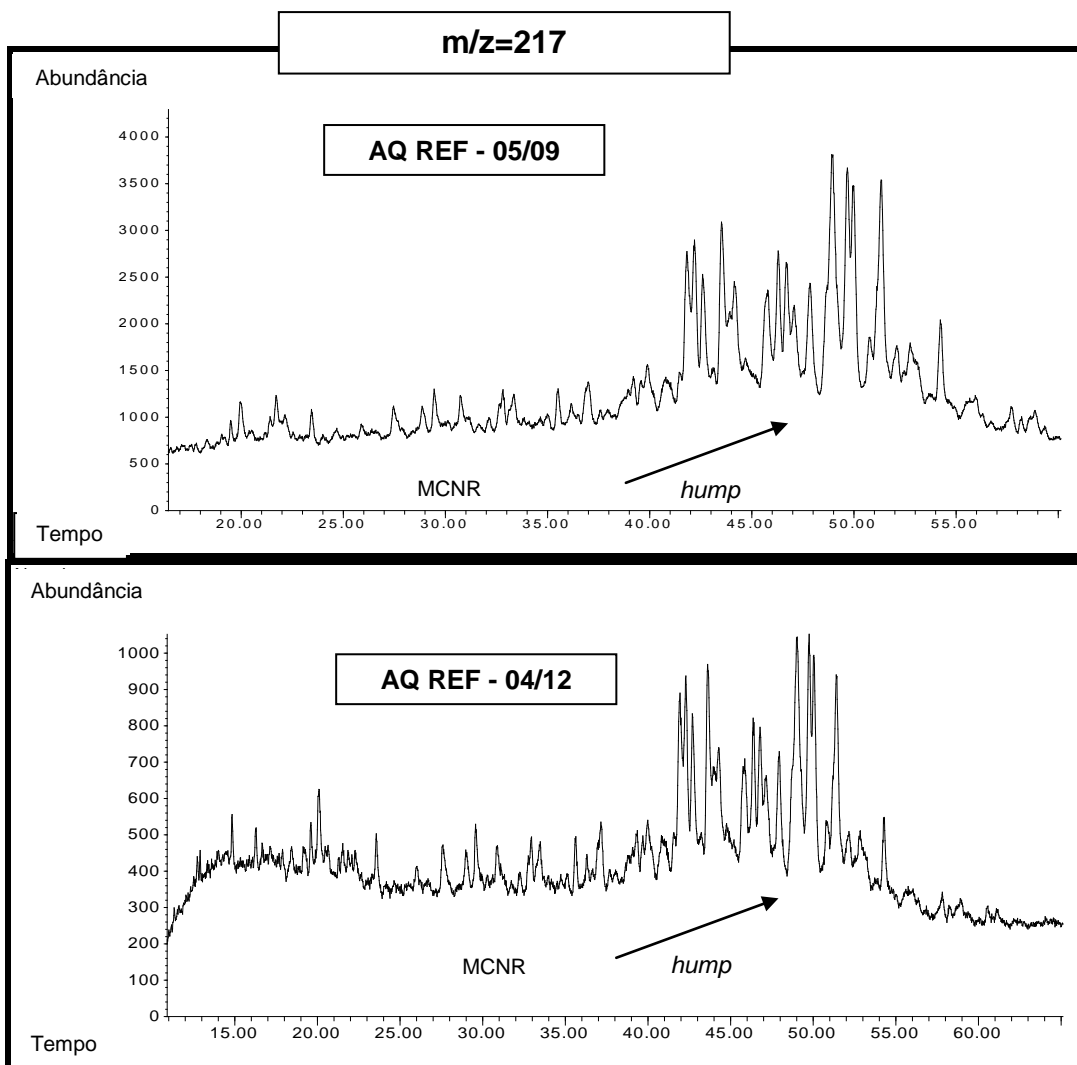


Figura 33 - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR que provoca uma elevação na linha de base (*hump*). Esse *hump* é indicado de degradação que já é visível no primeiro dia do experimento para todos os aquário, principalmente o REF.

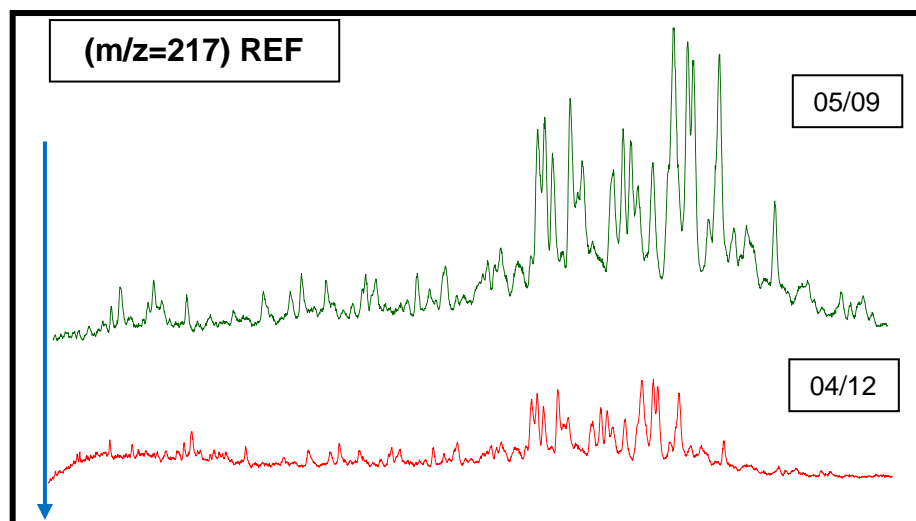


Figura 34 - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do  $m/z=217$  para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário REF mostrando um aumento de degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta), que pode ser visualizado pelas reduções relativas dos picos.

A comparação entre o tempo inicial e final (Figuras 34, 36 e 38) da simulação demonstra que para os aquários NPK a redução dos picos foi mais pronunciada, fato semelhante ao ocorrido com íon/carga ( $m/z=191$  triterpanos), comentado anteriormente. Isso pode ser indicativo que para esses tipos de compostos o nutriente a base de NPK é mais eficiente se comparados com a atenuação natural (REF) e com os aquários com nutrientes (*slow release*) como o OSMOCOTE (OSM).

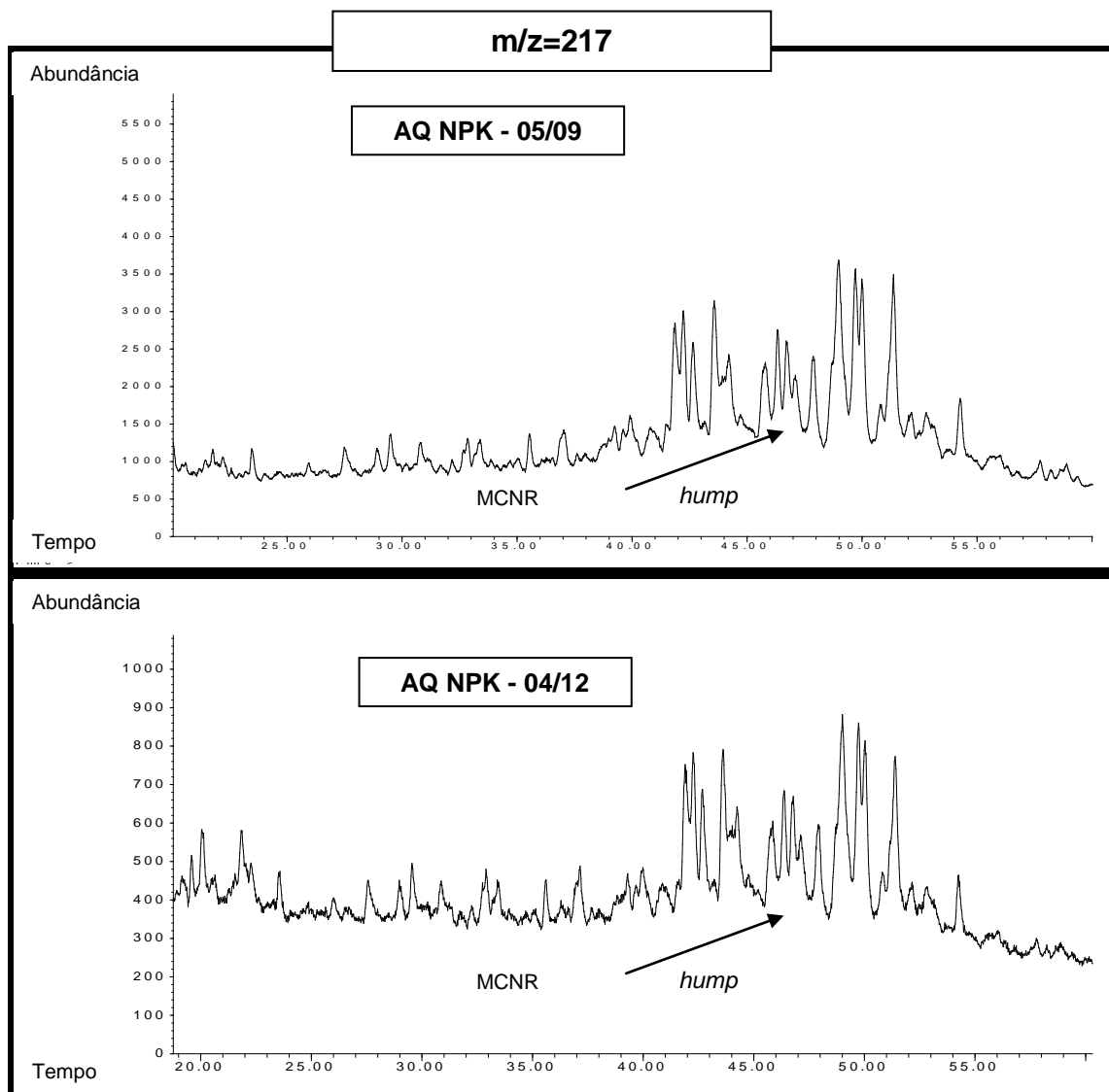


Figura 35 - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR que provoca uma elevação na linha de base (*hump*). Esse *hump* é indicado de degradação que já é visível no primeiro dia do experimento para todos os aquários.

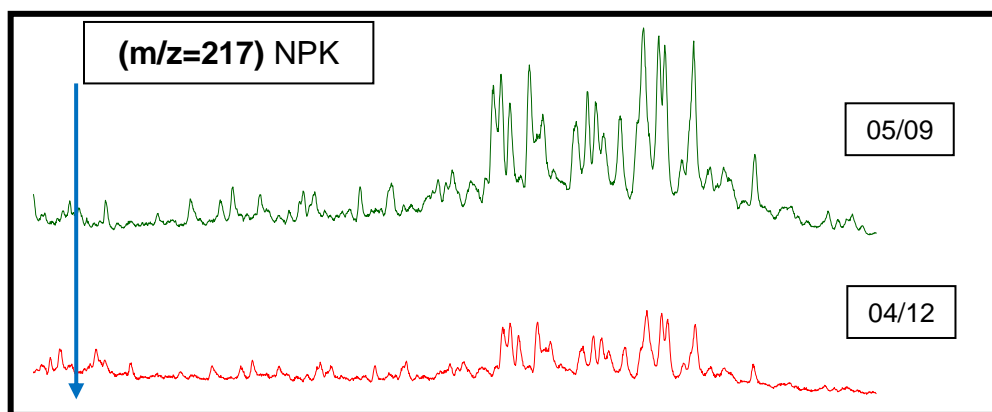


Figura 36 - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do  $m/z=217$  para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário NPK mostrando um aumento de degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta), que pode ser visualizado pelas reduções relativas dos picos.

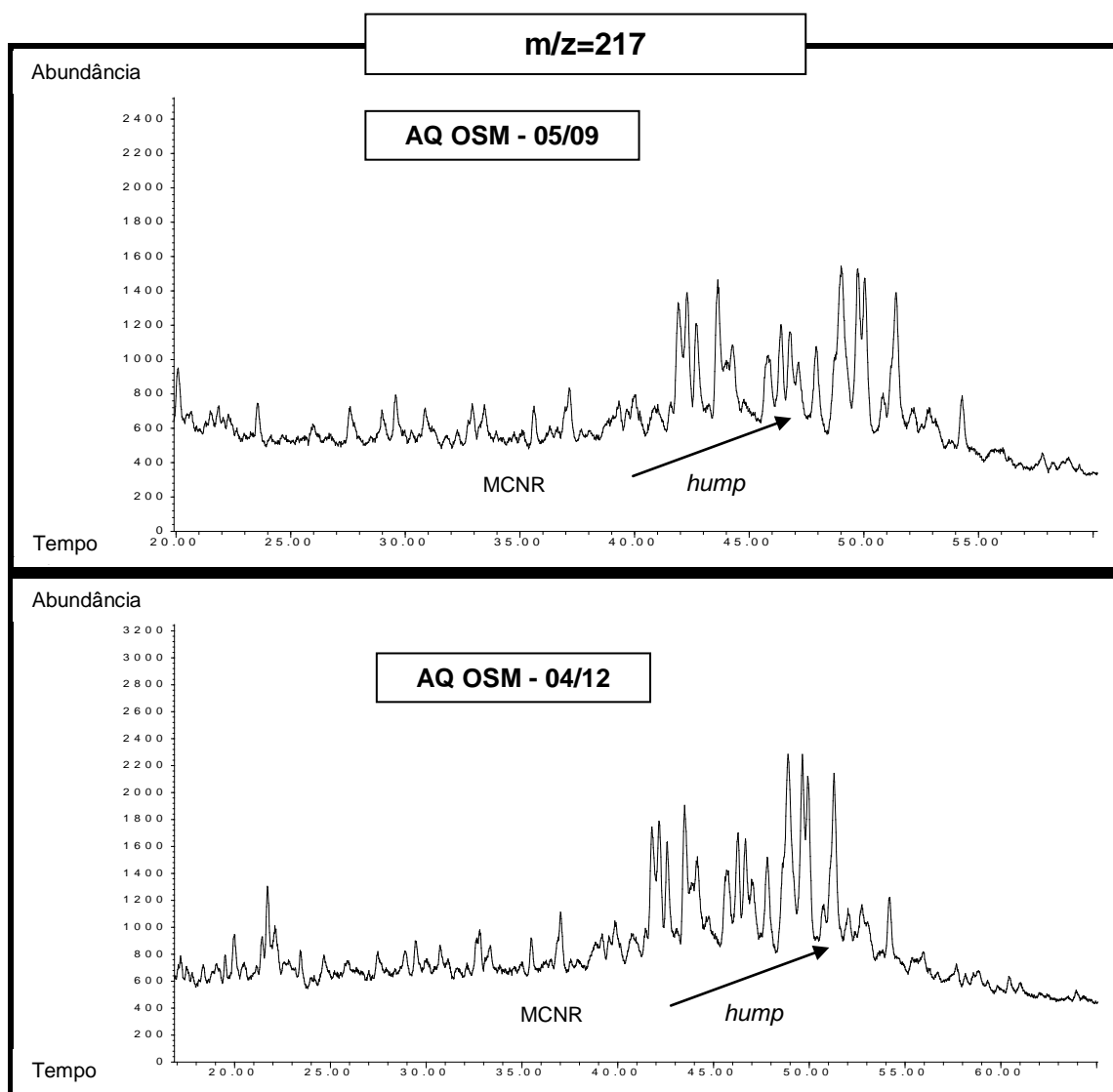


Figura 37 - Fragmentograma dos biomarcadores saturados ( $m/z=217$ ) mostrando a Mistura Complexa Não Resolvida – MCNR que provoca uma elevação na linha de base (*hump*).

Os aquários OSM tiveram degradação pouco pronunciada dos picos (Figura 38) e o efeito da dissolução durante a homogeneização das amostras pode ter interferido nas análises. Por se tratar de amostras diluídas muitas vezes os picos dos fragmentogramas podem ser confundidos com o ruído do equipamento, ou seja, os picos estão próximos ao limite de detecção do equipamento utilizado para injeção e leituras da amostras que pode gerar dificuldades na interpretação dos dados.

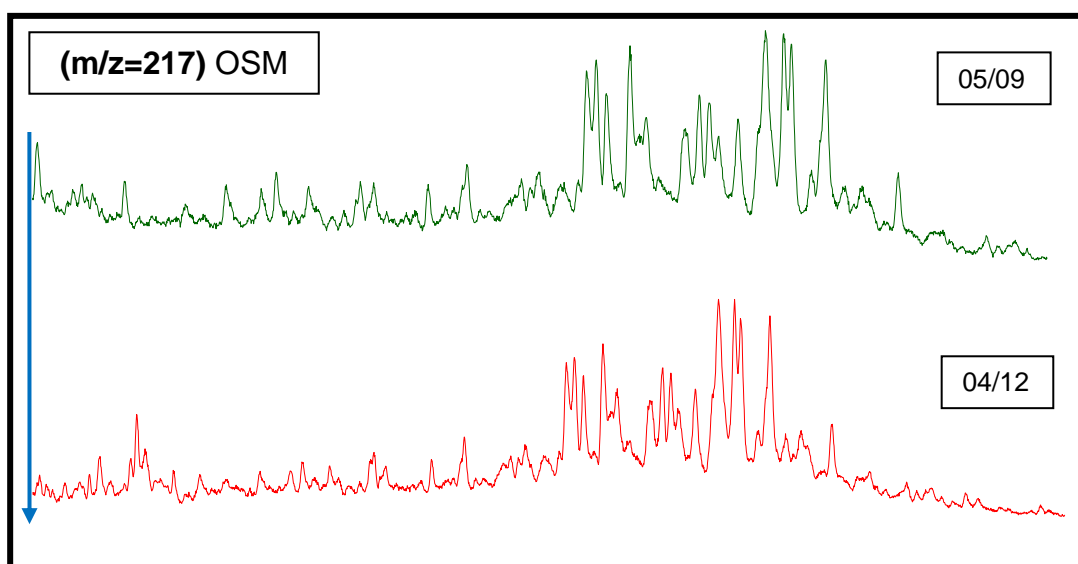


Figura 38 - Fragmentogramas projetados para a mesma escala do  $m/z=217$  para o tempo inicial (05/09) e final (04/12) para o aquário NPK mostrando um pequeno aumento na degradação desses compostos ao longo dos 90 dias de simulação (seta).

#### 4.3.3 Análise dos Compostos Aromáticos (HPA)

Os íons massa e os respectivos compostos ou seus homólogos utilizados foram:

- $m/z$  170 – trimetil naftalenos
- $m/z$  192 - metil fenantrenos
- $m/z$  228 – criseno
- $m/z$  231 – esteranos triaromáticos

Os dados avaliados dos compostos aromáticos (HPA) foram arrumados de forma a facilitar as análises dos parâmetros e inferir se houve ou não degradação. Os fragmentogramas de íon/carga ( $m/z=170$  trimetil naftaleno) do aquário controle denominado REF, aquário NPK e do aquário OSM (Figura 39a, b, c, d, e, f) estão dispostos em tempo cronológico, sendo: tempo inicial (05/Set) e tempo final (04/Dez) durante aproximadamente 90 dias de simulação.

Os valores de massa/carga seguem uma ordem numérica crescente e os primeiros, de menor peso molecular, principalmente os naftalenos e o fenantreno são bastante voláteis e perdidos por evaporação e fotoxidação. Ou seja, HPA de baixa massa molecular (BMM) geralmente sofre degradação mais severa do que aqueles de alta massa molecular (AMM), comumente pirogênicas, através de processos físico-químicos ou microbiológicos (SIMO et al., 1997).

O naftaleno é derivado principalmente de atividades antropogênicas, em especial relacionadas ao aporte de petróleo no ambiente. Esse composto ocorre como uma fração significativa no petróleo cru ou derivados com frações leves e pode ser usado como marcador de origem petrogênica dos HPA (TAM et al., 2001).

Os Picos 1 e 2 do fragmentograma ( $m/z=170$  trimetil naftalenos) (Figura 39 e Tabela 9) para o aquário REF mostra que os picos tiveram comportamentos semelhantes durante o experimento. O aumento relativo desses compostos no final da simulação (04/Dez) sugere que compostos mais complexos (HPA mais complexos) podem ter sofrido processos de degradação (cisão) na sua estrutura, que por sua vez, possa ter gerado um aumento da abundância relativa dos trimetil naftalenos. Lembrando ainda, que alguns isômeros podem ser mais resistentes à degradação com respostas diferentes para um mesmo processo. Esse comportamento de aumento relativo para o ( $m/z=170$  trimetil naftalenos) foi observado também nos aquários NPK e OSM.

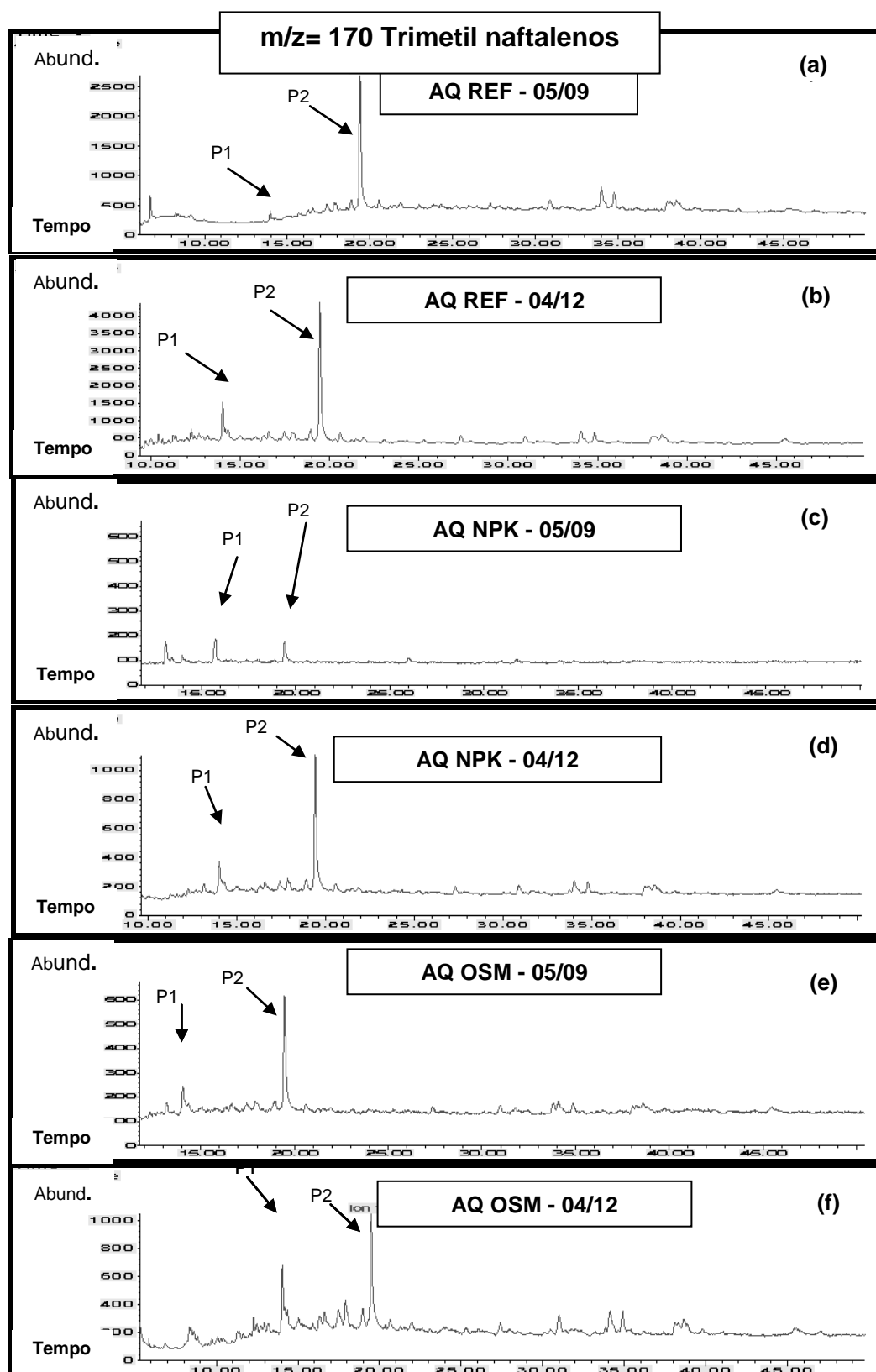


Figura 39 – Fragmentogramas do  $m/z=170$  ao longo dos tempos inicial (05/09) e final (04/12) da simulação para os aquário REF (a, b), NPK (c,d) e OSM (e,f).

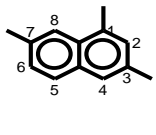
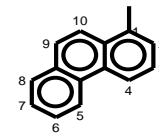
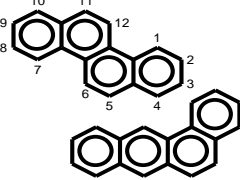
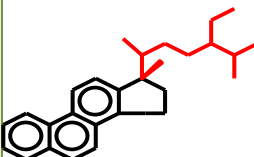


Segundo Silva, G. (2004) os HPA de alta massa molecular (AMM) geralmente de origens pirogênicas são mais estáveis à degradação biológica, menos volátil e são mais hidrófobos que os de baixa massa molecular (BMM). Por estas características, os HPA de AMM tendem, de modo geral, a permanecerem mais tempo nos sedimentos, podendo distorcer as relações iniciais de HPA. Queiroz et al. (2007) em trabalho realizado na BTS encontrou concentração de HPA no verão muito superior as condições de inverno, contrariando a hipótese de alguns trabalhos, não sendo possível estabelecer, para o local em questão, uma condição de dependência entre as variáveis consideradas. O fato foi atribuído pelos autores à persistência dos HPA estudados em sedimentos com características anóxicas, síltico-argiloso e rico em matéria orgânica presentes no manguezal, que interferem na velocidade dos processos de biodegradação dos hidrocarbonetos, mascarando um possível padrão de distribuição das concentrações dos HPA em função das condições ambientais e climáticas.

Tabela 9 – Valores relativos dos picos de todos os fragmentogramas avaliados ao longo dos 90 dias de simulação (tempo inicial e final) para os aquários REF, NPK e OSM e no final da tabela as fórmulas estruturais desses HPA

AQ REF	M/Z170 trimetil naftaleno		M/Z192 metil Fenantreno		M/Z228 Criseno		M/Z231 esteranos triaromaticos	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
T1 - 05/set	250	1875	880	1360	1032	n. identif.	960	n. identif.
T2 - 04/dez	1000	3330	5000	9500	175	n. identif.	1600	n. identif.
<b>AQ NPK</b>								
T1 - 05/set	100	100	91	273	20	n. identif.	48	n. identif.
T2 - 04/dez	250	1000	400	750	342	n. identif.	650	n. identif.
<b>AQ OSM</b>								
T1 - 05/set	100	425	240	390	342	n. identif.	480	n. identif.
T2 - 04/dez	500	850	0	0	667	n. identif.	1750	n. identif.

 1,3,7-trimetil naftaleno $C_{13}H_{14} \sim 170 \text{ g/mol}$	 1-metil fenantreno $C_{15}H_{12} \sim 192 \text{ g/mol}$	 criseno $C_{18}H_{12} \sim 228 \text{ g/mol}$	 estero triaromatico (TA) $C_{18}H_{15} \sim 231 \text{ g/mol}$
--	--	--	---

O mesmo raciocínio anterior pode ser aplicado para os aquários REF e NPK para o fragmentograma ( $m/z=192$  metil fenantreno) onde ocorreu um aumento relativo ao longo do experimento nos aquários REF e NPK (Tabela 9 e Anexo III). Para o aquário OSM percebe-se ocorrência de degradação completa dos picos

(PICO 1e PICO 2) do composto metil fenantreno (Figura 40, Tabela 9 e Anexo III). Esse fato pode indicar que o OSMOCOTE (nutriente) pode ter criado condições nutricionais diferentes do NPK e REF que pode ter favorecido um grupo de microorganismos específicos, podendo promover a degradação daquele composto.

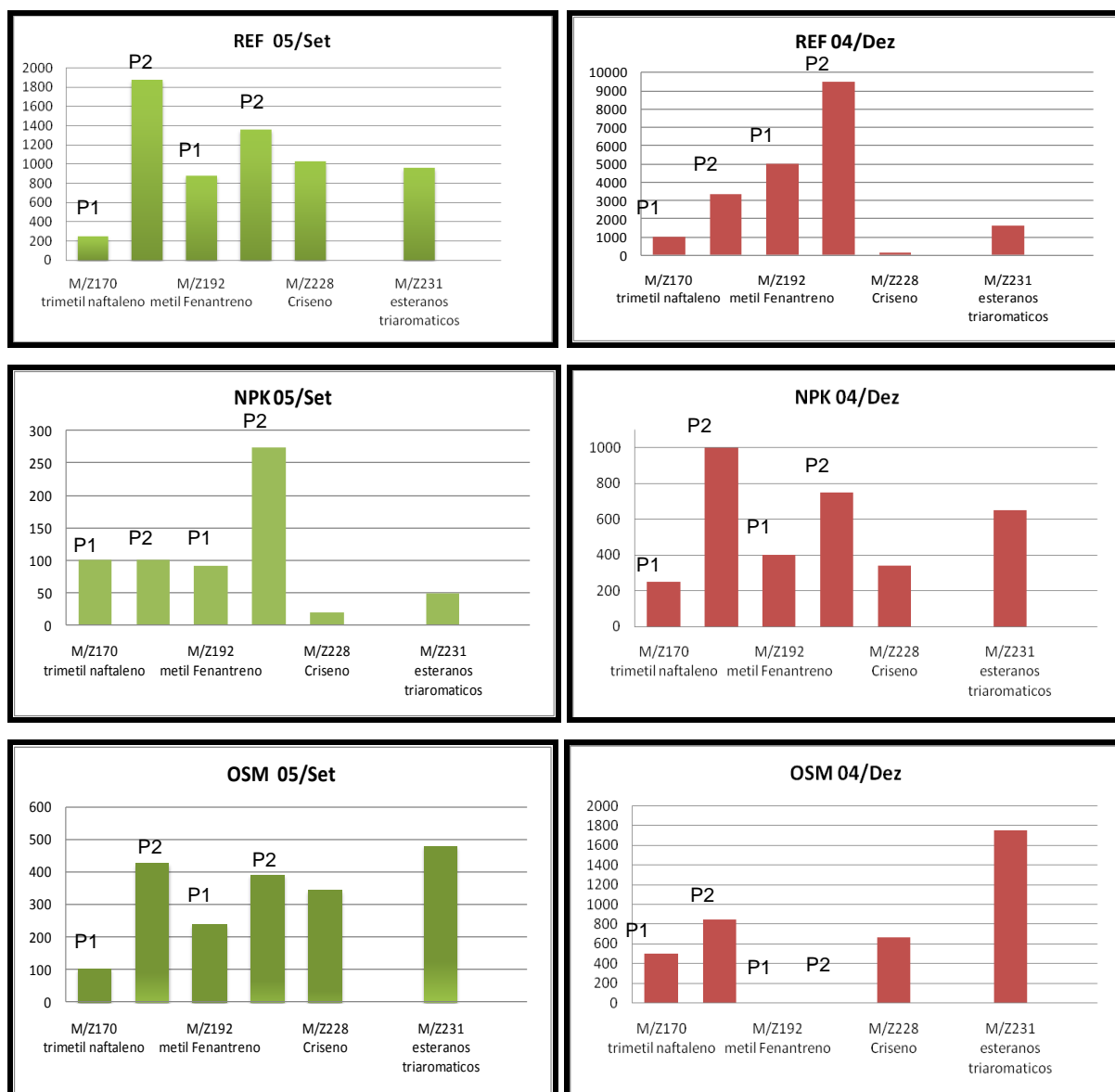


Figura 40 – Valores dos Picos mais abundantes (proeminentes) do m/z=170, m/z=192, m/z=228 e m/z=231, ao longo do tempo inicial (05/Set) e final (04/Dez) da simulação para os aquários REF, NPK e OSM.

Verifica-se na Figura 40, Tabela 9 e Anexo III uma degradação no composto m/z=228 criseno. Segundo alguns autores (WANG et. al., 1998, PETERS e MOLDOWAN, 1993) o criseno é considerado um composto recalcitrante, por ser considerado um hidrocarboneto aromático padrão de resistência à degradação. As

amostras para o composto criseno estavam bastante diluídas e essas baixas concentrações podem ser confundidas com o ruído do equipamento, fazendo com que, os picos do fragmentograma (abundância relativa) estejam próximos ao limites de detecção do equipamento distorcendo ou mascarando os valores reais.

Comparando os fragmentogramas ( $m/z=231$  esteranos triaromáticos) no tempo inicial e final para os aquários REF, NPK e OSM (Figura 41 e Tabela 9) percebe-se aumento relativo dos picos em todos os aquários. Esse fato poderia ser explicado por degradação de matéria orgânica complexa pelos microorganismos gerando frações de complexidade intermediárias. A oxigenação do sistema (injeção de ar por bombas de aquários) poderia provocar oxidação da matéria orgânica petrogênica e pirogênica gerando diversos compostos que poderia contribuir para um aumento relativo de algumas frações.

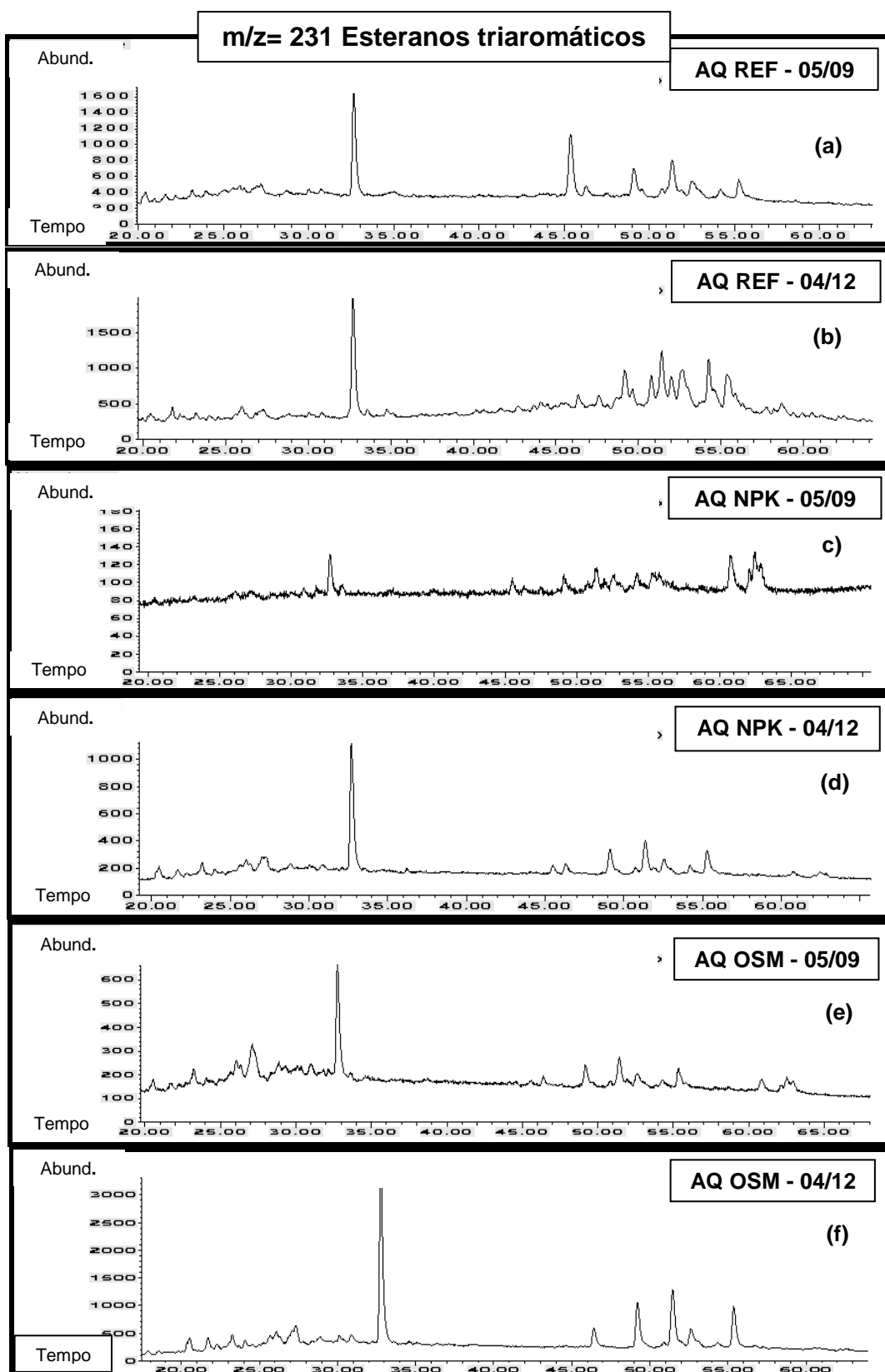


Figura 41 – Fragmentogramas do  $m/z=231$  ao longo do tempo inicial e final da simulação para os aquários REF, NPK e OSM.

Segundo Le Dréau et al., (1997) o refino de petróleo pode contribuir para aumentar o conteúdo de matéria orgânica nos sedimentos marinhos, uma vez que as áreas adjacentes a refinarias recebem quantidades irregulares de hidrocarbonetos por ano, com composição bastante variável em função dos diferentes óleos crus que são tratados nessas unidades. Assim sendo, nesses locais, a complexidade dos efluentes impede a idealização de um perfil cromatográfico característico. Esse fato pode ser extrapolado para a área estudada nessa dissertação, pois a mesma encontra-se circundada por diversas indústrias ligada as atividades de processamento, transporte e exploração de petróleo. Segundo (Veiga, 2003) em sedimentos os HPA podem estar relacionados à coexistência de várias fontes de poluição e às transformações intempéricas sofridas por esses compostos em meio natural, dificulta a interpretação dos dados.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros físico-químicos monitorados durante 90 dias de simulação mantiveram-se dentro do padrão esperado e em condições capazes de favorecer a degradação dos hidrocarbonetos pelo bioestímulo. Os valores dos nutrientes também demonstram que esses fatores foram bem monitorados e mantiveram condições desejáveis para os processos de biorremediação.

A análise dos dados para o OSMOCOTE permite inferir que esse nutriente pode ter uma resposta melhor para processos de degradação ou biorremediação em tempo maiores ao avaliado na presente pesquisa. Esse tipo de fertilizante (*slow release*) poderia ser utilizado como bioestimulante em processos de degradação de compostos mais complexos, que carecem de um tempo mais longo (aromáticos complexos e compostos ricos em NSO).

Os dados da cromatografia líquida mostram uma tendência maior à degradação para os aquários REF e NPK, ou seja, para a fração total de óleo a atenuação natural e o bioestímulo com o nutriente NPK seriam as técnicas mais adequadas. Entretanto, se for analisado sob a ótica da degradação dos biomarcadores saturados verifica uma tendência de aumento na degradação mais acentuada nos aquários como NPK. Isso pode ser corroborado com os aumentos relativos das abundâncias dos picos do terpanos tricíclicos em relação aos tetracíclicos nos aquários com NPK. Esse composto revelou-se satisfatório para processos de bioestímulos, principalmente para compostos menos complexo.

Os terpanos  $m/z=191$  tiveram uma resposta melhor, relativa aos processos degradativos para o atual experimento, principalmente para os aquários com NPK. Já o  $m/z=217$  mostrou-se degradado no tempo inicial, fato que pode ser evidenciado pelo *hump* acentuado da linha de base do fragmentogramas, isso é indicativo de processos degradativos. Durante a simulação ocorreu redução das abundâncias relativas dos picos desse composto, principalmente para os aquários REF e NPK.

Os biomarcadores aromáticos (HPA) apresentaram um aumento relativo das abundâncias dos picos, que pode ser indicativo de degradação de compostos mais complexos e geração de compostos de complexidade intermediária. O  $m/z=228$  criseno teve uma redução pronunciada nos aquários REF, que pode tá relacionado á diluição das amostras e pode ser confundido com o limite de detecção do equipamento (ruídos). Já a fração dos  $m/z=191$  metil fenantreno ocorreu uma redução brusca nos aquários OSM, indicando que o OSM pode ter criado condições específicas para degradação desses compostos.

Os dados de biomarcadores aromáticos (HPA) serviram para afirmar que o OSMOCOTE não fornece uma boa resposta na degradação dos hidrocarbonetos para o tempo de simulação proposto (90 dias), com exceção para o  $m/z=191$ . De forma geral o NPK foi considerado nutriente adequado para situações de derrames de óleos recentes, enquanto o OSMOCOTE seria recomendado para situações de remediações de compostos recalcitrantes ou complexos.

## 6 RECOMENDAÇÕES

Esse tópico é muito importante para futuros experimentos na referida área de estudo e para situações semelhantes em outras regiões. Como o ambiente de manguezal é muito heterogêneo, uma solução para reduzir a variabilidade dentro das réplicas seria: retirar uma quantidade de sedimentos em diversos locais (maior representatividade) homogeneizar os sedimentos, retirar uma quantidade para ser liofilizado, macerado e extração em *Soxhlet* do óleo. Este, por sua vez, seria utilizado para contaminar amostras de sedimentos de manguezais, que fosse identificado sem indícios de contaminação. Isso traria mais representatividade dentro das duplicatas e reduziria, sobremaneira, a heterogeneidades do ambiente, facilitando assim a interpretação dos resultados.

Dada a complexidade dos compostos NSO (em grande parte resinas e asfaltenos) seria interessante que fossem feitos experimentos exclusivos para esse grupo de compostos, pois são mais resistentes à degradação e seria necessário um tempo mais longo para verificar o seu comportamento. Esses compostos em processos de cisão podem gerar moléculas intermediárias menos complexas, que poderia contribuir para um aumento relativo das outras frações do óleo (saturados e aromáticos). Pela resposta do experimento em questão, o OSMOCOTE poderia ser utilizado como bioestimulante (nutriente) para monitoramentos mais longos, por ser um nutriente *slow release* (liberação lenta e contínua dos nutrientes) a resposta é mais tardia.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMASSU, W.; KORUS, R. A. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In: **Bioremediation: Principles and Applications** – Biotechnology Research Series: 6. Crawford, R.; Crawford D. (Editors), Cambridge University Press: p.13-34, 1996.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. **Bioresource Technology**, Oxon, v.79, n.3, p.273-276, 2001.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. San Diego: Academic Press, 2<sup>nd</sup> ed., 453p., 1999.
- ANSELMO, ANDRÉ L. F.; JONES, C. M. **Fitorremediação de Solos Contaminados – O Estado da Arte**. XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção – Porto Alegre, RS, Brasil, 29 out a 01 de nov. de 2005.
- ATLAS R.M, BARTHA R. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. **Biotechnol Bioeng** 14(3), p.309–318, May 1972.
- ATLAS, R. M.; RAYMOND, R. L.. Stimulated petroleum biodegradation. **Critical Reviews In Microbiology**, Louisville, v. 5, n. 4, p.371-386, 1977.
- ATLAS, R. M.. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, 31 (4), p.178-182, 1995
- AZEVEDO, VALÉRIA L. C. **Tecnologias para remediação de solos Contaminados por derivados de petróleo. Estudo de caso: as tecnologias da biopilha e Dessorção térmica para remediação de solos Contaminados por óleo combustível**. 2006. Monografia (Especialização em gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo) – Salvador/BA, Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal da Bahia, 49p. 2006.
- ARAÚJO , M. e SILVA, M. **Caracterização Físico-Oceanográfica da Área do Estuário do rio São Paulo, Baía de Todos os Santos-BA**. Relatório Técnico II – Campanha C03. Laboratório de Oceanografia Física, Estuarina e Costeira, Depto. de Oceanografia da UFPE, junho 2008.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- BAHIA. Centro de Recursos Ambientais. **Avaliação da Qualidade das Águas costeiras da Baía de Todos os Santos**: Relatório técnico, Avaliação ambiental. Salvador, 2º semestre 2002.
- BAKER, K.H.; HERSON D.S. **Bioremediation**. New York: McGraw – Hill Inc., 375p., 1994.

BENTO, F.M. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Oxon, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo – Enfoque na aplicação do processo Terraferm**. Tese (Doutorado em Ecologia), Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 86p, 2005.

BIOMONITORAMENTO E MEIO AMBIENTE LTDA, BMA. **Monitoramento da recuperação do manguezal adjacente a Estação Pedra Branca, Campo de Candeias – Ba - Petrobrás/ UO-BA**. Relatório Técnico. Salvador, 138p., out. 2005.

BITTAR, P. R. **Biorremediação através do uso de biopilhas**, 2000. Disponível em: <[www.bluepointambiental.com.br/biopilha.html](http://www.bluepointambiental.com.br/biopilha.html) .> Acesso em: 20 setembro 2008.

BOEHM, P.D., FIEST D. L.. Subsurface distribution of petroleum from an offshore well blowout. The IXTOC I blowout, Bay of Campeche. **Environ. Sci. Technol.**, 16(2), p. 67-74, 1982.

BORIN, João Eduardo. **Estudos geoquímicos do óleo dos Campos de Malim, Bacia de Campos**: síntese de biomarcadores esteranos aromáticos. 2004. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BORRESEN, M.H.; RIKE A.G.. Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. *Cold Reg. Sci. Technol.* 48:p.129–138, 2007.

BRAGG, J. R.; OWENS, E. H.. Clay-oil flocculation as a natural cleansing process following oil spills: Part 1 – Studies of shoreline sediments and residues from past spills. **Proceedings of the 17 th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, v. 1, Canada, p.1-23, Feb.1994.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre as classificações dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res05/res3505.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 08.

BRITTO, C. R. **Caracterização geoquímica de substrato lamoso em zonas de manguezal da Baía de Aratu – Bahia – Brasil: subsídio a um programa de monitoramento, caracterização e gestão ambiental de zonas de manguezal do estado da Bahia**. 2003. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente) – Instituto Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

BROCKS, J. J.; BUICK, R.; SUMMONS, R. E. LOGAN, G. A. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. 2003, 67(22), 4321-4335.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.

CARMOUZE, JEAN-PIERRE. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análise químicas. São Paulo: Editora Edgard Blücher, FINESP, 1994.

CARVALHO, L.V.M. **Estudo da qualidade da água superficial em zona estuarina no Rio São Paulo – Região de Candeias- Ba.** 2007. 129 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

CARVALHO, R. Cartas Sensibilidade Ambiental – SAO da Baía de Todos os Santos, Bahia. PETROMAR/FINEP, Rede 05, PETRORISCO. Salvador, 2006).

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F. de S.; TRIGUIS, J.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; SANTIAGO, J.S. Fonte da matéria orgânica e grau de contaminação por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em sedimentos de manguezais na porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia. In: 4ºPDPETRO, 2007, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos.** Campinas, 2007. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO\\_6\\_2\\_0026-1.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-1.pdf)> Acesso em: 25 fev. 2008.

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F.S.; TRIGUIS, J.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; SANTIAGO, J.S. Assessment of Oil Extraction Waste in Sediments Adjacent to Pedra Branca Station, Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. **Anais do: X ALAGO Congress on Organic Geochemistry**, v. 1. p. 247-250, 2006, Salvador.

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F. de S.; TRIGUIS, J.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; SANTIAGO, J.S. Fonte da matéria orgânica e grau de contaminação por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em sedimentos de manguezais na porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia. In: 4ºPDPETRO, 2007, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos.** Campinas, 2007. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO\\_6\\_2\\_0026-1.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-1.pdf)> Acesso em: 06 fev. 2009.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas.** Relatório técnico, 2003. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas\\_final.zip](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas_final.zip)> Acesso em: 26 jul. 2008.

CHAIENAU, C. H., MOREL, J., DUPONT, J., BURY, E., OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Sci Total Environ**, v. 227(2-3): 237-47.1999

CHAYABUTRA, C.; JU, L. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic denitrifying conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 493-498, 2000.

CHENG, H. H.; MULLA, D. J. The soil environment. **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.1-13. 1999.

COELHO, MARCELA F. (2005). **Estudo do uso de fertilizante npk imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório**. Monografia (Bacharel em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo) – Macaé/RJ, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 36p.

CRAPEZ, M. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. **Efeito de poluentes em organismos marinhos**. São Paulo: Arte e Ciência, Villipress, 2001, p. 253-267.

CUNHA, C.D.; LEITE, S. G. F.. Optimization of same environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosms bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, 28, p.129-134, 1997.

DAL FORNO, Rafaela Ghellere. **Avaliação da Poluição do Solo por Derivados do Petróleo e sua Remediação**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências do Solo, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DIAS, F. G. **Utilização de consorcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. 2007. 106f. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo Campinas, 2007.

DOELMAN, P; BREEDVELK, G. In situ versus on site practices. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.539-558.

DOWTY, R.A.; SHAFFER, G.P.; HESTER, M.W.; CHILDERS, G.W.; CAMPO, F.M.; GREENE, M.C. Phytoremediation of small-scale oilspills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. **Mar. Env. Res.**, v. 52, p. 195-211, 2001.

DROR, I. Temporal changes in kerosene content and composition in field soil as a result of leaching. **Journal of Contamination Hidrology**, Amsterdam, v.48, n.3-4, p.305-323, 2001.

DUA, M.; Singh A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2002 Jul;59(2-3):143-52. Epub 2002 Jun 1. Review. PubMed PMID: 12111139.

EDGEHILL, R.U. et al. Bioremediation by inoculation with microorganisms. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/ SSSA, 1999. p.290-314.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro: XXVI, (5) 412, 1998.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). **How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers.** (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007) 1994. Disponível em: < <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2009.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998.

EVENS, C.W. The effects and implications of oil pollution in mangrove forests. *International Oil Spill Conference*, IOSC, p. 2283, 2005.

FINGAS, M. F. Studies on the evaporation of crude oil and petroleum products II. Boundary layer regulation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 57, p. 41- 58. 1998.

FOLK R.L.; WARD W.C.. Brazos river bar: a study of significance of grain size parameters. *J. Sediment. Petrol.* **27**, p. 3-26, 1957.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J.

Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v.12, n.5, p.325-335, 2001.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils.** Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 33-51, 1999.

HEELY, D.A.; WERK, E.S.; KOWALSKI, R.G. **Bioremediation and**

**Reuse of Soils Containing nº5 Fuel Oil in New England Using an Aboveground Treatment Cell: a Case Study.** *Hydrocarbon Contaminated Soils VII.* Lewis Publishers, Chelsea, 1992.

HOFF, R.Z.. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup, **Marine Pollution Bulletin**, 26 (9), p. 476-481, 1993.

HOFFMANN, J. & VIEDT, H. *Biologische Bodenreinigung - Ein Leitfaden für die Praxis.* **Springer, Berlin.** 311 S, 1998.

HUESEMANN, M.H. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.4, p.321-336, 2002.

HUNT, E. J.. **Petroleum Geochemistry and Geology**, 2 ed. New York, W. H. 1996.

INTERNATIONAL PETROLEUM INDUSTRY ENVIRONMENTAL CONSERVATION ASSOCIATION (IPIECA), 1993. **Impactos Biológicos de la Contaminación por Hidrocarburos: Manglares.** Serie de Informe de IPIECA, v. 4, p. 1 – 24.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; SÁ, E. L. S. DE; PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated

from a Petrochemical Sludge Landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 56, n. 3, p.143 – 156, 2005.

JACQUES, R.J.S. et al. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, Philadelphia,v.11, n.1, p.1-11, 2007.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R.. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbial Reviews**, **53**(3), p.305-315, 1990.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTI, A.-M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting biopiles. **Environmental Pollution**. 2003. 107, p. 245-254.

LE DRÉAU, Y.; JACQUOT, F.; DOUMENQ, P.; GUILIANO, M.; BERTRAND, J.C.; MILLE, G. Hydrocarbon balance of a site which had been highly and chronically contaminated by petroleum wastes of a refinery (from 1956 to 1992), **Marine Pollution Bulletin** 34, n. 6, 456-468, 1997.

LIMA, Danusia Ferreira. **Biorremediação de sedimentos impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos**: avaliação de hidrocarbonetos saturados. 2010. 234 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geologia, Departamento de Geologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

LINDSTROM, J. E. et al. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. **Appli. Env. Micro** **57**(1), Alaska, p.2514-2522, Sep.1991.

Killops, S. D.; Killops, V. J. **An Introduction to Organic Geochemistry**. 1993, John Wiley & Sons, Inc. First Edition, New York, USA, 1-265.

KUIPER, I; LAGENDIJK, E. L; BLOEMBERG, G. V; LUGTENBERG, B. J. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Mol Plant Microbe Interact**. 2004 Jan;17(1):6-15. Review. PubMed PMID: 14714863.

MACEDO et alli. (2001) **Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru Utilizando Fungos Filamentosos**. Acessado no site: [http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_IX\\_jic\\_2001/Rosana.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_IX_jic_2001/Rosana.pdf) Acesso em 07/08/2003.

MACHADO, J.C.V.. **Estudo do grau de contaminação por hidrocarbonetos nos sedimentos da Baía de Todos os Santos**.1996.137f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1996.

MAHAN, B.H. **Química: um curso universitário**. Departamento de química, Universidade da Califórnia, Berkeley. Ed. Edgard Blücher Ltda. 654p. 1972.

MACLEOD, C.T.; DAUGULIS A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a

hydrophobic Mycobacteriu. **Process Biochemistry**, Oxon, v.40, n.5, p.1799–1805, 2005.

MAILA, M. P.; CLOETE e THOMAS, E. **Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?**. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology* 2004 3: 349–360. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/r361465u74126032/fulltext.pdf>.> Acesso em: 10 de outubro 2009.

MARIANO, ADRIANO P. (2006). **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas – Rio Claro, SP. 162 f.

MARTINS, L. K. P. **Evidência de toxicidade em sedimentos associados à indústria petrolífera: uso de biomarcadores**. 2001. 151 f. Dissertação de mestrado – UFBA. 2001.

MESTER, K.G. **Field evaluation of in situ denitrification for bioremediation of contaminates soils and groundwater**. New Jersey: New Brunswick, 155p., 1995.

MINGUZZI, Sandro. **Estudos geoquímicos do óleo dos Campos de Furado, Tabuleiro do Martins e Pilar da Bacia Sergipe-Alagoasom**: preparação do biomarcador ácido 3,5 seco-4-norcoleston-3-óico o. 1997. 205 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MOREIRA, Ícaro Thiago Andrade. **Avaliação da Eficiência de Modelos de Remediação Aplicados Manguezal Impactados por Atividades Petrolíferas**. 2011. 171 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós - Graduação em Geoquímica, Departamento de Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

MORGAN, P., WATKINSON, R. J. Biodegradation of components of petroleum. In: **Biochemistry of Microbial Degradation**. Ratledge, C. (ed.) Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.1-31. 1994.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, Oxford, v.30, n.4, p.587-601, 2004.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; KALOGERAKIS, N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing liophilic fertilizers. **Desalination**, v. 211, p. 286–295, 2007.

OLIVEIRA, F. J. S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. 2001. 101f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

Oliveira, A., Camara, E. B. Petrobras assume a culpa: Empresa diz que erro de projeto causou vazamento de oleoduto que poluiu a baía. *O Globo*, Rio de Janeiro, 22.jan. p.15-16. 2000.

PESO – AGUIAR, M.C. *et al.* Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management** **3**, p.459-470, 2000.

PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarkers Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments**. New Jersey: Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1<sup>st</sup> ed., 363p., 1993.

PETERS, K.E., WALTERS, C.C., MOLDOWAN, J.M.. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Petroleum Exploration and Earth History**, 2nd Edition, Vol.2, Cambridge University Press, 2005.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.56, p.15-39, 2005.

PRINCE, R.C.. Petroleum spill bioremediation in marine environments, **Critical Reviews in Microbiology**, 19 (4), p. 217-242, 1993.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F.. EPA's Alaska Oil Spill Bioremediation Project." **Environ. Sci. Technol.** **25**, p.372-379, 1991.

PRIZZIA, ROSS (2001). **Natural attenuation as a viable remediation method**. Environmental Management and Health, Vol. 12 No. 4., 428-435. MCB University Press, 0956-6163. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com/Insight/ViewContentServlet?Filename=/published/emeraldfulltextarticle/pdf/0830120408.pdf>> Acesso em: 15 de Novembro de 2008.

QUEIROZ, A.F.. **Mangrove de la Baía de Todos os Santos - Salvador , Bahia - Bresil. Ses caracteristiques et l'influence antropique sur la Geochimie**. 1992.148f. (Tese de Doutorado), Universite Louis Pasteur - Estrasburgo, 1992.

QUEIROZ, A. F. et al. **Comportamento Geoquímico dos Hidrocarbonetos no Ecosystema de Costeiro: exemplo dos sedimentos de manguezais da Baía de Todos os Santos**, Bahia. In: 4ºPDPETRO, 2007, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos** (6.2.0026-2 – 1). Campinas, 2007. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO\\_6\\_2\\_0026-2.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-2.pdf)> Acesso em: 27 fev. 2009.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 5. ed., 503p., 2001.

ROSA, A.P. **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos - experimentos laboratoriais**. Tese (Mestrado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo) - Macaé - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 145p. 2001.



ROSA, A.P. & TRIGÜIS, J. A. Processo de biorremediação usando o fertilizante NPK, em eventuais derrames de óleo – Experimentos Laboratoriais. **Revista Brasileira de Geociências**, V. 36, n. 2, p. 232 – 242, 2006.

RYTKONEN J., ITAVAARA M., PAULSEN J. E. The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. *In: Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference*, Honolulu, USA, 2(1), p.25-30, 1997.

SANTANA, R. C.. **O Método da Biorremediação Aplicado na Limpeza de Substrato de Manguezal Impactados por Petróleo, na Baía de Todos os Santos – Bahia**. 2008. 59f. Monografia (Bacharel em Oceanografia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

SANTOS, Geise de Santana Dos. **Sensibilidade Ambiental da Baía de Todos os Santos (BA)**. 2002. 85 f. Monografia (Graduação) - Curso de Geologia, Departamento de Geologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha**. São Paulo: USP, Instituto Oceanográfico, 1999.

SCHNEIDER, M.R., CORSEUIL, H. X., PEDROZO, M. F. M., BARBOSA, E. M., LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Salvador : Centro de Recursos Ambientais - BA, v.12. p.229, 2002.

SILVA, Alexsandro Araujo da. **Estudos geoquímicos com evidências paleoambientais, maturação e biodegradação dos óleos de diferentes origens da Bacia Potiguar, Brasil**. 2008. 411 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SILVA, E; FIALHO, A. M; SÁ-CORREIA, I; BURNS, R. G; SHAW, L. J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environ Sci Technol**. 2004 Jan 15;38(2):632-7. PubMed PMID: 14750741.

SILVA, Gilberto Silvério da. **Avaliação do Estado de degradação e Capacidade de Suporte da Bacia do Rio Atibaia: região de Campinas/Paulínia - SP**. 2004. 178 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, S.M.T. **Avaliação da contaminação por HPAs individuais e totais em sedimentos de mesolitoral na Baía de Todos os Santos**. 2002. 109 f. Dissertação de Mestrado - Química Analítica, IQ / UFBA, Salvador. 2002

SIMO, R.; GRIMALTI, J. O. E ALBAIGES, J. Loss of unburned-fuel hydrocarbons from combustion aerosols during atmospheric transport. **Environ. Sci. Technol.**; 31(9), 2697-2700. 1997.

SOUZA, E. S. de. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar - testes laboratoriais**. 2003. 315 f. Tese

(Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo) – Macaé - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF. 2003.

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

TAVARES, T.M.. **Distribuição espacial de metais pesados e hidrocarbonetos, em programa de monitoramento dos ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos**; Relatório Final. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 85p., 1996.

THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED (ITOPF). **Fate of Marine Oil Spill**. Technical Information Paper, n. 02, p. 1-8, 2002.

TSENG, F.S. Considerations in care for birds affected by oil spills. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 8, p.21 – 31, 1999.

UNA, G. V., GARCIA, M. P. N. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v.18, p.315-319. 1993.

VANEM, E.; ENDRESEN, O.; SKJONG, R. Cost-effectiveness criteria for marine oil spill preventive measures. **Reliability Engineering & System Safety**, v. 93, n. 9, p. 1354-1368, 2008

VEIGA, G. I. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/BA**. 2003. 205 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé - RJ, 2003.

VIANA, FRANCINE; CORREIA, THAYNÁ M. B.; MACHADO, MARIA ISABEL; COSTA, CÉSAR B.; BAISCH, PAULO. **Utilização da fitorremediação em áreas contaminadas por petróleo e seus resíduos**. 4o PDPETRO, Campinas, SP 21-24. 2007.

XU, R., N. L. A. LAU, K. L. NG, AND J.P. OBBARD. **Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment**.j. Environ. Qual. 33:1210–1216. 2004.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F.. Evaluacion de la bioestimulacion em la biodegradacion de TPHs em suelos contaminados com petróleo. Bioestimulation process during the biodegradation of THH in oil contaminated soil. **Rev. colomb. Biotecnol**. Vol. VII no. 2, p.67-78, 2005.

Vieira, M. (2000) A lição da Baía de todos os males. *Revista Época*, 31.jan. p. 36-42.

ZAKARIA, M.P.; OKUDA, T.; TAKADA, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and hopanes in stranded tar-balls on the Coasts of Peninsular Malaysia: applications of biomarkers for identifying sources of oil pollution – **Marine Pollution Bulletin** 42 (12) 1357 – 1366, 2001.

WANG, Z.; FINGAS, M.; BLENKINSOPP, S.; SERGY, G.; LANDRIAULT, M.; SIGOUIN, L.; FOGHT, J.; SEMPLE, K.; WESTLAKE, D.W.S. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. **Journal of Chromatography A**, v. 809, p. 89-107, 1998.

WARD, O. et al. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.30, n.5, p.260-270. 2003.

WEIS, J.S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. **Environment International**, Oxford, v.30, n.5, p.685-700, 2004.

WU, Y.; ZHANG, J.; MI, T-Z; LI, B. Occurrence of  $\alpha$ -alkanes and PAH in the core sediments of the Yellow Sea. **Marine Chemistry**, v. 76, p. 1-15, 2001.

## ANEXO I

Quadro1 – Valores dos parâmetros físico-químicos (pH, E<sub>H</sub>, Temperatura, Oxigênio Dissolvido, Salinidade) para o dias (05/09, 06/09, 11/09 e 18/09) de simulação.

Data de Coleta (5/9/2008)	pH	EH (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,20	40	25,2	37	92	6,7
Ref.	7,30	16	28,4	30	85	6,5
Ref.	7,52	-6	28,2	30	83	5,9
Ref.	7,66	-16	28,5	32	88	6,1
NPK	7,62	-15	29,1	32	82	6,2
NPK	7,70	-19	29,2	32	81	5,9
NPK	7,70	-20	28,7	32	82	6,1
OSM	7,72	-22	28,8	32	82	6,0
OSM	7,77	-24	28,6	31	88	6,6
OSM	7,73	-23	28,6	33	83	6,3
Data de Coleta (6/9/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,59	-10	24,4	33	82	6,6
Ref.	7,62	-12	28,8	32	99	7,5
Ref.	7,75	-20	27,1	32	98	8,0
Ref.	7,78	-24	27,0	31	100	7,6
NPK	7,67	-19	27,0	32	99	7,7
NPK	7,70	-21	26,6	32	98	7,7
NPK	7,65	-19	26,9	32	99	7,5
OSM	7,71	-22	27,1	31	100	7,9
OSM	7,76	-23	27,0	30	98	7,7
OSM	7,76	-24	27,2	30	99	7,4
Data de Coleta (11/9/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,50	-8	25,2	31	64	5,2
Ref.	7,79	-21	25,8	30	86	6,7
Ref.	7,93	-30	25,4	30	90	6,9
Ref.	7,96	-35	25,6	31	90	7,2
NPK	7,83	-29	25,5	31	89	7,3
NPK	7,82	-28	25,4	31	86	6,8
NPK	7,80	-25	25,6	32	89	6,7
OSM	7,95	-33	25,6	32	89	7,1
OSM	7,99	-37	25,5	31	91	7,4
OSM	7,98	-36	25,5	31	96	7,2
Data de Coleta (18/9/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,36	-6	25,8	37	86	6,9
Ref.	7,67	-21	29,0	36	99	6,7
Ref.	7,78	-31	28,0	37	95	6,9
Ref.	7,72	-31	28,3	37	91	6,8
NPK	7,84	-35	28,4	38	100	7,4
NPK	7,75	-36	27,9	38	100	7,4
NPK	7,74	-30	28,4	37	99	7,4
OSM	7,74	31	28,8	39	95	6,5
OSM	7,76	-29	28,5	39	92	6,5
OSM	7,78	-32	28,9	38	100	6,5

Quadro 2 – Valores dos parâmetros físico-químicos (pH, E<sub>H</sub>, Temperatura, Oxigênio Dissolvido, Salinidade) para o dias (01/10, 16/10, 05/11 e 04/12) de simulação.

Data de Coleta (01/10/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,13	-5	27,1	37	7,4	4,8
Ref.	7,05	22	29,4	35	102	7,7
Ref.	7,40	-6	28,9	36	100	7,9
Ref.	7,57	-15	29,1	36	101	7,8
NPK	7,57	-18	29,3	35	100	7,6
NPK	7,73	-25	29,1	37	102	7,9
NPK	7,66	-24	29,3	36	99	7,6
OSM	7,69	-25	29,4	36	101	7,8
OSM	7,70	-25	29,2	36	102	7,9
OSM	7,95	-41	29,2	37	100	7,8
Data de Coleta (16/10/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,37	-4	27,0	35	92	6,6
Ref.	7,78	-29	30,7	30	104	7,7
Ref.	7,62	-22	29,3	31	99	7,6
Ref.	7,84	-34	29,6	32	99	7,6
NPK	7,78	-30	29,8	32	99	7,6
NPK	7,82	-32	29,7	34	96	7,3
NPK	7,83	-32	30,3	34	100	7,6
OSM	7,80	-31	30,3	34	96	7,1
OSM	7,83	-33	30,1	33	95	6,8
OSM	7,80	-31	30,4	32	94	7,0
Data de Coleta (05/11/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,56	-18	28,2	38	71	5,4
Ref.	7,93	-31	30,4	36	113	8,4
Ref.	7,91	-28	29,7	36	105	7,7
Ref.	7,93	-41	30,2	37	105	7,9
NPK	7,94	-39	30,2	39	100	7,6
NPK	7,88	-34	29,9	39	104	8,7
NPK	7,91	-38	30,4	40	108	8,1
OSM	7,92	-38	30,2	40	106	7,9
OSM	8,01	-41	30,3	41	107	8,0
OSM	7,72	-28	30,3	41	105	7,9
Data de Coleta (04/12/2008)	pH	Eh (mV)	Temp. (°C)	Salinidade	O.D.(%)	O.D. (mg/l)
RIO	7,25	45	27,2	34	96	6,2
Ref.	7,79	-39	28,7	32	103	7,8
Ref.	7,83	-41	28,2	33	104	7,8
Ref.	7,78	-39	28,4	33	100	7,7
NPK	7,78	-39	28,4	33	105	8,1
NPK	7,99	-52	28,4	33	104	8,0
NPK	7,31	-11	28,5	32	101	7,8
OSM	7,98	-52	28,5	32	106	8,3
OSM	7,91	-47	28,4	32	105	8,1
OSM	7,82	-42	28,6	33	102	7,9

## ANEXO II

Quadro 3 - Valores dos nutrientes (Fósforo, Amônio e Nitrato) para os dias (04/09, 05/09, 06/09, 11/09 e 18/09) de simulação.

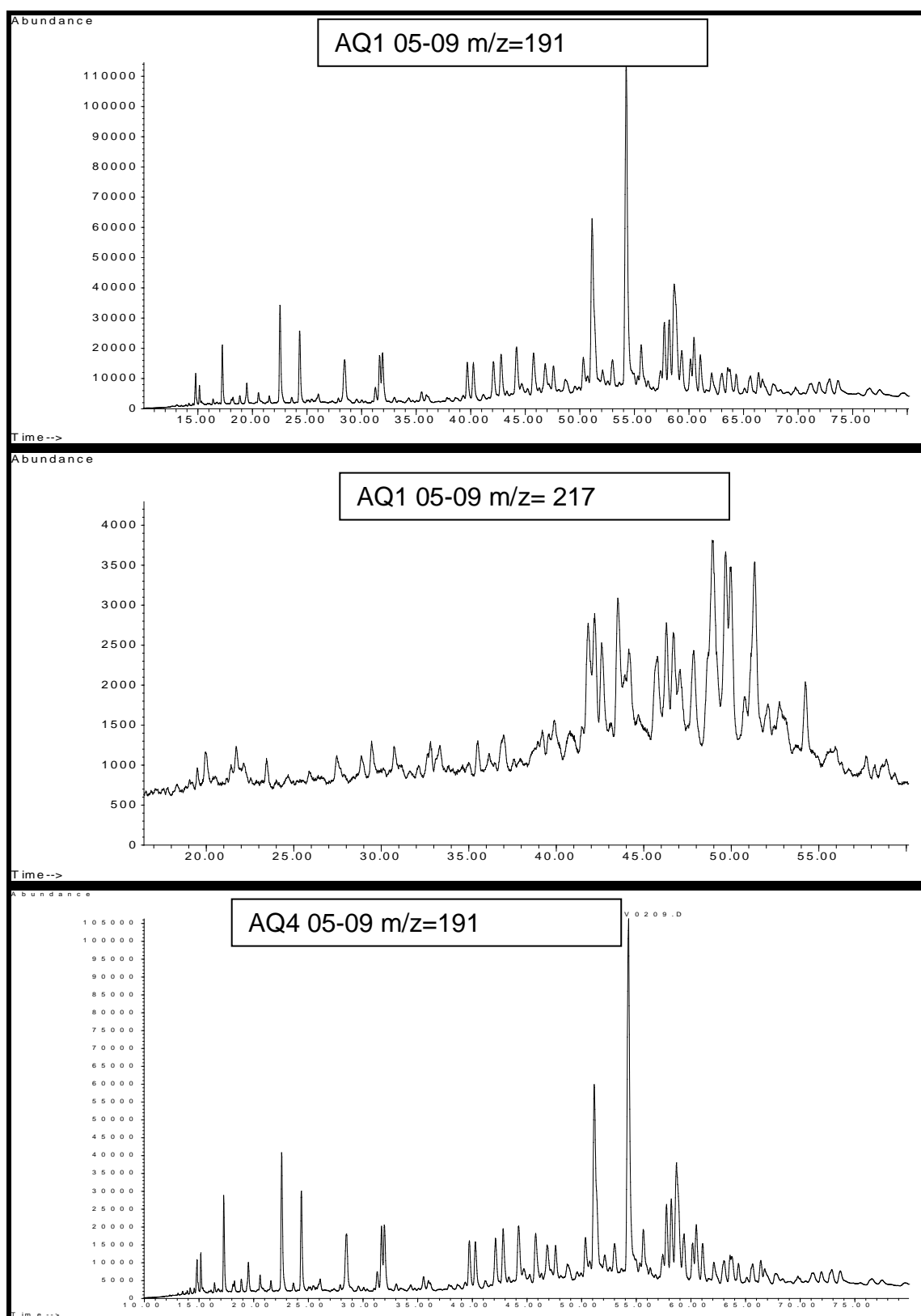
Data de Coleta (4/9/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Manguezal 1	27,85	2,14	2,14
Manguezal 2	27,90	3,21	1,71
Manguezal 3	31,33	1,73	2,16
Data de Coleta (5/9/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	31,30	3,49	3,70
Ref.	31,13	3,41	3,41
Ref.	32,41	3,22	3,87
NPK	153,46	327,46	271,83
NPK	224,92	338,06	281,36
NPK	135,85	304,99	243,46
OSM	34,71	18,28	19,67
OSM	32,55	16,76	14,92
OSM	34,82	26,69	27,10
Data de Coleta (6/9/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	33,59	5,0	4,8
Ref.	31,82	2,3	1,7
Ref.	30,55	2,9	3,3
NPK	200,30	294,6	263,8
NPK	141,35	290,8	236,5
NPK	143,60	270,5	231,7
OSM	36,18	8,2	9,6
OSM	38,35	13,5	16,2
OSM	34,34	17,8	21,4
Data de Coleta (11/9/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	32,12	9,70	7,55
Ref.	31,88	4,38	6,56
Ref.	32,09	4,90	3,63
NPK	133,68	180,06	172,06
NPK	192,61	253,36	222,65
NPK	144,91	276,85	238,29
OSM	49,94	38,82	40,29
OSM	45,06	30,95	34,89
OSM	42,03	25,23	20,45
Data de Coleta (18/9/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	32,12	9,70	7,55
Ref.	31,88	4,38	6,56
Ref.	32,09	4,90	3,63
NPK	133,68	180,06	172,06
NPK	192,61	253,36	222,65
NPK	144,91	276,85	238,29
OSM	49,94	38,82	40,29
OSM	45,06	30,95	34,89
OSM	42,03	25,23	20,45

Quadro 4 - Valores dos nutrientes (Fósforo, Amônio e Nitrato) para os dias (01/10, 16/10, 05/11 e 04/12) de simulação.

Data de Coleta (1/10/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	33,29	18,4	21,0
Ref.	34,08	16,4	17,2
Ref.	24,82	31,4	32,2
NPK	165,24	15,8	19,9
NPK	108,77	18,5	29,9
NPK	189,26	21,78	24,39
OSM	86,51	33,58	40,75
OSM	87,46	60,78	62,59
OSM	82,05	44,00	53,05
Data de Coleta (16/10/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	24,94	5,6	8,0
Ref.	37,50	5,0	5,8
Ref.	27,55	5,0	6,6
NPK	165,20	9,1	9,8
NPK	180,49	8,0	8,5
NPK	177,38	12,48	13,28
OSM	56,27	41,80	45,47
OSM	99,41	41,20	47,01
OSM	96,90	38,78	39,83
Data de Coleta (05/11/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	34,65	5,8	8,5
Ref.	32,50	5,8	7,2
Ref.	29,08	5,6	7,2
NPK	156,27	8,1	8,8
NPK	140,14	9,8	10,6
NPK	142,52	8,50	9,83
OSM	81,32	15,98	17,29
OSM	147,50	46,23	49,40
OSM	72,99	11,89	15,32
Data de Coleta (04/12/2008)	FÓSFORO Assimilável (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amônio (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Kg <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Kg <sup>-1</sup> )
Ref.	18,40	8,77	10,52
Ref.	18,30	9,57	10,83
Ref.	18,02	9,26	10,51
NPK	129,00	11,08	11,83
NPK	147,56	11,21	11,46
NPK	89,47	11,09	11,60
OSM	138,43	26,87	29,72
OSM	193,03	24,05	24,56
OSM	102,35	24,40	28,18

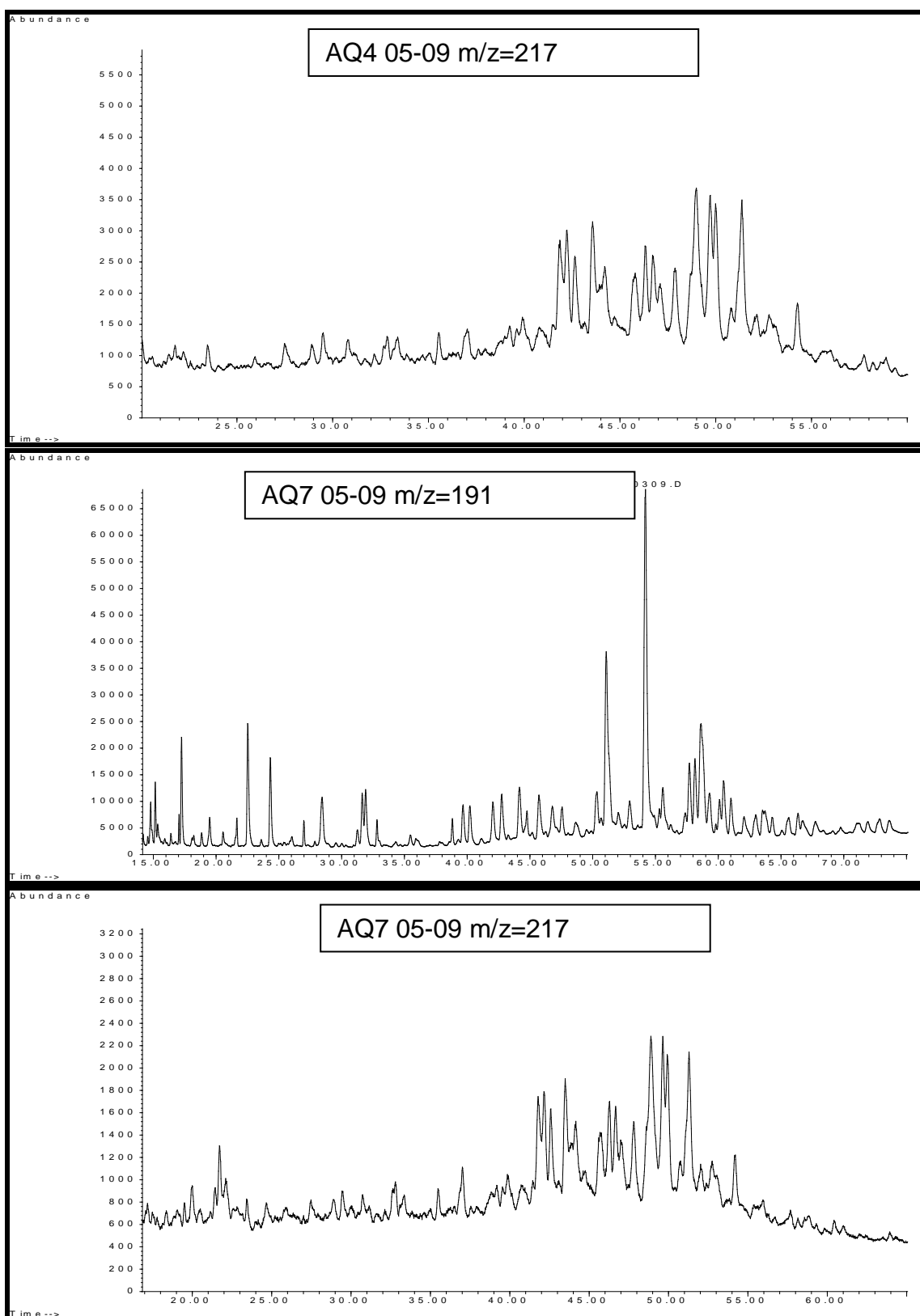
## ANEXO III

## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados

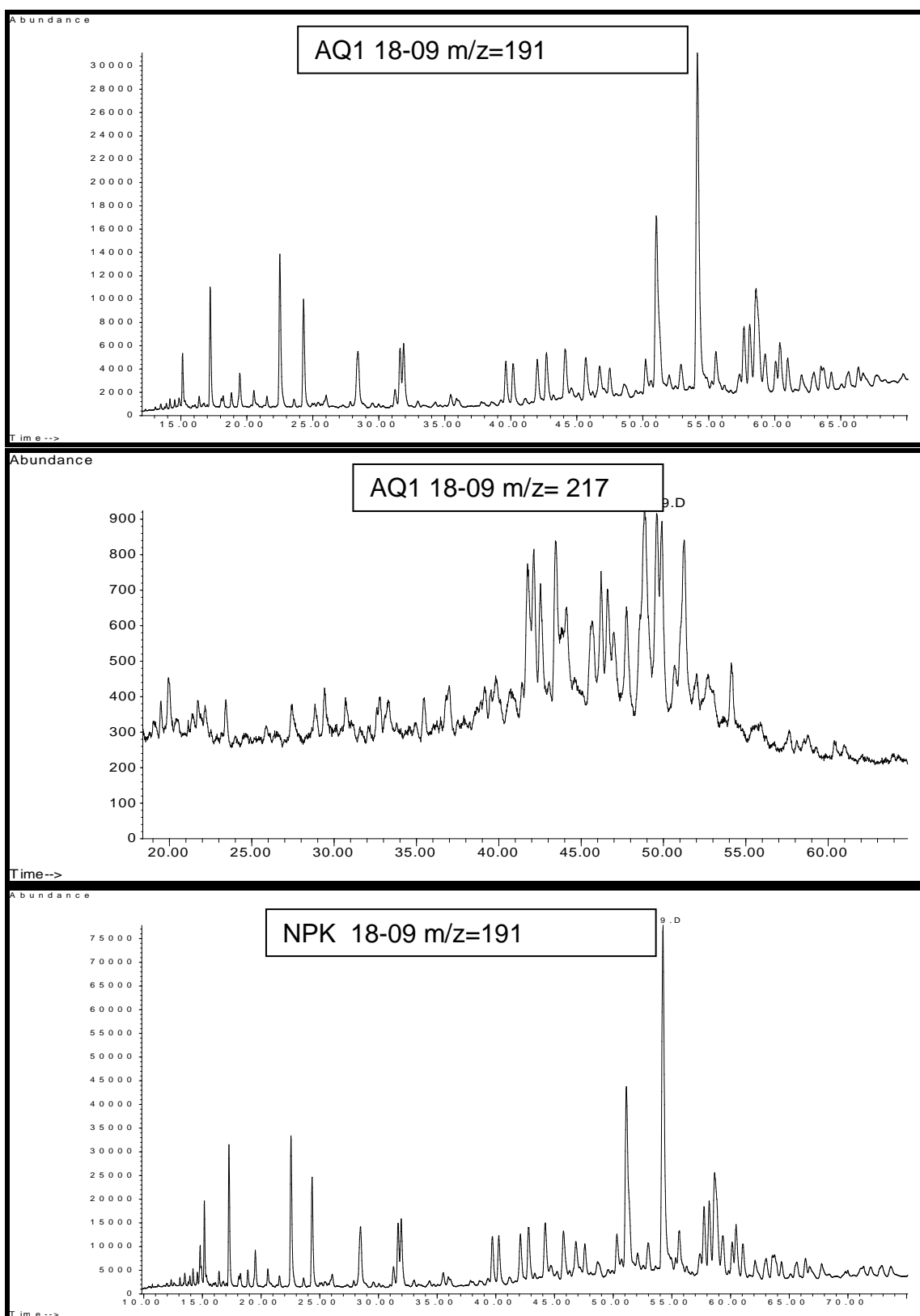




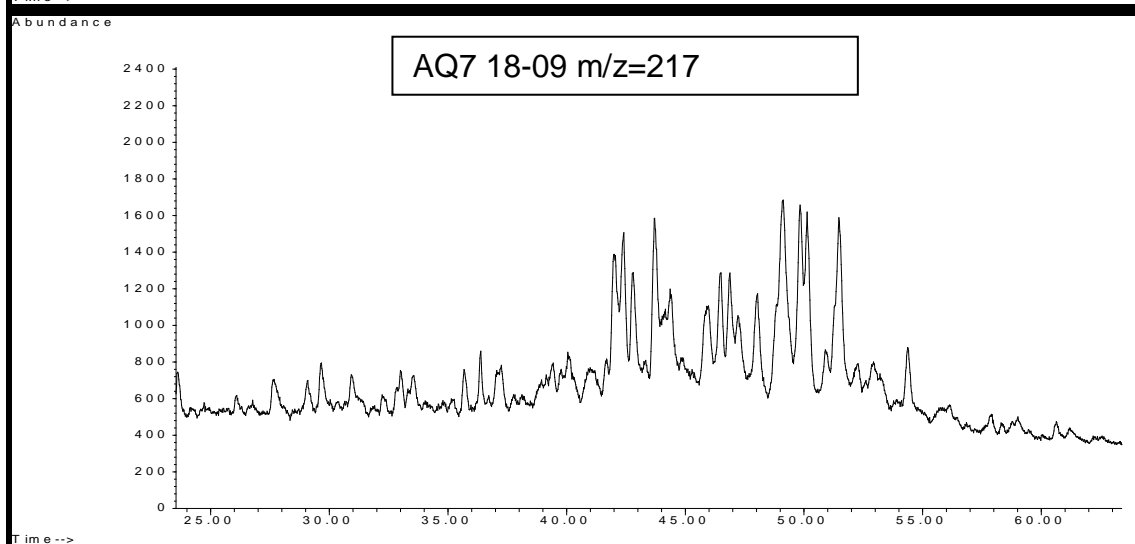
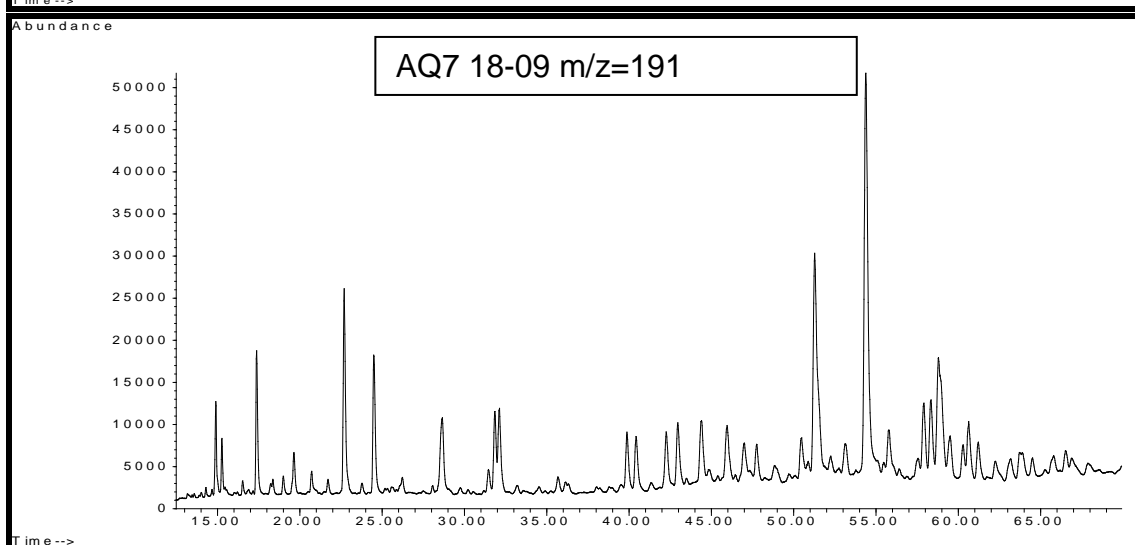
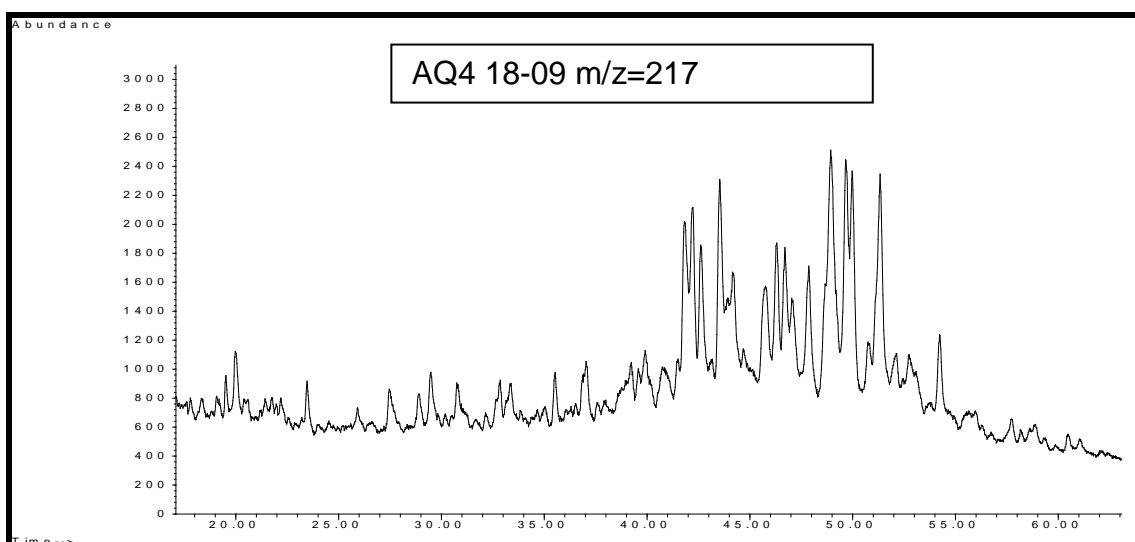
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



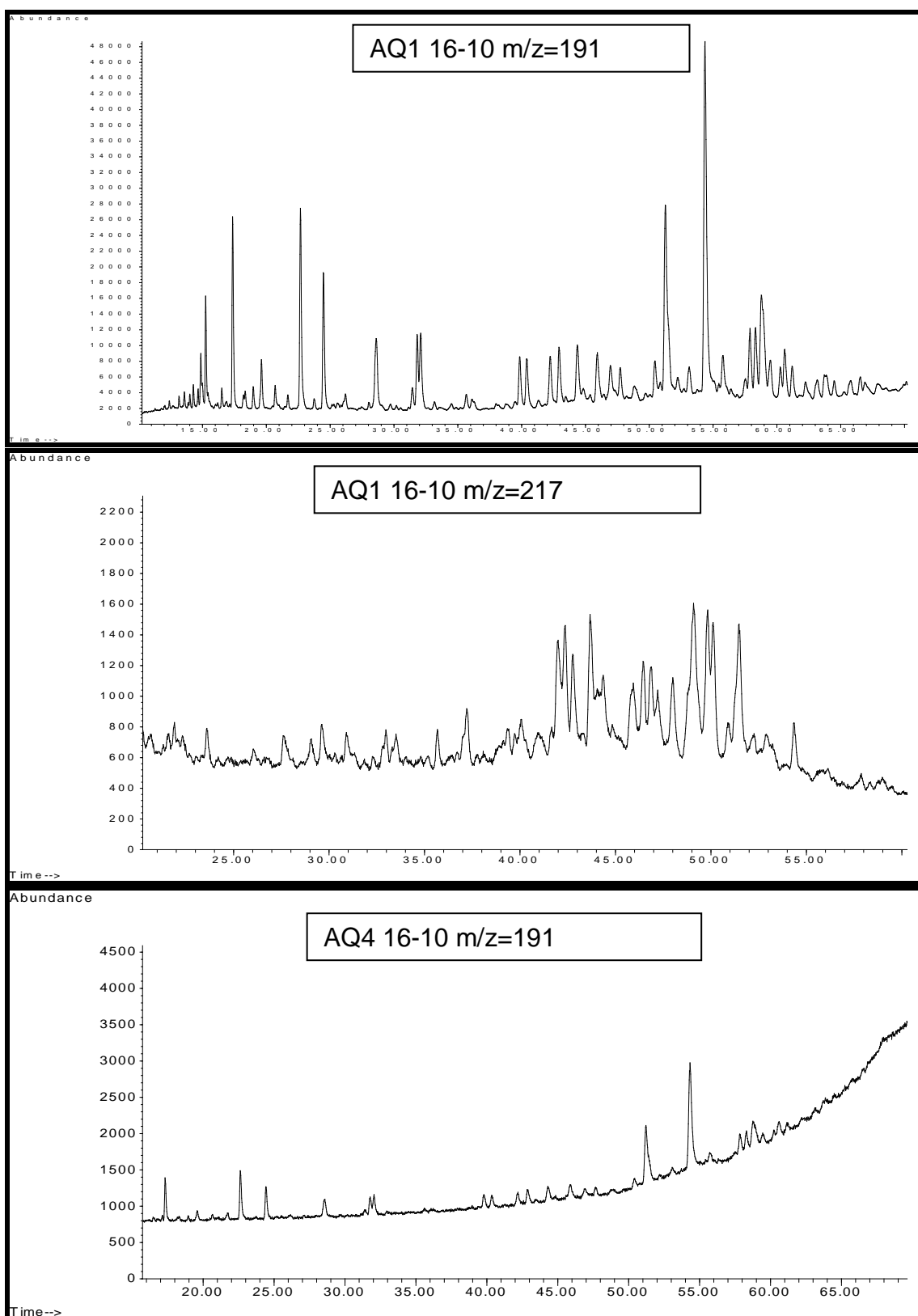
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



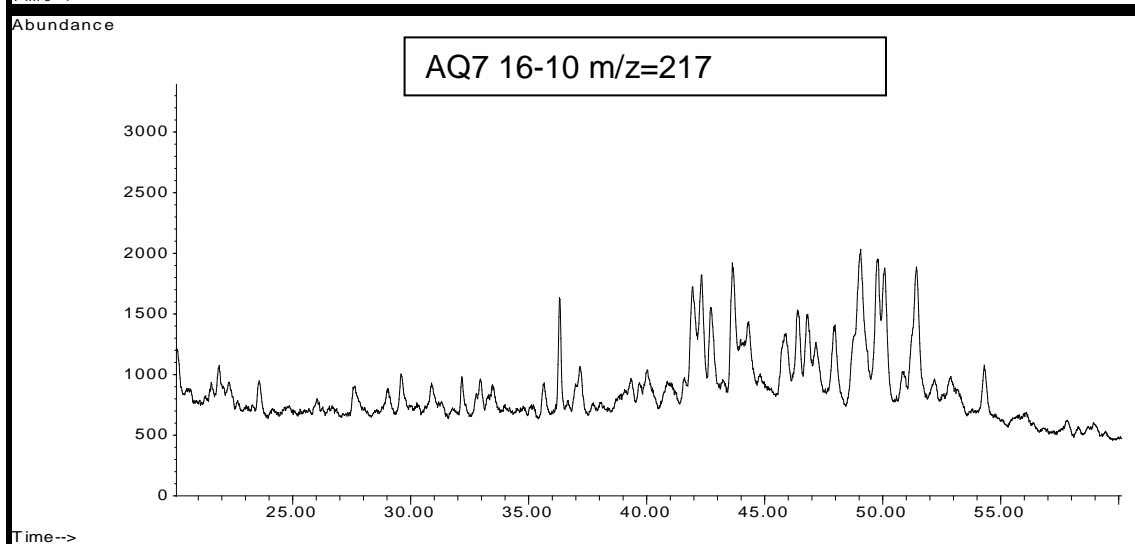
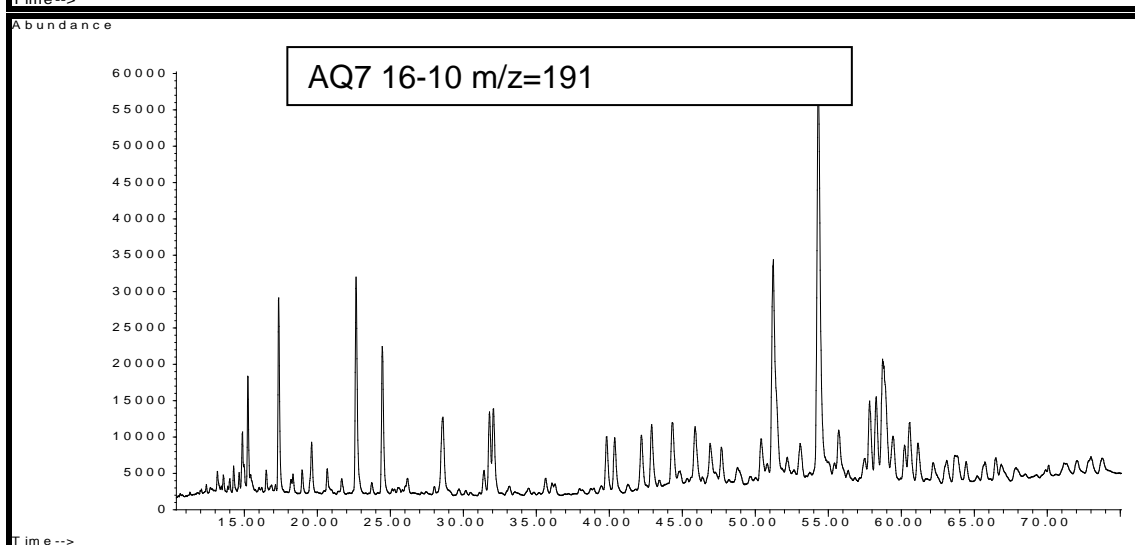
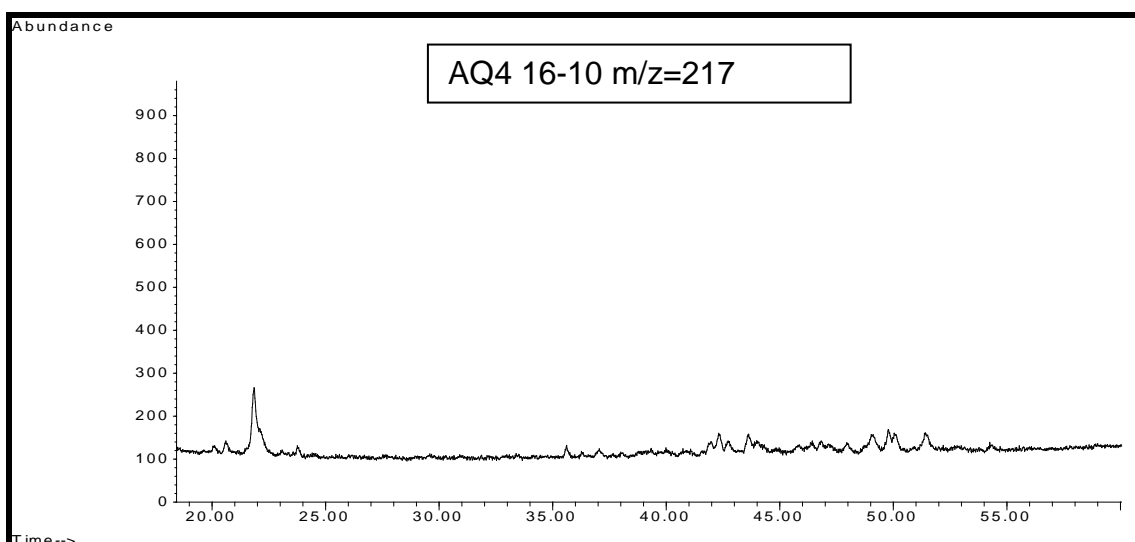
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



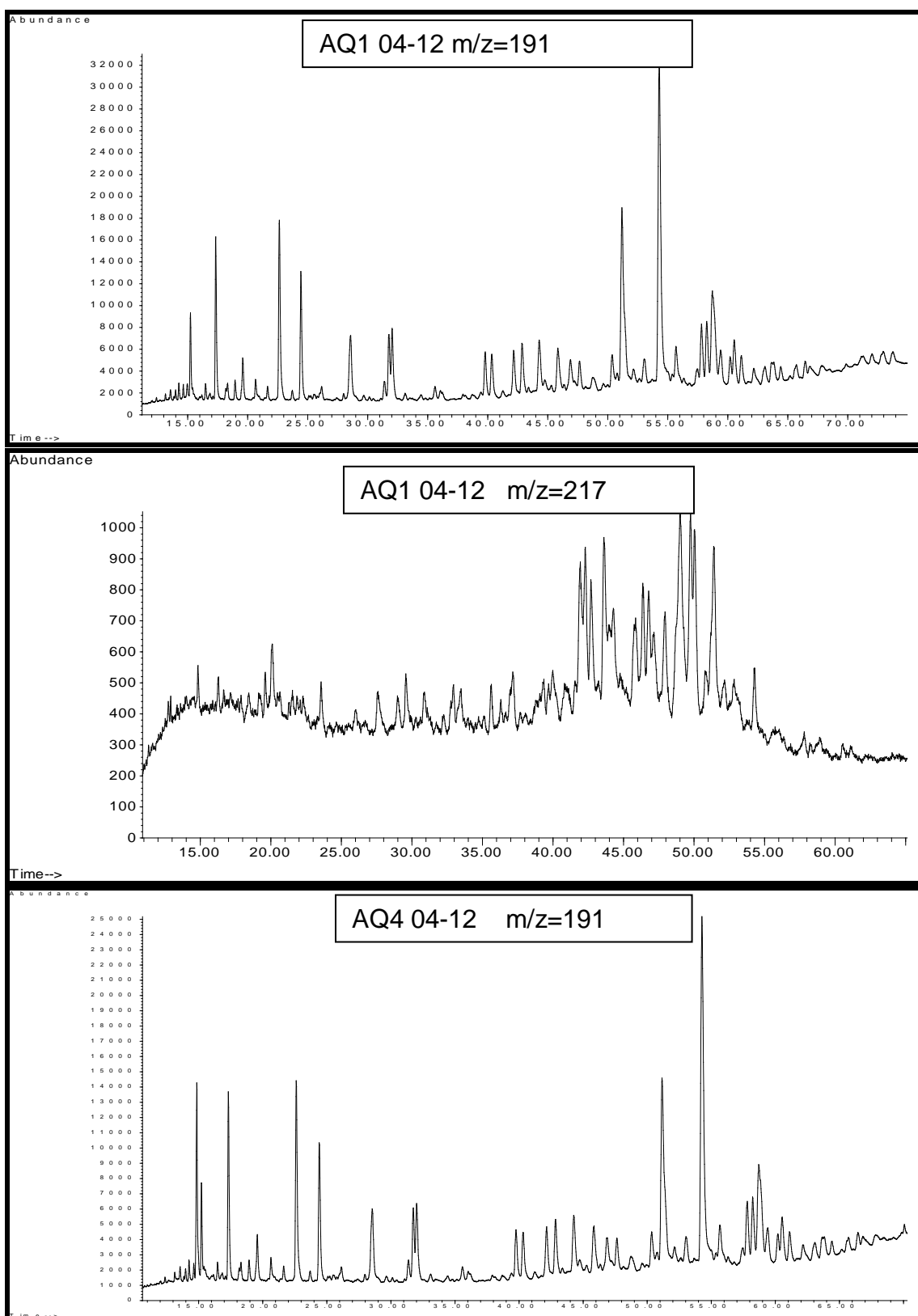
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



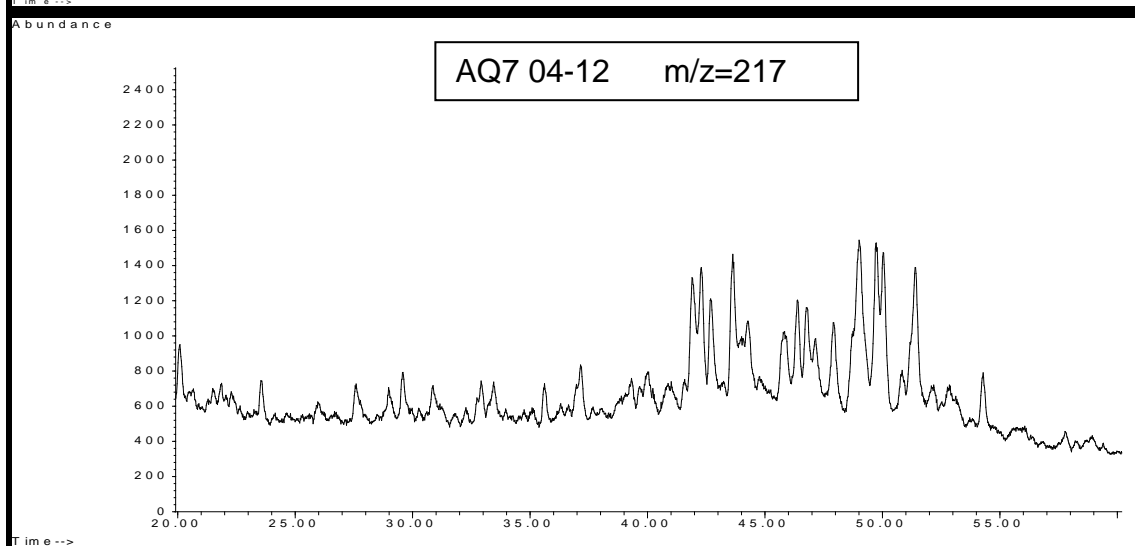
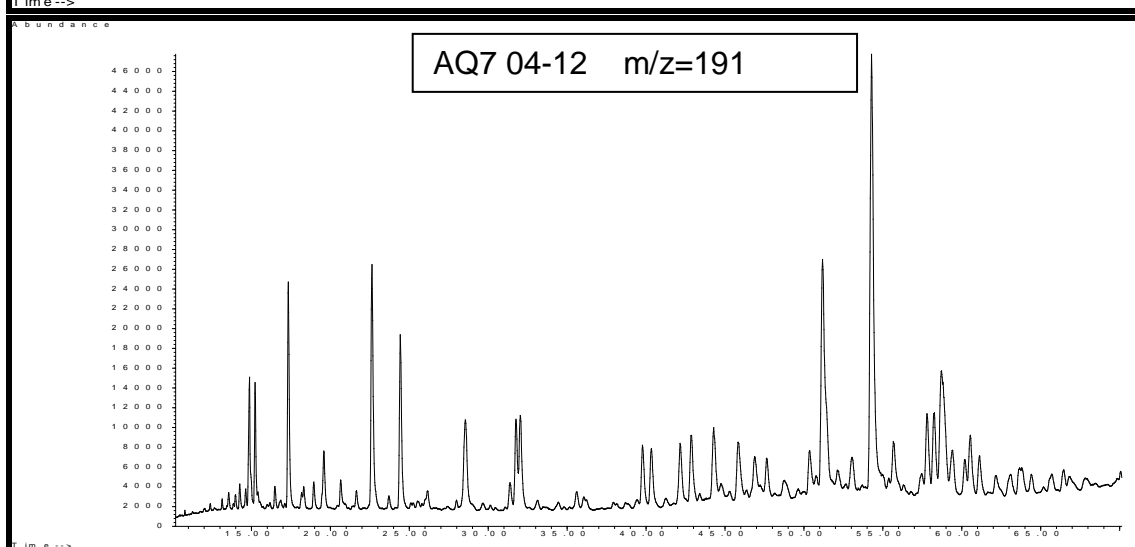
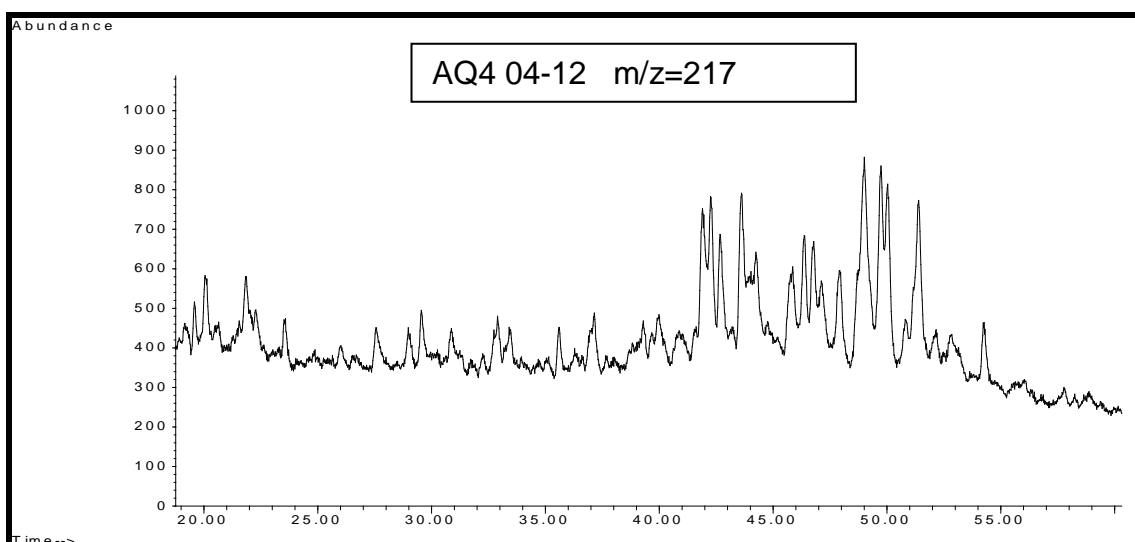
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados

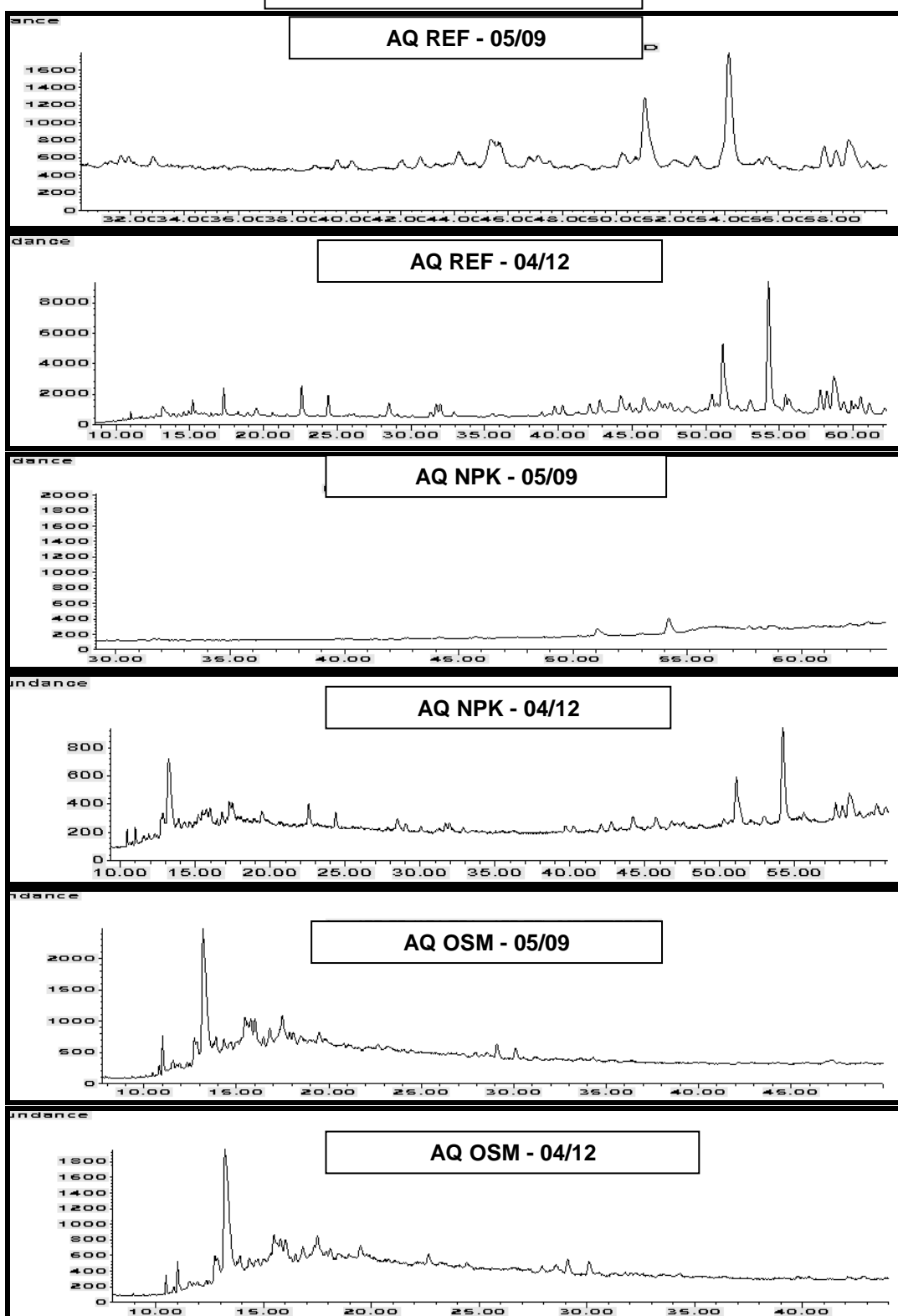


## Fragmentogramas dos Biomarcadores Saturados



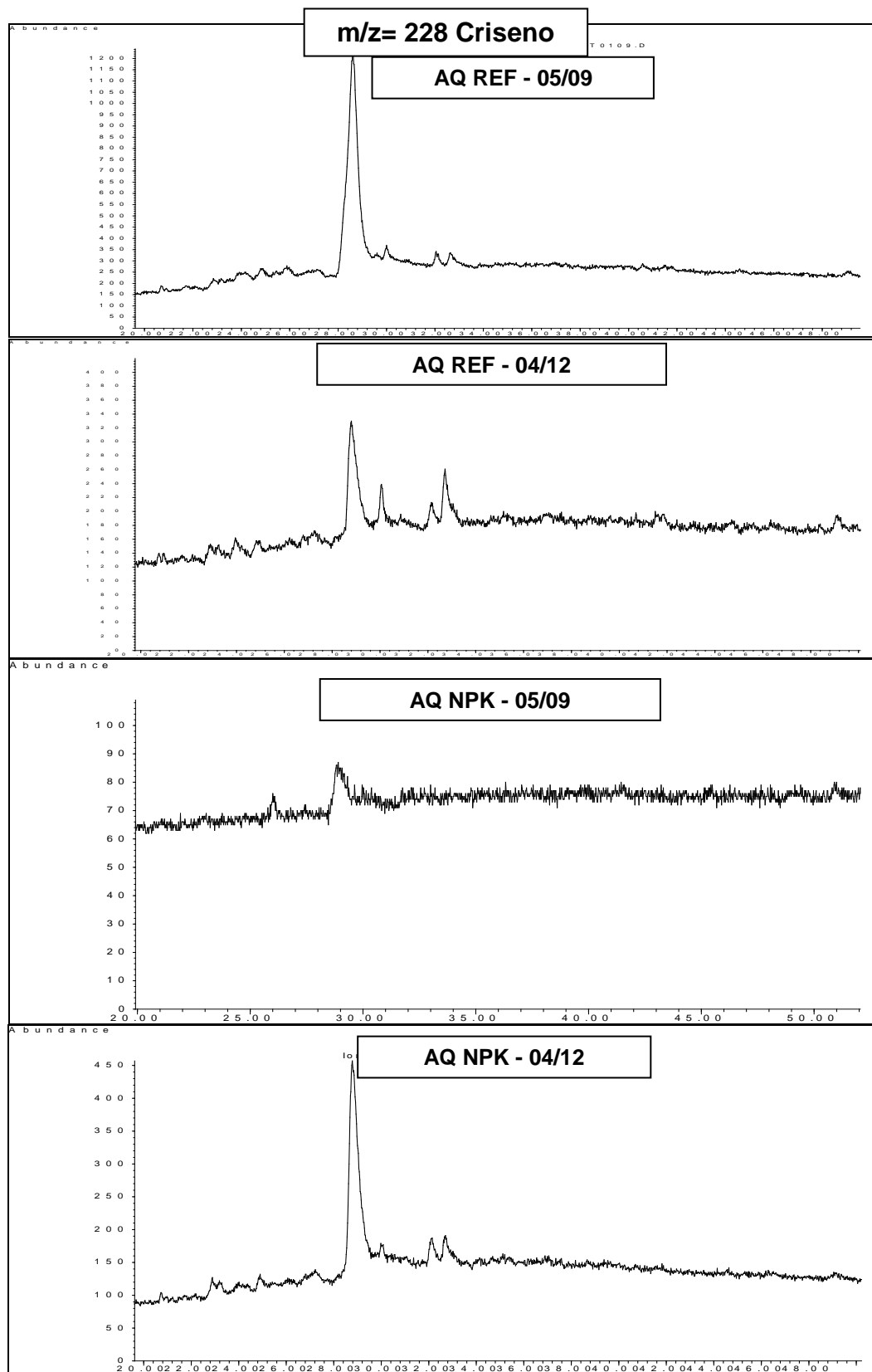
## Fragmentogramas dos Biomarcadores Aromáticos (HPA)

m/z=192 Metil fenantrenos

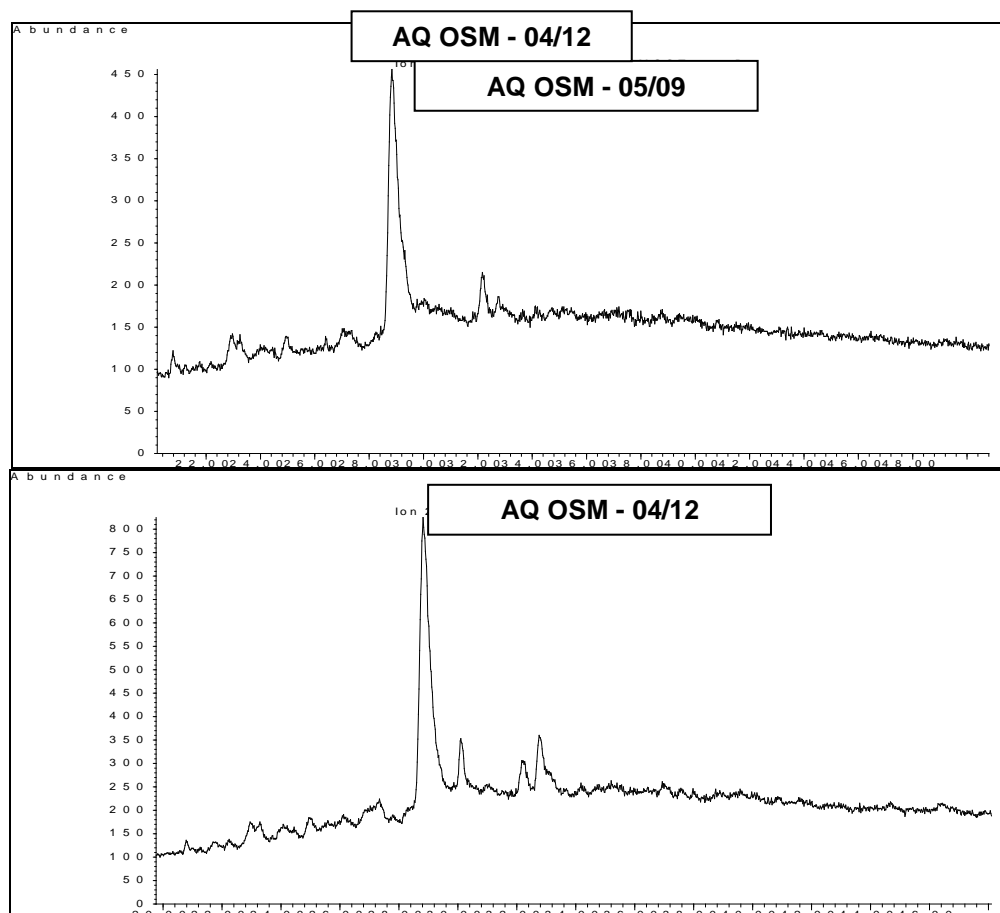




## Fragmentogramas dos Biomarcadores Aromáticos (HPA)



## Fragmentogramas dos Biomarcadores Aromáticos (HPA)



## ANEXO IV

### Metodologia

#### Granulometria

A granulometria das amostras de sedimento foi avaliada com a finalidade de quantificar os teores de argila, silte e areia. Para caracterização do tamanho granulométrico das amostras, utilizou-se um analisador de partículas com difração a Laser Modelo Cilas 1064, sendo a classificação feita segundo Folk & Ward (1957). O método consistiu em pré-tratamento da amostra com peróxido de hidrogênio para degradar a matéria orgânica. Após essa etapa, adicionou-se hexametáfosfato de sódio e agitou-se por 24hs, para evitar floculação. Como resultado obteve-se a porcentagem das frações granulométricas. Estes dados foram convertidos em informações gráficas e numéricas utilizando um programa livre de análises granulométricas GRADSTAT, desenvolvido por Simon Blott (London University).

#### Carbono Orgânico Total (COT)

O Carbono Orgânico contido na amostra de sedimento foi determinado pelo método de Walkey-Black (1947), adaptado e modificado por Jackson (1958). Este método diferencia material húmus proveniente de diferentes fontes de carbono orgânico na forma de grafite e carvão. O Dicromato de Potássio oxida a matéria orgânica presente no solo ou sedimento (Material Químico Orgânico e Material Biológico) e gera íons cromo III de cor verde, sendo o excesso de dicromato titulado com sulfato ferroso amoniacal. A oxidação da maioria dos compostos orgânicos é de 95 a 100 % do valor teórico.

Para determinação, num erlenmeyer de vidro de 500mL, adicionou-se, aproximadamente 0,5g de amostra, 10mL de  $K_2Cr_2O_7$  1,0 N e 20mL da mistura  $H_2SO_4 - Ag_2SO_4$ . Agitou-se por 1 minuto para garantir a completa mistura entre o reagente e sedimento. Após 30 minutos, adicionou-se 200mL de água destilada, 10mL de  $H_3PO_4$  85%, aproximadamente 0,2g de NaF e 0,5mL de indicador difenilamina. A titulação foi feita com sulfato ferroso amoniacal  $0,5mol L^{-1}$  até o aparecimento de uma coloração verde brilhante.