

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES ORGÂNICOS GEOQUÍMICOS EM AMOSTRAS DE SEDIMENTOS MARINHOS**Edna Wisnieski<sup>#</sup>, Liziane M. M. Ceschim e César C. Martins\*

Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 61, 83255-976 Pontal do Paraná – PR, Brasil

Recebido em 15/01/2016; aceito em 01/04/2016; publicado na web em 06/06/2016

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR GEOCHEMICAL ORGANIC MARKERS DETERMINATION IN MARINE SEDIMENTS. This paper describes the validation of an alternative method for determination of *n*-alkanes, sterols (OLs) and *n*-alkanols (ALCs) in marine sediments, through adaptation of clean up. The method reduced the material consumption, the discards produced and working time. The recovery percentages were 60-129% for *n*-alkanes, 52-67% for OLs and 43-141% for ALCs, acceptable values compared to other studies. The application in Antarctic marine sediments presented satisfactory results indicating contribution of planktonic organisms, higher animals and a little contribution from vegetation.

Keywords: organic markers; sediments; gas chromatography; Antarctica.

**INTRODUÇÃO**

Marcadores orgânicos geoquímicos são compostos com características como estabilidade química e resistência à degradação, e por isso podem ser utilizados como indicadores de eventos e processos ao longo do tempo.<sup>1</sup> Entre os principais marcadores utilizados atualmente podemos citar os esteróis, *n*-alcanos, ácidos graxos, *n*-alcanóis, alquenonas, entre outros. São amplamente empregados na avaliação de origem e distribuição de matéria orgânica marinha, de alterações ambientais, assim como na identificação de contaminação ambiental associada às atividades antrópicas.<sup>2-5</sup>

O principal destino de marcadores orgânicos após serem introduzidos em ecossistemas aquáticos são os sedimentos de fundo, constituindo um importante compartimento de acumulação destes compostos em níveis mais elevados que aqueles observados na coluna d'água adjacente.<sup>6</sup> Para estudos de transformações ambientais em diferentes escalas de tempo, são empregadas colunas sedimentares (ou testemunhos de sedimentos), que permitem obter registros históricos relacionados aos processos deposicionais.<sup>6</sup> As informações que podem ser geradas remetem a períodos remotos onde as características naturais do ambiente não foram modificadas pela atividade antrópica até períodos recentes, fornecendo um panorama evolutivo de uma série de alterações ambientais.<sup>7-9</sup>

Os diferentes métodos de determinação de marcadores orgânicos utilizados em estudos de geoquímica marinha adotam os seguintes passos: (i) extração, (ii) purificação e fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna, (iii) derivação, que é a conversão de compostos que apresentam grupos hidroxila e carboxila, como é o caso dos esteróis, *n*-alcanóis e ácidos graxos, em formas químicas mais apropriadas para resolução cromatográfica e, por fim; (iv) a análise instrumental que é, geralmente, baseada em cromatografia em fase gasosa e detectores específicos com a finalidade de separação, identificação e quantificação de cada composto.<sup>10-12</sup>

O fracionamento e a purificação do extrato orgânico são passos fundamentais na determinação de compostos provenientes de matrizes sólidas, como os sedimentos marinhos, pois é responsável pela

“limpeza” e separação dos constituintes presentes nas amostras.<sup>13</sup> Geralmente é utilizada uma coluna cromatográfica com adsorventes específicos (sílica e alumina, por exemplo), bem como solventes de diferentes polaridades na eluição dos respectivos compostos.

A eficiência do solvente em selecionar os compostos de interesse adsorvidos na coluna cromatográfica, após eluição do extrato orgânico concentrado, depende da afinidade química com as diversas classes de marcadores orgânicos, do ajuste na quantidade de adsorventes e nos volumes de solventes utilizados para eluição de cada fração. Esses fatores são cruciais para uma separação precisa das diferentes classes de marcadores orgânicos, necessários para uma caracterização ambiental.

Existem diferentes métodos de obtenção da fração lipídica dos sedimentos marinhos, cada qual com especificidades quanto a quantidade de adsorventes e solventes;<sup>11,14,15</sup> quanto às classes de compostos que se pode obter;<sup>16-19</sup> e ainda entre as quantidades de amostra necessária e de material de laboratório e o tempo dispensado no processo laboratorial.<sup>11,12,14,16,20,21</sup>

O método rotineiramente aplicado no Laboratório de Geoquímica e Poluição Marinha (LaGPoM) do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR) apresenta algumas especificidades que acabam limitando-o em alguns pontos, e com o intuito de minimizar essas limitações, o objetivo desse trabalho foi validar um método analítico para a determinação de marcadores orgânicos geoquímicos em sedimentos marinhos para obter diferentes classes de marcadores (por exemplo, *n*-alcanos, esteróis – OLs e *n*-alcanóis – ALCs) em uma única extração, e assim diminuir tempo de trabalho laboratorial, massa necessária de amostras, consumo de material de laboratório e descartes gerados.

**PARTE EXPERIMENTAL****Reagentes**

Para todos os testes foram tomados cuidados prévios antes e durante as análises, tais como alto grau de pureza de solventes, a citar: etanol (EtOH) (99,9% pureza mínima), hexano (95% *n*-hexano) e diclorometano (DCM) (ambos com 99,9% pureza mínima), todos fornecidos pela J.T. Baker e Mallinckrodt Chemicals; e dos reagentes inorgânicos utilizados como adsorventes, a citar: alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – óxido de alumínio 90 ativo, 0,063-0,200 mm, Merck), sílica

\*e-mail: ccmart@ufpr.br

<sup>#</sup>Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos (PGSISCO), Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 61, 83255-976 Pontal do Paraná – PR, Brasil

gel (SiO<sub>2</sub> – sílica gel 60, 0,063 - 0,200 mm, Merck) e sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 98% pureza mínima, J.T. Baker).

Os adsorventes foram calcinados (em forno mufla por 4 horas a 400 °C) e armazenados adequadamente em dessecador sob vácuo até o uso. Para eliminação de possíveis interferências causadas por enxofre, foram utilizados fios de cobre, tratados por 30 minutos em solução de ácido clorídrico (HCl 2 mol L<sup>-1</sup>, preparado de uma solução 37% P.A. – ACS, F.Maia), enxaguados com água destilada, emersos em EtOH e por fim em mistura de 50% *n*-hexano:DCM, utilizada na extração.

Todo material utilizado nas extrações foi devidamente lavado antes de sua utilização, ficando emerso por aproximadamente 12 horas em solução contendo detergente alcalino Extran® (Merck) e, após seco em estufa a aproximadamente 150 °C, o material foi calcinado a 400 °C por 4 horas. O material volumétrico foi seco a temperatura ambiente, e no momento da utilização, lavado 3 vezes com os solventes utilizados no processo, de forma a minimizar a possibilidade de contaminação orgânica do material.

Os padrões de 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol (98% de pureza), 5 $\alpha$ -colestano (99% de pureza), 5 $\beta$ -colestano-3 $\beta$ -ol (> 98% de pureza), 5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ -ol (> 95% de pureza), colest-5-en-3 $\beta$ -ol (94% de pureza), 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol (95% de pureza), 24-etilcolest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol (> 95% de pureza), 24-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol (ca. 65% de pureza) e 24-etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol (> 95% de pureza) foram obtidos da Sigma Aldrich. Os padrões subrogados 1-eicoseno e 1-hexadeceno e o padrão interno 1-tetradeceno foram obtidos da Supelco (99,7 - 99,9% de pureza). Os *n*-alcanos e isoprenóides (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> + pristano + fitano) – DRH-008S-R2, foram obtidos da AccuStandard (98,7 - 100% de pureza). Os *n*-alcanóis *n*-C<sub>12</sub>OH a *n*-C<sub>18</sub>OH foram obtidos da Fluka e os *n*-C<sub>19</sub>OH a *n*-C<sub>30</sub>OH da Sigma-Aldrich, todos com pureza entre 95,7 e 99,9%.

### Otimização do método analítico

O método utilizado para determinar *n*-alcanos e esteróis (OLs) empregado no LaGPoM do CEM/UFPR, assim como verificado em trabalhos anteriores, a citar,<sup>22-25</sup> tem sido executado através da realização de duas extrações independentes, uma para obter os *n*-alcanos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)<sup>21,26,27</sup> e outra para OLs.<sup>16</sup>

Cada extração parte da massa de 20 g de amostra seca, sendo necessárias então, no mínimo, 40 g por amostra para a obtenção dos compostos listados anteriormente, quantidade esta nem sempre alcançada dependendo do método de amostragem. A utilização de solventes e adsorventes, bem como a quantidade de descartes resultantes, também é maior, pois o procedimento de extração e *clean up* é repetido para cada extração realizada de forma independente.

Para validação do método otimizado, optou-se por incluir mais uma etapa de eluição durante o fracionamento em cromatografia de adsorção em coluna no método inicialmente utilizado apenas para a obtenção dos *n*-alcanos e HPAs.<sup>21</sup>

Em colunas cromatográficas de vidro, com dimensões de 0,5 cm diâmetro interno (d.i.) e 37 cm de altura, contendo 3,2 g de sílica 5% desativada com água isenta de compostos orgânicos, 1,8 g de alumina 5% desativada e sulfato de sódio, foram adicionadas uma mistura de padrões externos (analitos listados anteriormente, que se deseja quantificar nas amostras ambientais) de *n*-alcanos, OLs e ALCs, bem como padrões subrogados (1-eicoseno e 1-hexadeceno - F1, e 5 $\alpha$ -androstanol - F3).

As etapas de eluição das frações F1 e F2 (HPAs – não avaliados neste trabalho) foram semelhantes ao método usualmente empregado no LaGPoM, utilizando 10 mL de *n*-hexano para F1 e 15 mL de mistura 30% DCM/*n*-hexano para F2.<sup>21</sup> Para F3, a eluição com 5 mL

de uma mistura EtOH:DCM (1:9), seguido de 20 mL de EtOH foi escolhida para compor o novo método, após a avaliação qualitativa entre testes com volumes e solventes diferentes utilizados na eluição desta fração.

### Método final estabelecido

Uma vez estabelecida a melhor maneira de se realizar a etapa de fracionamento de múltiplos marcadores orgânicos, o método analítico completo (Figura 1) foi validado e empregado na determinação de marcadores orgânicos em sedimentos marinhos da região Antártica. A seguir, são descritos os detalhes do método analítico utilizado.

#### Extração

A extração dos compostos foi feita com base no protocolo estabelecido por UNEP<sup>21</sup> e consiste na extração em sistema Soxhlet, por 8 horas, em 80 mL de solução *n*-hexano/DCM (1:1), partindo de aproximadamente 10 g de sedimento seco, adicionado dos padrões subrogados para *n*-alcanos, OLs, ALCs e de fios de cobre. Em seguida, as amostras foram concentradas em rotavapor a vácuo até aproximadamente 2 mL, e levadas para etapa de purificação e fracionamento.

#### Fracionamento e purificação (clean up)

O *clean up* foi realizado pela passagem do extrato através de uma coluna cromatográfica de vidro (com dimensões de 0,5 cm d.i. e 37 cm de altura), preenchida com 3,2 g de sílica 5% desativada com água destilada isenta de compostos orgânicos, 1,8 g de alumina 5% desativada e sulfato de sódio. A eluição foi realizada utilizando 10 mL de *n*-hexano na F1 (*n*-alcanos); 15 mL de 30% DCM/*n*-hexano para a F2 (HPAs – não avaliados neste trabalho); e 5 mL EtOH:DCM (1:9) seguidos de 20 mL de EtOH para a F3 (OLs e ALCs).

As frações 1 e 2 foram concentradas em rotavapor a vácuo até aproximadamente 0,5 mL, transferidas para ampolas adicionadas dos padrões internos (tetradeceno – F1 e benzo(b)fluoranteno-d<sub>12</sub> – F2), com concentração final de 5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> em F1 e 0,5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> em F2, e aferidas para o volume final de 1 mL com *n*-hexano.

#### Derivação (Fração 3)

A F3 foi evaporada até secagem total do extrato, sendo, em seguida, submetida ao processo de derivação, através da adição de 40  $\mu$ L do reagente N,O-bis(trimetil-silil-trifluoracetamida)/trimetil-cloro-silano (BSTFA/TMCS – 99:1), durante 90 minutos à temperatura aproximada de 70 °C, em banho-maria. O excesso de reagente foi evaporado com N<sub>2</sub> e o sólido resultante foi dissolvido em cerca de 0,5 mL de *n*-hexano, sendo transferido para ampolas, adicionada de padrão interno (5 $\alpha$ -colestano), com concentração final de 2 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>, sendo aferido o volume final de 1 mL com *n*-hexano.

As alterações propostas aos métodos utilizados previamente no LaGPoM<sup>16,21</sup> tornaram viável a obtenção de mais de uma classe de marcadores com uma única extração, reduzindo em 50% o tempo de trabalho em laboratório. Com isso, os custos envolvidos nas análises acabam sendo menores, pois o consumo de materiais e produtos químicos nas extrações diminui. A ausência do uso de metanol, empregado em outros métodos,<sup>3,14</sup> representa menor probabilidade de prejuízos à saúde, pois o etanol é menos tóxico. Outra vantagem é tempo de extração, estabelecido em 8 horas, enquanto em outros métodos, pode-se chegar até 24 horas.<sup>2,12</sup>

#### Análise instrumental

Para a fração F1, foram injetados 1  $\mu$ L da amostra em um cromatógrafo a gás (Agilent GC System 7890A Series), equipado com um detector de ionização em chama (DIC), em modo sem divisão da amostra, utilizando H<sub>2</sub> como gás de arraste. A coluna cromatográfica

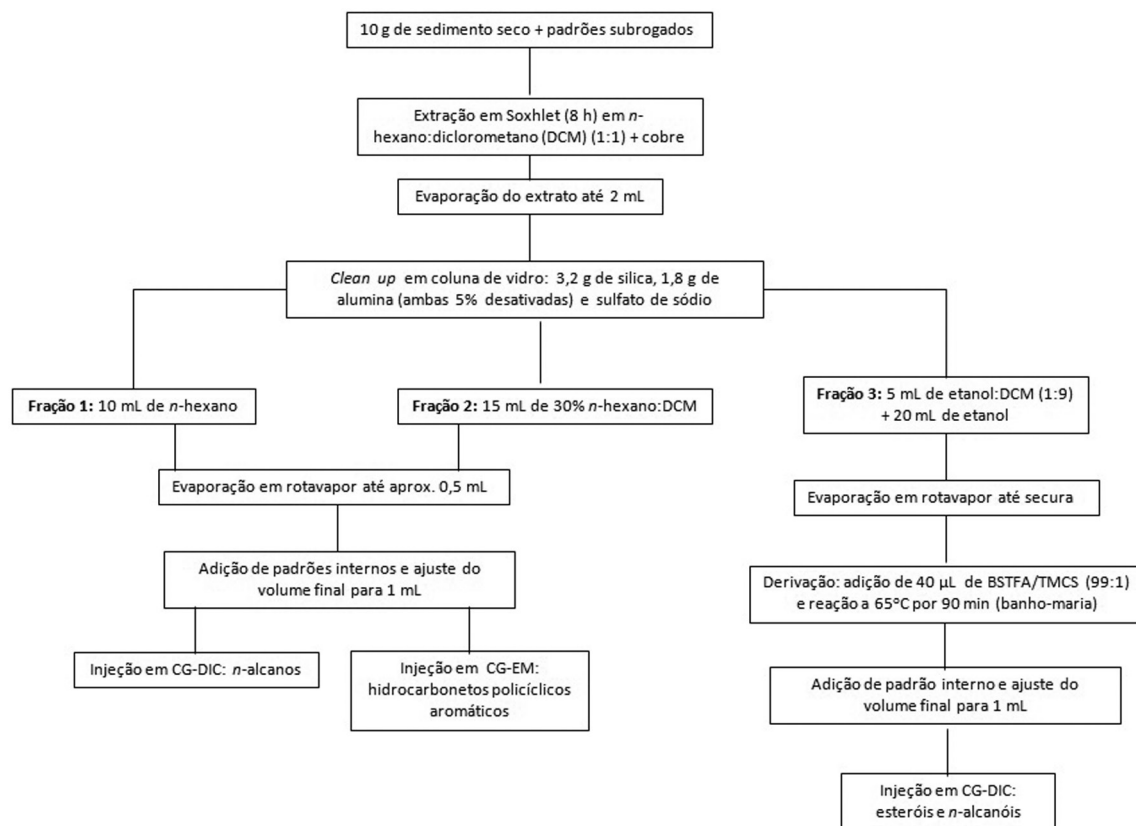


Figura 1. Procedimento analítico validado neste trabalho

utilizada foi HP-5 Agilent 19091J-413, com dimensões de 30,0 m x 0,32 mm x 0,25 µm d.i. As temperaturas do injetor e detector foram de 300 e 325 °C, respectivamente. A temperatura de programação teve início a 40 °C aumentando para 60 °C a uma taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, em seguida para 290 °C a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 5 minutos e, finalmente, para 300 °C a 5 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nessa temperatura por 11 minutos. O fluxo dos gases do detector foi de 30 mL min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub>, 350 mL min<sup>-1</sup> para o ar sintético e 30 mL min<sup>-1</sup> para o N<sub>2</sub> (complementar).

A análise de F3 (OLs e ALCs) também foi realizada através de um cromatógrafo a gás (Agilent GC System 7890A Series), equipado com um DIC e uma coluna cromatográfica HP-5 Agilent 19091J-015 com dimensões de 50 m x 0,32 mm x 0,17 µm d.i. O programa de aquecimento teve início a 40 °C aumentando para 240 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>, em seguida para 245 °C a uma taxa de 0,25 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos, e finalmente, para 300 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. As temperaturas do injetor e detector, o fluxo de gases e demais condições de injeção foram semelhantes àquelas utilizadas na determinação dos *n*-alcenos.

A título de confirmação, foram injetadas amostras de sedimento, contendo compostos que seriam analisados e não dispunham de padrões (*n*-C<sub>26</sub>OH, 24-metilcolest-5,22E-dien-3β-ol, 4α,23,24-trimetil-5α-colesta-22E-en-3β-ol e fitol) sendo previamente identificados através da injeção de extratos em um cromatógrafo a gás (Agilent GC System 7890A Series), equipado com um espectrômetro de massas (Agilent 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector), seguida da análise dos TICs (*Total Ion Chromatograms*) e pela razão *m/z* (faixa de massas de 40 a 550 u.m.a.) característicos dos compostos de interesse.

Para a quantificação, foram construídas curvas analíticas dos compostos, com concentrações da solução de padrões externos de *n*-alcenos e isoprenóides, variando de 0,25 a 10,0 ng µL<sup>-1</sup> e de OLs e ALCs entre 0,25 a 20,0 ng µL<sup>-1</sup>. Todos os compostos apresentaram

índice de correlação linear de Pearson igual ou superior a 99,5% ( $r^2 = 0,995$ ), critério este utilizado para aceitação das mesmas.

A integração dos picos dos compostos foi feita a partir do software ChemStation 3365, da Agilent Technologies, determinando o fator de resposta de cada composto em relação aos padrões subrogados (1-eicoseno, 1-hexadeceno e 5α-androstanol) adicionados no início da extração de cada amostra. A coincidência entre os tempos de retenção dos compostos presentes nas amostras e nas soluções de padrões externos foi considerada como fator de identificação dos compostos nas amostras.

A quantificação foi feita a partir das áreas obtidas para cada composto analisado nas amostras, multiplicadas pelo fator de resposta da curva de calibração, em relação à razão massa/área do padrão subrogado adicionado em cada amostra. Todas as concentrações são expressas em µg g<sup>-1</sup> de sedimento seco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação do método otimizado

#### Repetibilidade das Colunas

Após definida a mistura de solvente para o *clean up* da F3, um teste de repetibilidade foi feito, para testar a precisão e eficiência do método. Para tal, foi realizada a extração de 5 réplicas de sedimento, de uma amostra de sedimento coletada na região do Canal da Cotinga, Baía de Paranaguá, PR, (25°30'47"S; 48°29'47"O), caracterizada por 94,9% de areia, 5,1% de silte e 3,6% de teor de matéria orgânica. Essa amostra foi escolhida por já ter sido analisada anteriormente, e ter suas concentrações conhecidas para OLs.

Em amostras de sedimento (10 g), foram adicionados os padrões subrogados para determinação de *n*-alcenos, OLs e ALCs e submetidas ao método estabelecido.

Dos compostos analisados em F1, 83,3% apresentaram variabilidade menor do que 25% (Tabela 1S), enquanto em F3, tanto OLs

quanto ALCs apresentaram variabilidade inferior a 20% para todos compostos avaliados (Tabelas 2S e 3S). De acordo com Denoux *et al.*,<sup>28</sup> é considerado confiável o método que obtenha no mínimo 75% dos compostos analisados dentro da faixa de valores aceitáveis, com um desvio padrão inferior a 25%.

A Figura 2 mostra a variabilidade individual de cada um dos compostos avaliados considerando as réplicas avaliadas. Segundo Wade & Cantillo,<sup>29</sup> um mínimo de três réplicas é necessário para validação do método, de modo que a avaliação de quatro réplicas satisfaz esta condição analítica.

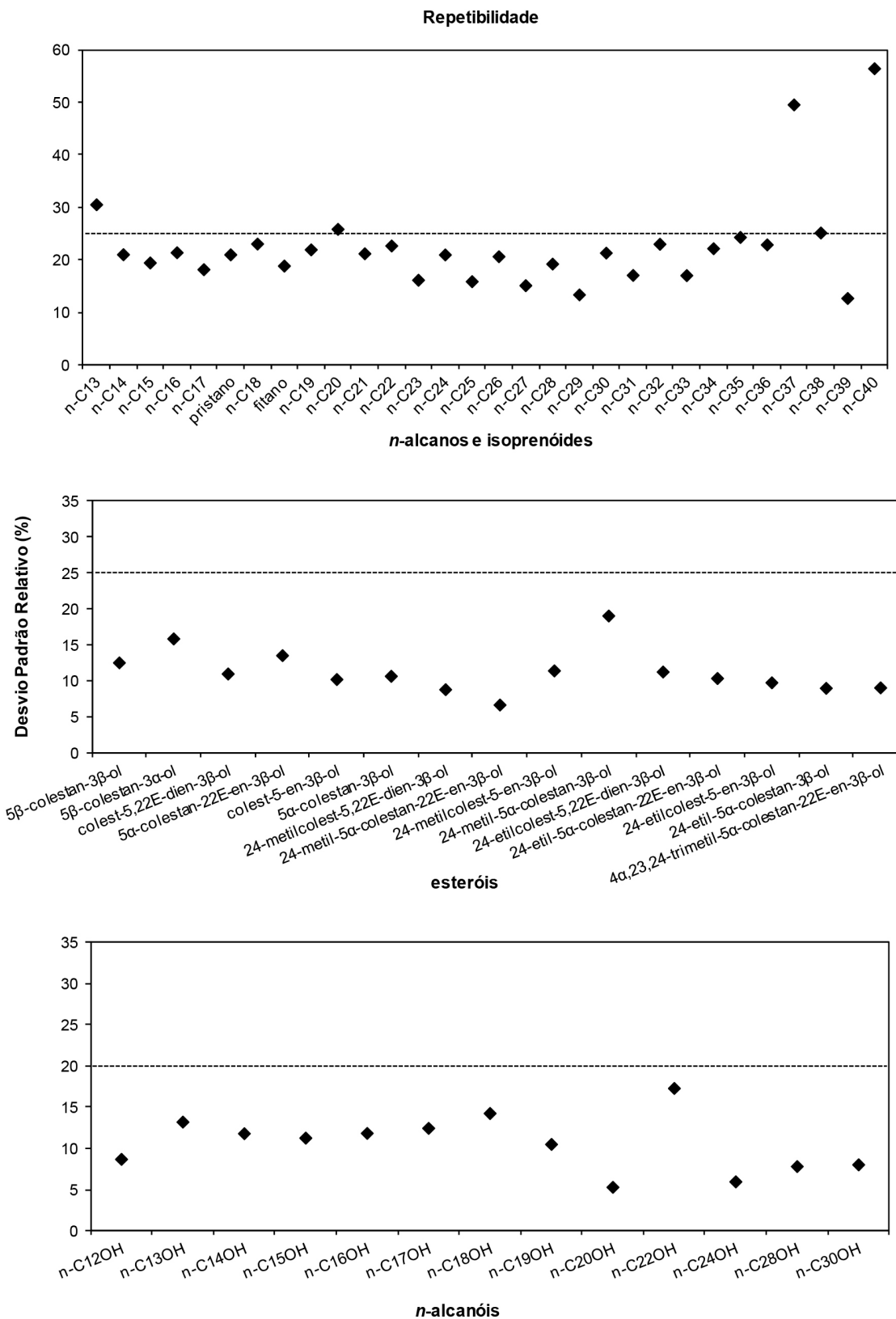


Figura 2. Gráfico da porcentagem de variabilidade média de cada composto avaliado através do teste de repetibilidade

Uma vez que a principal mudança no método analítico previamente estabelecido se deu na obtenção da F3, os resultados encontrados para os esteróis no teste de variabilidade foram comparados com os obtidos pelo método proposto por Kawakami & Montone.<sup>16</sup>

Os resultados mostram que o desvio padrão relativo para a mesma amostra analisada por dois métodos diferentes ficou abaixo de 20% para 92,3% dos compostos analisados (Tabela 4S), indicando que não houve diferença significativa ( $R^2 = 0,93$ ) entre os dois métodos de análise para a maioria dos OLS. Portanto, os dados obtidos com o método testado fornecem resultados semelhantes a um método específico, empregado na análise de OLS.<sup>16</sup>

#### Material de Referência e Exercício de Intercalibração

Foi realizada a análise de uma amostra de material de referência certificado para os *n*-alcanos (IAEA-417)<sup>30</sup> preparado pelo *Marine Environment Laboratory* (MEL), *International Atomic Energy Agency* (IAEA).

Ao material de referência IAEA 417 (2 g), foram adicionados os padrões subrogados para determinação de *n*-alcanos, OLS e *n*-alcanóis e submetidas ao método estabelecido anteriormente.

Comparando os valores obtidos para o material certificado IAEA-417 com seus valores de referência, todos os resultados dos compostos analisados nesse trabalho encontram-se dentro da faixa aceitável estabelecida no relatório de avaliação deste sedimento (Tabela 5S), indicando que o método testado pode ser empregado na determinação de *n*-alcanos.

Para os OLS, não há um material de referência reconhecido, porém existe um exercício de intercalibração (IAEA-408), também preparado pela *Marine Environment Laboratory* (MEL), *International Atomic Energy Agency* (IAEA). Por não ser certificado para OLS, o método é considerado confiável se 80% dos compostos analisados estiverem dentro da faixa apresentada no relatório do exercício, acrescido de  $\pm 30\%$ .<sup>28</sup> A avaliação geral dos resultados mostra que 80% dos compostos encontraram-se dentro da faixa de valores aceitável (Tabela 6S).

#### Matriz Fortificada

Com o objetivo de avaliar o comportamento dos compostos a serem analisados, durante o processo de extração, *clean-up* e cromatografia, um teste com uma matriz fortificada, ou seja, amostras adicionadas de analitos de interesse, foi realizado.

Para a análise da matriz fortificada (a mesma amostra utilizada para o teste de repetibilidade), os sedimentos foram calcinados em forno mufla a 400 °C, por 5 horas, para remoção de componentes orgânicos. Uma mistura contendo padrões externos, com concentração conhecida, de *n*-alcanos, pristano, fitano, OLS e ALCs foi adicionada a estes sedimentos calcinados, sendo que a concentração final dos compostos deve corresponder a essa adicionada no início do processo.

Das sete amostras de sedimento fortificadas, todas apresentaram recuperações satisfatórias para os *n*-alcanos e isoprenóides (Tabela 7S), com valores entre 60,6 (*n*-C<sub>10</sub>) a 129,1% (*n*-C<sub>16</sub>) com média de  $94,2 \pm 15,4\%$  (Figura 3).

Já os OLS avaliados em seis réplicas da F3 apresentaram valores entre 52,3 (24-etil-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol) a 66,7% (colest-5-en-3 $\beta$ -ol), com média de  $53,1 \pm 5,2\%$  (Figura 3) (Tabela 8S), enquanto ALCs avaliados em cinco réplicas encontraram-se dentro da faixa aceitável, com valores entre 42,9 (*n*-C<sub>16</sub>OH) e 140,8% (*n*-C<sub>24</sub>OH) e média de  $95,2 \pm 29,5\%$  (Figura 3) (Tabela 9S). Desta maneira, todas as frações apresentaram valores dentro da faixa aceitável sugerida por Qian & Jackson,<sup>31</sup> onde 80% dos compostos analisados devem apresentar recuperação entre 40 e 140%.

Os valores de recuperação encontrados são compatíveis com aqueles reportados por outros trabalhos. Damas *et al.*<sup>12</sup> verificou valores de 65,1 a 105,6% para *n*-alcanos. Em Freitas<sup>32</sup>, a recuperação

foi de 67,6 a 139,0% para *n*-alcanos. Martins *et al.*<sup>25</sup> apresentou recuperações de 45 a 120% para *n*-alcanos e de 41 a 125% para OLS. Para esteróis foram verificados valores de 50 a 120% em Kawakami & Montone<sup>16</sup> enquanto que Carreira *et al.*<sup>33</sup> apresentou o valor médio de  $80,1 \pm 13,2\%$ . Ainda, Carreira *et al.*<sup>34</sup> apresentou valores médios de recuperação de  $99 \pm 18\%$  para OLS e  $76 \pm 15\%$  para ALCs.

#### Limite de detecção do método

O limite de detecção do método (LDM) consiste na concentração mínima de uma substância que pode ser determinada pelo método com 99% de confiança em uma matriz.<sup>29</sup> Uma das maneiras de calcular o limite de detecção é através do desvio padrão (DP) de, no mínimo, cinco replicatas da mesma amostra ( $LDM = 3x DP$ ).

O cálculo do LDM levou em conta as amostras adicionadas de padrões externos, utilizadas no teste de matrizes fortificadas. Para os compostos que são analisados, mas que não se dispõem de padrões foi considerado o LDM de um composto com estrutura química semelhante (por exemplo, número de carbonos), e presente na amostra.

A partir destes cálculos, o LDM para os *n*-alcanos e isoprenóides presentes na F1 foi estabelecido entre 0,004  $\mu g g^{-1}$  (*n*-C<sub>26</sub>) e 0,012  $\mu g g^{-1}$  (*n*-C<sub>16</sub>), com valor médio de  $0,007 \pm 0,002 \mu g g^{-1}$  (Tabela 10S).

Para os OLS (F3), o valor do limite de detecção variou de 0,002  $\mu g g^{-1}$  (5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ -ol e 24-metilcolest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol) até 0,006  $\mu g g^{-1}$  (5 $\beta$ -colestano-3 $\beta$ -ol, colest-5-en-3 $\beta$ -ol e 24-etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol), sendo a média de  $0,005 \pm 0,002 \mu g g^{-1}$  (Tabela 11S), enquanto para os ALC (F3), os valores ficaram entre 0,011  $\mu g g^{-1}$  (*n*-C<sub>14</sub>OH, *n*-C<sub>17</sub>OH, *n*-C<sub>20</sub>OH e *n*-C<sub>24</sub>OH) e 0,020  $\mu g g^{-1}$  (*n*-C<sub>16</sub>OH), com média de  $0,018 \pm 0,007 \mu g g^{-1}$  (Tabela 12S).

Os valores de LDM obtidos nesse trabalho são compatíveis com aqueles reportados por outros trabalhos. Damas *et al.*<sup>12</sup> encontrou valores variando entre 0,019 a 0,036  $\mu g g^{-1}$  para *n*-alcanos; enquanto que Freitas<sup>32</sup> verificou valores entre 0,001 a 0,006  $\mu g g^{-1}$  para *n*-alcanos. Já Martins *et al.*<sup>25</sup> apresentou o valor médio de 0,001  $\mu g g^{-1}$  para *n*-alcanos e 0,01  $\mu g g^{-1}$  para OLS.

#### Branco de Extração

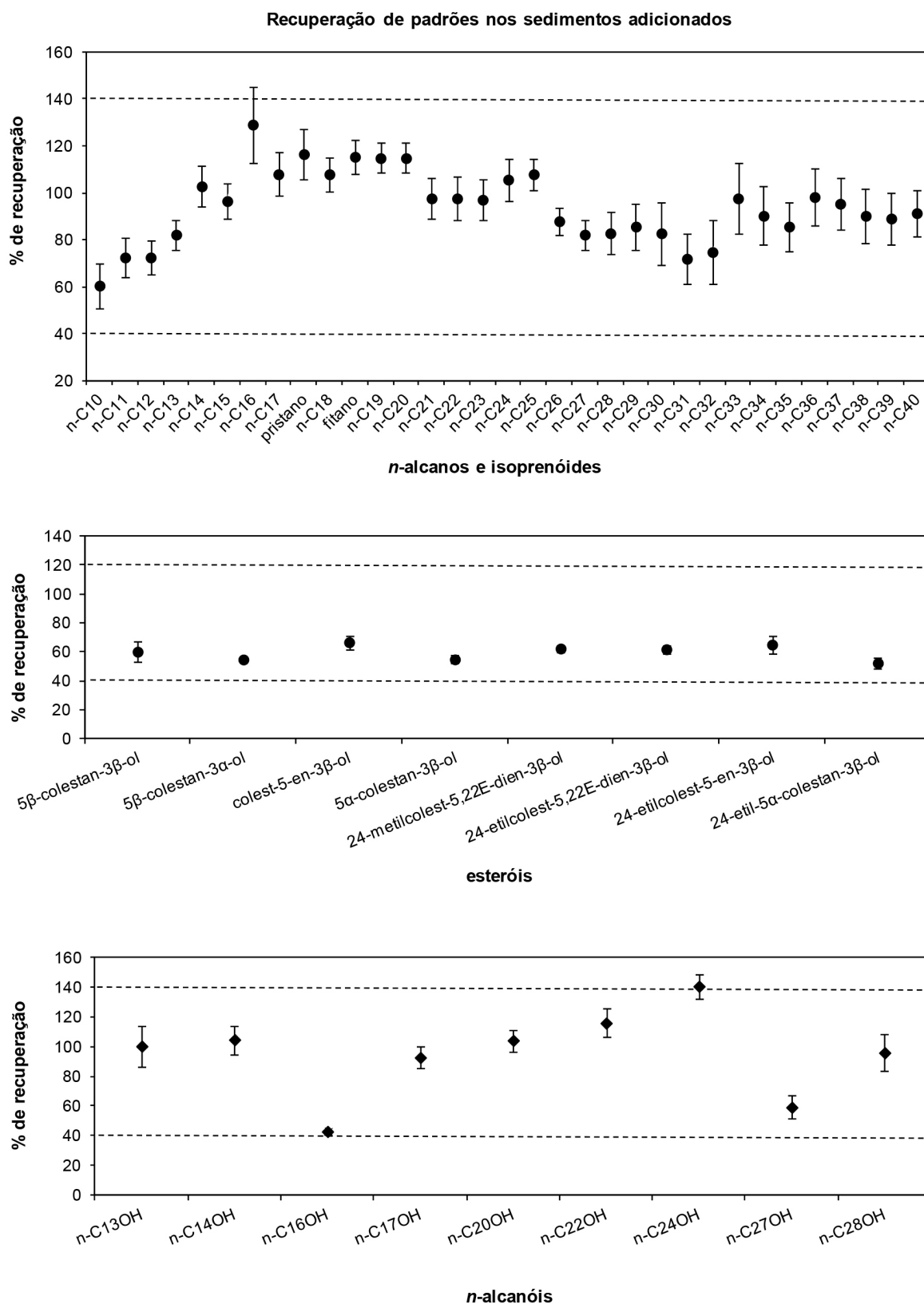
Para análise de possíveis interferências externas nos procedimentos de laboratório, foi feito um branco de extração para cada grupo de aproximadamente nove amostras extraídas, utilizando 20 g de sulfato de sódio, que foi analisado da mesma maneira que as amostras.

Em nenhuma das frações extraídas, foram observados compostos com concentração maior que três vezes o valor do limite de detecção, enquadrando-se no critério estabelecido (Figura 1S). Entretanto, no branco de ALCs, o *n*-C<sub>22</sub>OH apresentou valores fora da faixa aceitável, sendo identificada uma contaminação por fitalato. Assim, apenas o *n*-C<sub>22</sub>OH foi excluído dos resultados e não considerado nas discussões desse trabalho.

#### Análises de amostras de sedimentos marinhos

Uma vez que o método analítico foi validado, o procedimento foi então aplicado em sedimentos marinhos, oriundos da região Antártica. Como a principal alteração do método ocorreu na obtenção da F3, esta seção apresentará apenas os resultados de OLS e ALCs.

As amostras de sedimento foram obtidas de um testemunho (tubos de alumínio com 25 mm de diâmetro) coletado em Ponta Barrel (62°10,274' S; 58°35,504' W), em uma profundidade aproximada de 20 a 30 metros, localizado na porção mais interior da Enseada Ezcurra (Baía do Almirantado, Península Antártica) (Figura 2S), local distante das principais atividades antrópicas desenvolvidas na região. A coluna sedimentar coletada possui 17 cm de profundidade, sendo subdividida em seções de 1 cm.



**Figura 3.** Gráfico da recuperação de padrões externos nos sedimentos adicionados, para n-alcenos, esteróis e n-alcânóis

**Esteróis, n-alcânóis e fitol**

A recuperação para a F3 (OLs e ALCs) foi de  $101,1 \pm 29,6\%$ . Foram identificados 15 esteróis (5 $\beta$ -colestan-3 $\beta$ -ol, 5 $\beta$ -colestan-3 $\alpha$ -ol, colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, colest-5-en-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -colest-5-en-3 $\beta$ -ol, 24-metil-colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol,

24-metil-5 $\alpha$ -colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 24-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol, 24-metil-5 $\alpha$ -colest-5-en-3 $\beta$ -ol, 24-etilcolest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 24-etil-5 $\alpha$ -colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 24-etil-colest-5-en-3 $\beta$ -ol, 24-etil-5 $\alpha$ -colest-5-en-3 $\beta$ -ol e 4 $\alpha$ ,23,24-trimetil-5 $\alpha$ -colest-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol), e como observado no cromatograma (Figura 3S), todos os compostos

foram bem resolvidos, e apresentam distribuição e abundância já observadas em amostras de sedimentos marinhos dessa região.<sup>22,35</sup>

A concentração máxima dos OLS totais foi de 14,65 µg g<sup>-1</sup>, com média de 1,47 ± 0,40 µg g<sup>-1</sup> (Tabela 13S). Colest-5-en-3β-ol foi o esterol mais abundante neste testemunho, resultado verificado em outros estudos na região antártica,<sup>22,36-38</sup> uma vez que esse composto é abundante em sistemas marinhos devido à sua distribuição no plâncton marinho.<sup>39,40</sup> Além dessa fonte, animais superiores como aves e mamíferos marinhos também são uma importante fonte desse composto para os sedimentos na região antártica.<sup>41</sup>

A distribuição dos esteróis ressalta a contribuição de organismos do fito e do zooplâncton, com predomínio do colest-5-en-3β-ol, e com a presença de 24-etilcolest-5-en-3β-ol, 24-etilcolest-5,22E-dien-3β-ol, 24-metilcolest-5,22E-dien-3β-ol e 4α,23,24-trimetil-5α-colesta-22E-en-3β-ol indicando que cianobactérias, diatomáceas, algas primnesiófitas e dinoflagelados compõem os principais contribuintes da matéria orgânica na região.

O cromatograma dos ALCs (Figura 4S) também apresenta os compostos bem resolvidos, sendo identificados 15 compostos (*n*-C<sub>12</sub>OH, *n*-C<sub>13</sub>OH, *n*-C<sub>14</sub>OH, *n*-C<sub>15</sub>OH, *n*-C<sub>16</sub>OH, *n*-C<sub>17</sub>OH, *n*-C<sub>18</sub>OH, *n*-C<sub>19</sub>OH, *n*-C<sub>20</sub>OH, *n*-C<sub>24</sub>OH, *n*-C<sub>26</sub>OH, *n*-C<sub>27</sub>OH, *n*-C<sub>28</sub>OH e *n*-C<sub>30</sub>OH).

A concentração dos *n*-alcanóis totais foi de 2,79 µg g<sup>-1</sup>, com média de 0,31 ± 0,11 µg g<sup>-1</sup> (Tabela 14S). A distribuição observada é tipicamente marinha, com predomínio dos ALCs leves (*n*-C<sub>12</sub>OH a *n*-C<sub>22</sub>OH), enquanto as concentrações dos ALCs pesados (*n*-C<sub>24</sub>OH a *n*-C<sub>30</sub>OH) estiveram próximas ou abaixo do LDM. Essa distribuição é esperada para a região antártica, onde a ausência de plantas superiores limita a contribuição de compostos oriundos de plantas, a líquens e musgos.<sup>42</sup>

Fitol, composto formado a partir da degradação da clorofila-*a*,<sup>3</sup> esteve presente em todas as seções do testemunho. Esse composto geralmente aparece como o principal álcool no ambiente Antártico, e uma vez que é encontrado de maneira ubíqua em plantas, tem sido empregado como um marcador de vegetação.<sup>43</sup> Especificamente neste caso, reflete contribuições de plantas da região, como musgos, algas e plantas vasculares, embora em quantidades não significativas.

Os perfis verticais tanto de ALCs como de OLS totais são similares, com exceção dos ALCs pesados que apresentaram concentrações próximas ou abaixo do LDM. De maneira geral, houve variações nas concentrações dos ALCs leves e OLS totais com a profundidade (Tabelas 13S e 14S), sendo possível verificar as concentrações mais elevadas entre as profundidades de 10-11 cm, possivelmente associadas a um evento natural que favoreceu a produção de matéria orgânica pelos organismos anteriormente citados, ou ainda, condições físico-químicas favoráveis a preservação da matéria orgânica sedimentar.<sup>38</sup>

O fitol apresentou um perfil mais regular (Tabela 14S), com variações pouco significativas ao longo do tempo, sugerindo um aporte constante desse composto ao longo do período deposicional. As concentrações do fitol com a profundidade também pode ser reflexo de processos de degradação da matéria orgânica, sendo observadas maiores concentrações nos sedimentos mais recentes, próximos a superfície, diminuindo a concentração em direção aos sedimentos mais antigos, localizados na base do testemunho.<sup>38,44</sup>

## CONCLUSÃO

O método analítico testado pode ser considerado satisfatório para análise de múltiplos marcadores orgânicos geoquímicos (*n*-alcanos, esteróis e *n*-alcanóis) em sedimentos marinhos. O processo de *clean up* mostrou-se eficiente na separação de todas as frações e classes de marcadores, inclusive na fração 3, nova etapa incluída no processo. Com as alterações realizadas é possível obter em uma única extração,

as principais classes de compostos utilizados em trabalhos de geoquímica orgânica marinha, colaborando com os estudos da matéria orgânica e contaminação ambiental. A otimização e avaliação de métodos analíticos são essenciais para proporcionar bons resultados analíticos e reduzir consumo de material, especialmente em estudos de monitoramento ambiental, que envolvem grande número de amostras.

A aplicação em amostras de sedimentos marinhos trouxe resultados similares aos obtidos em outros trabalhos, indicando a alta contribuição dos organismos marinhos, principalmente do fito- e zooplâncton, e a contribuição pouco significativa de plantas, indicando, portanto, que o método analítico empregado resolve de maneira adequada os componentes de amostras ambientais.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

As tabelas com os resultados detalhados bem como figuras e cromatogramas estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro (564316/2008-3 e 550014/2007-1), e pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (307110/2008-7) de C. C. Martins. A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Mestrado de E. Wisniewski. Aos doutores R. S. Carreira, do Departamento de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) e M. C. Bernardes, do Departamento de Geoquímica da Universidade Federal Fluminense (UFF) pela contribuição na avaliação preliminar deste trabalho.

## REFERENCIAS

- Colombo, J. C.; Pelletier, E.; Brochu, C.; Khalil, M.; Catoggio, J. A.; *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23*, 888.
- Carreira, R. S.; Wagener, A. L. R.; Readman, J. W.; *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* **2004**, *60*, 587.
- Volkman, J. K.; Revill, A. T.; Holdsworth, D. G.; Fredericks, D.; *Org. Geochem.* **2008**, *39*, 689.
- Garcia, M. R.; Mirlean, N.; Baisch, P. R.; Camarão, E. B.; *Environ. Monit. Assess.* **2010**, *168*, 269.
- Amorri, J.; Rodier, C. G.; Boufahja, F.; Mahmoudi, E.; Aissa, P.; Ksibi, M.; Amblès, A.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2011**, *18*, 1606.
- Laureillard, J.; Saliot, A.; *Mar. Chem.* **1993**, *43*, 247.
- Belicka, L. L.; Macdonald, R. W.; Harvey, H. R.; *Mar. Chem.* **2009**, *115*, 72.
- Pancost, R. D.; Boot, C. S.; Aloisi, G.; Maslim, M.; Bickers, C.; Ettwein, V.; Bale, N.; Handley, L.; *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2009**, *280*, 119.
- Faux, J. F.; Belicka, L. L.; Harvey, H. R.; *Cont. Shelf Res.* **2011**, *31*, 1169.
- Mzoughi, N.; Hellal, F.; Dachraoui, M.; Villeneuve, J-P.; Cattini, C.; Mora, S. J.; Abed, A.; *C. R. Geosci.* **2002**, *334*, 893.
- Helaleh, M. I. H.; Al-Omar, A.; Nisar, A.; Gevao, B.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 153.
- Damas, E. Y. C.; Medina, M. O. C.; Clemente, A. C. N.; Díaz, M. Á.; Bravo, L. G.; Ramada, R. M.; Porto, R. M. O.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 855.
- Cavalcante, R. M.; Lima, D. M.; Correia, L. M.; Nascimento, R. F.; Silveira, E. R.; Freire, G. S. S.; Viana, R. B.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1371.
- Readman, J. W.; Preston, M. R.; Mantoura, R. F. C.; *Mar. Pollut. Bull.* **1986**, *17*, 298.

15. Hawthorne, S. B.; Grabanski, C. B.; Martin, E.; Miller, D. J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 892, 421.
16. Kawakami, S. K.; Montone, R. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 226.
17. Burns, K. A.; Codi, S.; Pratt, C.; Duke, N. C.; *Org. Geochem.* **1999**, 30, 1273.
18. Ramos, L.; Vreuls, J. J.; Brinkman, U. A. T.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 891, 275.
19. Basheer, C.; Obbard, J. P.; Lee, H. K.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1068, 221.
20. Grimalti, J. O.; Fernández, P.; Bayona, J. M.; Albalgés, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1990**, 24, 357.
21. UNEP (United Nations Environment Programme); *Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies*, UNEP, Nairobi, Kenya, 1992, 97.
22. Martins, C. C.; Venkatesan, M. I.; Montone, R. C.; *Antarct. Sci.* **2002**, 14, 244.
23. Martins, C. C.; Bicego, M. C.; Taniguchi, S.; Montone, R. C.; *Antarct. Sci.* **2004**, 16, 117.
24. Muniz, P.; Pires-Vanin, A. M. S.; Martins, C. C.; *Mar. Pollut. Bull.* **2006**, 52, 1090.
25. Martins, C. C.; Bicego, M. C.; Figueira, R. C. L.; Angelli, J. L. F.; Combi, T.; Gallice, W. C.; Mansur, A. V.; Nardes, E.; Rocha, M. L.; Wisniewski, E.; Ceschim, L. M. M.; Ribeiro, A. P.; *Sci. Total Environ.* **2012**, 417-418, 158.
26. USEPA; Method 3540, Soxhlet Extraction, Revision 3, 1996, 1-8.
27. USEPA; Method 3640, Gel-Permeation *Clean up*, Revision 1, 1994, 2-24.
28. Denoux, G. J.; Gardinali, P.; Wade, T. L.; NOAA Technical Memorandum NOS ORCA, Rockville, 1998, 130, 129.
29. Wade, T. L.; Cantillo, A. Y.; *IGOSS Plan and Implementation Programme 1996-2003*. IOC Technical Series 43, 1996, UNESCO.
30. Villeneuve J. -P.; Mora S. J.; Cattini C.; IAEA, Monaco, 2002.
31. Qian, Y.; Jackson, T.; RSOP-9725. **1997**, 1.
32. Freitas, F. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
33. Carreira, R. S.; Ribeiro, P. V.; Silva, C. E. M.; Farias, C. O.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1805.
34. Carreira, R. S.; Araújo, M. P.; Costa, T. L. F.; Spörl, G.; Knoppers, B. A.; *Mar. Chem.* **2011**, 127, 1.
35. Huang, J.; Liguang, S.; Wang, X.; Wang, Y.; Huang, T.; *J. Environ. Sci.* **2011**, 23, 1431.
36. Green, G., Nichols, P.D.. *Antarct. Sci.* **1995**, 7, 137.
37. Martins, C. C.; Montone, R. C.; Gamba, R. C.; Pellizari, V. H.; *Braz. J. Oceanogr.* **2005**, 53, 1.
38. Wisniewski, E.; Bicego, M. C.; Montone, R. C.; Figueira, R. C. L.; Ceschim, L. M. M.; Mahiques, M. M.; Martins, C. C.; *Polar Biol.* **2014**, 37, 483.
39. Volkman, J. K.; *Org. Geochem.* **2005**, 36, 139.
40. Martins, C. C.; Montone, R. C.; Fillmann, G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, 18, 106.
41. Venkatesan, M. I.; Santiago, C. A.; *Mar. Biol.* **1989**, 102, 431.
42. Wang, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Sun, L.; *Polar Biol.* **2007**, 30, 1475.
43. Huang, J.; Sun, L.; Huang, W.; Wang, X.; Wang, Y.; *Polar Biol.* **2010**, 33, 1399.
44. Rontani, J. F.; Volkman, J. K.; *Org. Geochem.* **2003**, 34, 1.
45. Volkman, J. K.; Holdworth, D. G.; Neill, G. P.; Bavor Jr., H. J.; *Sci. Total Environ.* **1992**, 112, 203.