

3

METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE

3.1. Metodologia de Amostragem

Todas as amostras de sedimento foram obtidas com um coletor do tipo Box-Corer (Figura 3.1).

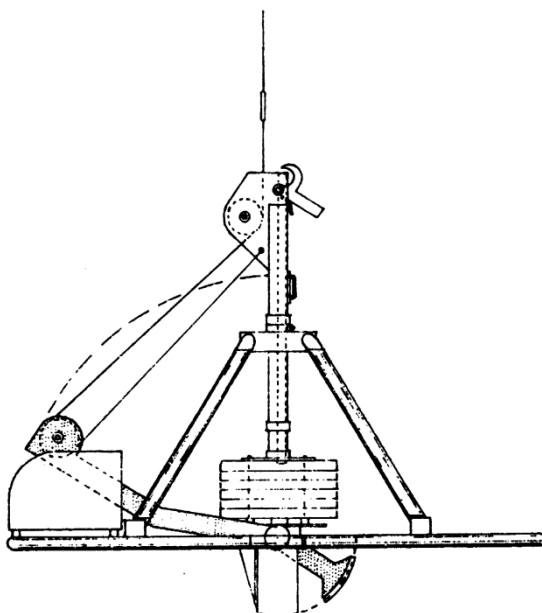


Figura 3.1. Desenho esquemático de um coletor de sedimento Box-Corer.

Em cada ponto de amostragem, o coletor foi lançado até a obtenção de três amostras válidas. De cada lançamento bem sucedido, retirou-se os primeiros 2cm de sedimento, transferido-os para recipientes de alumínio e mantidos congelados desde então.



Figura 3.2. Amostra coletada no Cãnion Almirante Câmara, isóbata 9, 2ª Tréplica – CANAC9-R2.

No laboratório as amostras foram leofilizadas, homogeneizadas por maceração e guardadas em recipientes de vidro até análise.

3.2. Metodologia de Análise

Nesta seção serão apresentados os métodos aplicados na determinação de hidrocarbonetos alifáticos (n-alcanos de n-C12 a n-C40, incluindo pristano e fitano), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, série de hopanos e esteranos e razão isotópica de carbono e nitrogênio.

3.2.1. Determinação de Hidrocarbonetos

3.2.1.1. Extração de Hidrocarbonetos

A extração dos hidrocarbonetos a partir dos sedimentos foi baseada no método EPA 3540C para extração de compostos orgânicos não voláteis e

semivoláteis. Por este método são extraídas as amostras empregadas na análise de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, e série de hopanos e esteranos.

Em uma porção de aproximadamente 9 g de sedimento seco, foi adicionado o padrão subrogado $n\text{-C}_{30}\text{D}_{62}$ relacionado à fração alifática e o padrão subrogado $p\text{-terfenil-d}_{14}$ para a fração aromática.

Procedeu-se à extração com diclorometano em Soxhlet por 24 horas. Antes da etapa de fracionamento, o volume do extrato foi reduzido sob fluxo de N_2 em um equipamento de marca Caliper, modelo TurboVap II e o solvente do extrato trocado para $n\text{-hexano}$.

3.2.1.2. Fracionamento

O extrato foi fracionado pelo método de cromatografia líquida em coluna de sílica/alumina composta por 7 g de alumina desativada a 2% e 10 g de sílica desativada a 5%. A coluna de vidro montada possui dimensões de 30 cm de comprimento com 1,3 cm de diâmetro interno.

A Fração 1 (F1) refere-se aos hidrocarbonetos saturados foi eluída primeiramente com 50mL de $n\text{-hexano}$. Em seguida, a Fração 2 (F2) contendo hidrocarbonetos aromáticos é eluída com 100 mL de mistura $n\text{-hexano}$:diclorometano (1:1) para eluir a fração contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O extrato de ambas as frações foi concentrado sob fluxo de N_2 no equipamento TurboVap. Após concentrá-las, as amostras foram avolumadas a 1 mL e adicionado o padrão interno de quantificação referente a cada análise.

3.2.1.3. Quantificação de hidrocarbonetos alifáticos na Fração 1

Em F1 foram quantificados os n-alcanos individuais ($n\text{-C}_{12}$ ao $n\text{-C}_{40}$), os isoprenóides (fitano e pristano), os compostos resolvidos e a mistura complexa não resolvida (MCNR).

Os hidrocarbonetos alifáticos foram identificados e quantificados, pelo método de padronização interna, utilizando-se como padrão interno o $n\text{-C}_{24}$ de concentração 2500 ng mL^{-1} .

Os extratos foram injetados no cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama (CG/DIC), segundo o método EPA-8015B, utilizando as condições resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições cromatográficas para determinação de hidrocarbonetos alifáticos.

Equipamento	Cromatógrafo Termo Finnigan – Modelo Focus GC, com detector DIC - Estação de dados: ChromQuest 4.1
Coluna:	J&W DB 5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm)
Gases:	
Carreador:	Hélio: $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Make-up:	Nitrogênio: $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Detector:	Ar: $175 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Hidrogênio: $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Temperatura:	
Injetor:	$280 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Detector:	$290 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Coluna:	$50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,75 min), taxa: $6 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até $310 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (20 min)

O limite de detecção e o de quantificação dos n-alcanos individuais, considerando-se a massa média extraída foi entre $0,003 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,007 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

3.2.1.4. Quantificação de hopanos e esteranos na Fração 1

Os hopanos e esteranos foram identificados e quantificados, pelo método de padronização interna, utilizando-se como padrão interno o Pregnano d_4 de concentração 100 ng mL^{-1} .

As análises dos marcadores moleculares, hopanos, diterpanos tri e tetracíclicos e esteranos foram realizadas em um equipamento tipo “quadrupolo”, marca Thermo Finnigan, modelo DSQ Quadrupolo, acoplado a um cromatógrafo TraceGC Ultra 2000, com coluna J&W DB5msSD, de 30 m, 0,25 mm e filme de $0,25 \mu\text{m}$. As condições analíticas são exibidas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Condições cromatográficas para determinação de hopanos e esteranos.

Equipamento	EM – Thermo Finnigan modelo DSQ Quadrupolo
	GC – Thermo Finnigan modelo TraceGC Ultra
Coluna	DB5MS (30 m, 0,25 mm de di e $0,25 \mu\text{m}$ de filme)
Programa de temperatura	50 °C durante 1 min
	50 °C min^{-1} até 80 °C
	6 °C min^{-1} de 80 °C a 285 °C
	1 °C min^{-1} de 285°C a 305 °C
	305 °C durante 15 min
Gás de arraste	Hélio $1,2 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de injeção	$1,5 \mu\text{L}$

O equipamento foi calibrado com soluções de padrões 17α (H), 21β (H)C30 hopano, $\alpha 20\text{S}$ colestano (Chiron) em hexano e, utilizando-se a fração de hidrocarbonetos saturados de um óleo iraniano leve, como padrão, para determinar o tempo de retenção e o espectro de massas dos principais homólogos da série matura dos hopanos, dos diterpanos tricíclicos e tetracíclicos e dos esteranos. Os diterpanos e os hopanos, total de 32 compostos, foram todos

determinados utilizando-se o mesmo fator de resposta do $17\alpha,21\beta(\text{H})\text{C}_{30}$ hopano, enquanto os esteranos, 14 compostos, foram determinados pelo fator de resposta do $\alpha\alpha\alpha 20\text{S}$ colestano.

O limite de quantificação, para cada composto (hopanos e esteranos) contemplado pelo método em relação à massa extraída, para as amostras sedimento, foi de $0,40 \text{ ng g}^{-1}$.

3.2.1.5. Quantificação de hidrocarbonetos aromáticos na Fração 2

A metodologia utilizada para a determinação dos HPAs, por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, seguiu, com algumas modificações, o método EPA-8270D. O equipamento foi calibrado utilizando-se nove soluções (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 e 1000 ng mL^{-1}) contendo os 16 HPAs controlados pelo método (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno), além de 1 e 2 metilnaftaleno, dibenzotiofeno, benzo(e)pireno, perileno e os padrões internos deuterados (naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12}) em concentração igual a 100 ng mL^{-1} .

Os HPAs alquilados contemplados pelo método são: 1metil e 2 metilnaftaleno, C2 a C4-naftalenos, C1 a C3-fluorenos, C1 a C4-fenantrenos, C1 a C3-dibenzotiofenos, C1 e C2-pirenos, C1 e C2-crisenos. Devido à dificuldade de obtenção de padrões de HPAs alquilados, estes foram determinados utilizando-se a curva de calibração do homólogo não alquilado, com a exceção do 1 e 2 metilnaftaleno os quais foram incluídos nas curvas de calibração, e do C2-naftalenos, que foram quantificados pelo 2,3-dimetilnaftaleno.

As condições instrumentais aplicadas são exibidas na Tabela 3.3 a seguir.

Tabela 3.3. Condições instrumentais para determinação de HPAs individuais.

Equipamento	EM - Finnigan modelo Polaris Q
	GC – Finnigan modelo TraceGC
Coluna	J&W DB-5ms (30 m, 0,25 mm de di e 0,25 μ m de filme)
Programa de temperatura	50 °C durante 5 min
	50 °C·min ⁻¹ até 80 °C
	6 °C·min ⁻¹ de 80 °C a 280 °C
	280 °C durante 25 min
Gás de arraste	hélio 1,2 mL·min ⁻¹
Volume de Injeção	2 μ L

O limite de quantificação, para cada composto contemplado pelo método é dado em relação a massa extraída; sendo assim, para as amostras sedimento é de 0,30 ng g⁻¹.

3.2.2 Determinação da razão isotópica de carbono e nitrogênio

A amostra é colocada em uma capsula de prata. Para a análise de $\delta^{13}\text{C}$ a massa pesada foi de aproximadamente 5mg e para $\delta^{15}\text{N}$ de aproximadamente 10mg. A menor massa de amostrada empregada na análise de $\delta^{13}\text{C}$ em relação à $\delta^{15}\text{N}$ é devido a maior concentração relativa de carbono na amostra, que interferia na leitura conjunta de ambos os parâmetros.

Para determinação do $\delta^{13}\text{C}$, a amostra de sedimento é descarbonatada em uma atmosfera de ácido clorídrico por 24hrs, enquanto para $\delta^{15}\text{N}$ não há tratamento prévio à leitura pelo equipamento.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram determinados através de um espectrômetro de massa ThermoFinnigan Delta Plus após combustão a 1.100 °C em um analisador elementar Flash EA.

As razões isotópicas são calculadas pela diferença entre a razão da amostra e a razão do padrão, como mostrado nas equações a seguir:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Amostra}} - \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Padrão}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Padrão}}} \right] \times 1000$$

Figura 3.3. Cálculo da razão isotópica de carbono.

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{Amostra}} - \left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{Padrão}}}{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{Padrão}}} \right] \times 1000$$

Figura 3.4. Cálculo da razão isotópica de nitrogênio.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ são expressos numa comparação ‰ (pernil) com o padrão PDB enquanto $\delta^{15}\text{N}$ é comparado com a composição de N_2 atmosférico.

Foi empregado na análise como material de referência o ácido L-glutâmico com composição de -26.389‰ em $\delta^{13}\text{C}$ e razão -4.5‰ em $\delta^{15}\text{N}$. O gás He puro foi utilizado como gás carreador durante as análises.