

4. Metodologia

4.1. Amostragem e descrição dos testemunhos

Os sedimentos marinhos da plataforma de Cabo Frio foram coletados, em outubro/2002, com auxílio de um amostrador do tipo Kulleberg em 3 pontos de coleta. Os testemunhos CF02-01A/B, CF02-02A/B e CF02-03A/B foram coletados a 118, 124 e 80 m de profundidade, respectivamente. Para tal, utilizou-se da logística do Navio Oceanográfico Astro Garoupa, cedido pela Petrobrás, que permitiu a recuperação de colunas sedimentares com até 2,74 metros de comprimento. Os pontos de coleta foram escolhidos com base em um mapa de distribuição granulométrica dos sedimentos superficiais daquela região (Dias, 1982). Nesta tese foram utilizados os testemunhos CF02-01A e CF02-02A.

4.2. Abertura dos Testemunhos e Descrição das Amostras

As amostras foram abertas no Laboratório de Estudos Paleoambientais (Dep. de Geoquímica Ambiental) da Universidade Federal Fluminense, os testemunhos CF02-01A e CF02-02A foram abertos na seção longitudinal com auxílio de serra elétrica circular (Figura 3). As metades expostas foram fotografadas e descritas com relação a sua litologia. Em seguida o testemunho foi seccionado em subamostras de 1 cm, que foram pesadas e acondicionadas em freezer para posterior determinação de biomarcadores.



Figura 3. Abertura dos testemunhos CF02-01A e CF02-02A.

Na tabela abaixo (Tabela 3) estão representados a quantidade de amostras coletadas e suas respectivas profundidades (fatiamento das amostras).

Tabela 3. Código, número e profundidade das amostras coletadas para realização deste estudo.

Código dos perfis amostrados	Nº de amostras coletadas	Profundidade do testemunho (cm)
CF02-01A	23	0 – 1 à 22 – 23
	78	40 – 41 à 117 - 118
CF02-02A	63	0 – 1 à 62 – 63
	172	63 – 64 à 235 - 236

Do total de amostras coletados foram utilizadas cerca de 50-60 amostras de cada um dos testemunhos, levando-se em consideração as diferentes profundidades e as informações prévias obtidas nos trabalhos desenvolvidos por Andrade (2004) e por Silva (2004), bem como a datação e a taxa de sedimentação para cada testemunho.

Neste estudo foram utilizados os resultados de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio Total, as razões isotópicas de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de Nitrogênio

($\delta^{15}\text{N}$) obtidos através de análises realizadas no Laboratório de Estudos Paleoambientais (Dep. de Geoquímica Ambiental) da Universidade Federal Fluminense e publicadas no trabalho desenvolvido por Andrade (2004) e Silva (2004). É importante ressaltar que a metodologia para obtenção dessas informações também poderá ser consultada nos trabalhos desenvolvidos por Andrade (2004) e por Silva (2004).

4.3. Geocronologia

A geocronologia descrita a seguir refere-se aos testemunhos CF02-01B e CF02-02B, mas por estarem muito próximos dos testemunhos CF02-01A e CF02-02A os dados geocronológicos obtidos para os testemunhos B podem ser utilizados para obter informações a serem utilizadas nos testemunhos A.

De acordo com os resultados obtidos na curva de densidade aparente dos testemunhos analisados, foram selecionadas cinco amostras para determinação da idade radiocarbônica. Este parâmetro foi obtido em análise realizada no Laboratório Beta Analytic Inc. Desta (Miami – EUA). E os resultados variaram entre 0,6301 -1,1456 g.cm⁻³ para o perfil CF02-01 e 0,7025 – 1,8205 g.cm⁻³ para o testemunho CF02-02B.

Através da utilização do programa Calib 5.02 e utilizando-se a curva marinha para o cálculo, a idade radiocarbônica convencional foi transformada em idade calendário (cal) (Stuvier et al., 1998). Após esta transformação foram utilizadas idades interpoladas em ambos os perfis analisados.

As características litológicas e as taxas de sedimentação obtidas nos dois testemunhos estudados indicam que o testemunho CF02-02 atingiu a base do depósito lamoso, refletida na fácies de granulometria grosseira e com presença abundante de conchas encontrada em sua base. Estas características sedimentológicas demonstram claramente o registro das variações do nível do mar ocorridas durante o final do Pleistoceno, quando a cerca de 11.000 anos A.P., o nível do mar esteve cerca de 60 metros abaixo do nível atual. Já o testemunho CF02-01B, o qual apresenta uma litologia homogênea formada por uma argila orgânica, foi retirada em um ponto mais central do banco lamoso, e não atingiu a base deste depósito.

É importante ressaltar que taxas de sedimentação determinadas para os testemunhos variaram entre 0,0510 – 0,1182 cm.ano⁻¹ ao longo do perfil CF02-01B e 0,0110 – 0,0390 cm. ano⁻¹ ao longo do perfil CF02-02B.

4.4.

Teores de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio Total e Determinação Isotópica de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)

Neste estudo foram utilizados os resultados de COT, nitrogênio total, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ obtidos pelo Laboratório de Estudos Paleambientais da Universidade Federal Fluminense e publicados no trabalho de Andrade (2008). No referido estudo é possível consultar a metodologia para a determinação dessas espécies.

4.5.

Determinação dos Marcadores Moleculares

O procedimento analítico para a determinação dos lipídios seguiu a metodologia utilizada em diversos trabalhos encontrados na literatura tais como: Canuel & Martens (1993) tendo sido adaptado por Carreira (2000). Este procedimento é subdividido em três etapas: extração, separação das classes de compostos e identificação/quantificação.

4.5.1.

Descontaminação do Material

Toda a vidraria utilizada passou por um processo de lavagem com solução detergente (Extran[®] a 10%), água da torneira e água destilada, secagem em estufa a 60 °C, seguida de descontaminação em mufla a 450 °C por 6 horas. A vidraria que não podia ser submetida a estas temperaturas foi descontaminada com solventes seguindo a ordem: acetona, diclorometano e hexano.

4.5.2.

Solventes e outros Materiais Utilizados neste Estudo

Os solventes utilizados nesse estudo foram: o diclorometano (CH_2Cl_2), Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), Metanol (CH_3OH), n-hexano (C_6H_{14}) e Acetonitrila (CH_3CN).

Todos os solventes foram de resíduo pesticida com alto grau de pureza. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram das marcas Mallinckrodt (solventes) e Merck.

Também foram utilizados:

- ✚ Sulfato de sódio anidro P.A. (Na_2SO_4) – Descontaminado em mufla por 6 horas a 450 °C, mantido em estufa a 200 °C e resfriado em dessecador antes de sua utilização.
- ✚ Lã de vidro - Descontaminada em mufla por 6 horas a 450 °C.
- ✚ Sílica Gel - Extraída por 6 horas com diclorometano, seca em estufa a 200 °C e resfriada no dessecador antes de sua utilização.
- ✚ Alumina – Muflada a 450°C por 6 horas, mantida em estufa a 200°C e resfriada em dessecador antes de sua utilização.
- ✚ Sulfato de Cobre (CuSO_4) P.A
- ✚ Zinco em pó.

É importante ressaltar que para o desenvolvimento deste estudo foram realizados testes prévios para aperfeiçoar a metodologia para a análise dos lipídios e desta forma obter um protocolo analítico que satisfaça aos requisitos deste trabalho.

A metodologia será descrita detalhadamente posteriormente, mas para a otimização da mesma foram aplicados alguns testes metodológicos que serão descritos a seguir. As tabelas contendo todos os resultados dos testes aplicados encontram-se no Anexo 1.

4.6. Testes Metodológicos

4.6.1. Teste de Metodologia para os Ácidos Graxos

4.6.1.1. Teste de Recuperação dos Padrões Sub-rogados

Foram extraídos 5 brancos ($N = 5$) analíticos utilizando C_{19}FAME (ácido eicosanoico; FAME – Ácido Graxo Metilado) como padrão sub-rogado (19940 ng) e C_{21}Fame (ácido heneicosanoico) como padrão de quantificação interno (5060 ng).

O extrato obtido foi saponificado (hidrólise alcalina) e separado em duas frações: uma fração neutra (SPA-N) e outra fração ácida (SPA-A). A fração ácida foi metilada ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$ – Trifluoreto de Boro em Metanol), avolumada a 1 mL, com hexano e adicionado o padrão interno, neste caso o C_{21}Fame .

A recuperação analítica obtida foi de $35,95\% \pm 11,85\%$, abaixo da recuperação descrita na literatura (Sericano, 1998).

Devido à baixa recuperação obtida foram procedidos outros testes. As etapas foram avaliadas separadamente a fim de verificar, qual seria o ponto crítico para obtenção de uma recuperação aceitável, comparada aos obtidos em outros estudos (Sericano, 1998), dos padrões analíticos utilizados.

4.6.1.2.

Teste de Metilação dos padrões sub-rogados

Foram preparados 5 brancos analíticos ($N = 5$) aos quais foi adicionado uma alíquota conhecida de C_{19} (ácido n-eicosânico) não metilado. A metilação foi realizada adicionando-se 3,00 mL de $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ (3%). A mistura foi aquecida a 85°C por 1hr. Após este período foi resfriada e extraída como n-hexano (3 vezes). O extrato foi avolumado a $1\mu\text{L}$, adicionado o padrão interno de quantificação (C_{21}FAME) e injetado no CG-DIC. A recuperação obtida foi de $91,13 \pm 3,08\%$ e está de acordo com Sericano, 1998 que propõe que os resultados para os padrões de padrões internos variem entre 40% e 130%.

Avaliando-se a recuperação obtida foi possível verificar que a perda de eficiência analítica não estava ligada a esta etapa do processo metodológico. Sendo assim, foi testada a etapa de hidrólise alcalina (saponificação).

4.6.1.3.

Teste da Hidrólise Alcalina (Saponificação): Influência sobre os Padrões Sub-rogados

Foram realizados testes submetendo-se os brancos contendo os padrões ($N = 5$) apenas às etapas de saponificação ($T = 110^\circ\text{C}$ por 2 horas) e metilação. O extrato obtido foi injetado em CG-FID. Esses testes apresentaram uma recuperação média de $40,50 \pm 3,57\%$.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que a etapa de saponificação era a etapa crítica do procedimento analítico utilizado, provavelmente devido à alta

temperatura utilizada associada ao tempo de aquecimento durante a hidrólise, o que provavelmente estaria ocasionando a perda de analito por evaporação. Outra questão avaliada seria a ausência de matéria orgânica, necessária para o aprisionamento destes compostos na matriz analisada (neste caso o branco), o que também resultaria na perda de analito nos brancos analíticos.

A partir destas considerações e avaliando os resultados obtidos foram então realizadas algumas modificações tais como: a diminuição da temperatura durante o período de aquecimento das amostras e adição volume maior de H₂O (5,00 mL). Visto que nesta etapa a H₂O é adicionada após a saponificação para garantir a separação entre os compostos neutros (SPA-N) e ácidos (SPA-A).

Após inúmeras repetições utilizando as modificações supracitadas à recuperação média obtida foi de $54,28 \pm 8,50$ % para o C₁₉FAME (N = 5), que está condizente com a literatura que prevê uma recuperação entre 40 – 120% (Sericano, 1998).

Durante esta etapa de testes foi verificada a possibilidade de se utilizar o C₂₁Fame, que era utilizado como padrão de quantificação interna, como padrão sub-rogado. Assim, foram realizadas análises em brancos (N = 5) para verificar a recuperação deste padrão. O procedimento adotado foi o mesmo descrito para o C₁₉FAME, sendo utilizado 20240 ng para o C₂₁Fame (padrão sub-rogado) e C₁₉FAME (padrão interno). A recuperação média obtida para o C₂₁Fame foi de $33,16 \pm 3,05$ %.

Depois de realizada estas etapas de testes e avaliando-se os resultados obtidos foi então decidido utilizar ambos os padrões (C₁₉FAME e o C₂₁Fame) como padrões sub-rogados e o d-C₂₄ como padrão interno de quantificação.

4.6.2.

Teste da Hidrólise Alcalina (Saponificação): Influência sobre a mistura de padrões autênticos de ácidos graxos - 37 Componentes FAME Mix

Para verificar a influência da saponificação na separação dos ácidos graxos através da determinação em CG-FID foi realizado um teste utilizando uma alíquota da mistura de padrões autênticos FAME Mix (SupelcoTM Component FAME Mix) seguindo o método anteriormente testado e modificado quanto aos padrões sub-rogados.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2A em Anexos, obtiveram-se recuperações entre $40,45 \pm 2,05$ % para o $C_{20:2}$ e $77,31 \pm 6,01$ % para $C_{14:0}$. Estes resultados estão de acordo com os resultados propostos por Sericano, 1998.

4.6.3.

Teste de Metodologia para os Esteróis

4.6.3.1.

Teste de Derivatização dos padrões autênticos

Para verificar a eficiência do método de derivatização na fração de esteróis para a determinação em CG-EM foi preparada uma solução contendo uma mistura de nove padrões autênticos de esteróis. Duas alíquotas com a mesma concentração (~ 500 ng/mL) foram submetidas ao processo de derivatização utilizando-se 500 μ L de acetonitrila e 100 μ L de BSTFA. Esta mistura foi aquecida por 1 hr. a 70 °C. A recuperação obtida para este teste foi variou entre $74,70 \pm 4,09$ % para a colestanona a $91,89 \pm 14,93$ % para o coprostanol e está de acordo com o sugerido por Sericano, (1998) entre 40 e 130%.

4.6.3.2.

Teste da Hidrólise Alcalina (Saponificação): Influência sobre a mistura de padrões autênticos de esteróis

Neste teste foi verificada a influência da saponificação na separação dos esteróis através da determinação em CG-EM. Foi utilizada uma alíquota conhecida de uma mistura de padrões autênticos. Esta solução, preparada em duplicata, foi submetida ao processo de saponificação e metilação.

Como já citado, segundo Sericano (1998) a recuperação dos padrões contidos nos brancos deve variar entre 40% e 130%. Neste estudo foi verificado que as recuperações dos esteróis de padrões autênticos variaram entre $77,75 \pm 7,42$ % para a colestanona e $102,59 \pm 3,41$ % para o β -sitosterol, estando portanto dentro dos valores esperados.

4.6.4.

Preparação da Amostra

As amostras de sedimento foram seccionadas em intervalos de 1 cm, liofilizadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar, previamente descontaminado, sob refrigeração (em freezer) até o momento da determinação dos marcadores orgânicos.

No item 3.8 foram apresentados os testes metodológicos utilizados para avaliação geoquímica da área estudada. Com os resultados obtidos através destes testes foram realizadas modificações que foram seguidas na determinação dos biomarcadores moleculares estudados. É importante ressaltar que esta metodologia utilizou como base aquela desenvolvida por Canuel & Martens (1993) e adaptada por Carreira (2000).

4.6.5.

Extração

As amostras de sedimento liofilizadas foram pesadas (9,00000 g peso seco) em balança analítica de cinco casas decimais. A extração foi realizada em aparelho de Soxhlet, com mistura de diclorometano-acetona (1:1, v/v), durante 24 horas. Antes da extração, foram adicionados os seguintes sub-rogados (Tabela 4):

Tabela 4. Tabela contendo os padrões sub-rogados utilizados neste estudo para avaliação da recuperação analítica

Padrões sub-rogados	Grupo de marcadores que representa	Concentração adicionada (ng)
n-DC ₁₆ e n-DC ₃₀	n -alcanos	2500
5 α -androstan -3 β (Androstanol)	Esteróis	1000 e 5000
Ácido eicosanoíco (C ₁₉ FAME) e Ácido heneicosanoíco (C ₂₁ FAME)	Ácidos Graxos	5000
Eicosanol (C ₁₉ OH)	Álcoois graxos	5000

Depois de terminada a extração, o extrato foi concentrado no aparelho de turboevaporação (Turbo Vap[®] II Concentration Workstation – marca: Caliper Life Sciences; T = 35 °C e P = 9 psi) a um volume de $\pm$ 2 mL, e armazenado sob refrigeração até o momento da saponificação.

4.6.6. Hidrólise Alcalina (Saponificação)

O extrato obtido na etapa anterior foi transferido para um frasco de aproximadamente 15 mL. O solvente foi trocado por metanol através de evaporação sob atmosfera de N₂. Foram adicionados 3 mL de KOH 1N (em metanol) e o pH acertado para 12. Os viais foram deixados sob fluxo de N₂ por 5 min., e levados ao aquecimento em tubo digestor por 2 hr. a 85 °C. Evitando a formação de bolhas através da vedação do viais com fita teflon.

As amostras foram resfriadas em banho de gelo, a seguir foram adicionados 5 mL de n-hexano e 5 mL de água (UV-Direct-Q[®]), agitadas por 1 min. e deixadas em repouso por 15 min.

O sobrenadante foi pipetado com pipeta Pasteur e transferido para um balão de evaporação de 50 mL. Essa amostra receberá o código SAP-N (fração neutra – hidrocarbonetos, álcoois graxos e esteróis). E a parte que ficou no fundo do frasco receberá o código SAP-A (fração ácida – ácidos graxos).

Ao balão de evaporação contendo a fração SAP-N foi adicionado cerca de 10 g de Na₂SO₄ (sulfato de sódio previamente descontaminado) para retirada de H₂O residual e mantida na geladeira por um período de 12 horas. Esta fração foi então submetida à separação em coluna cromatográfica.

4.6.7. Fração Neutra (SAP-N)

4.6.7.1. Separação em Coluna Cromatográfica

A fração SAP-N (fração neutra) foi evaporada a 1mL (em Turbovap) e submetida à separação em coluna. A coluna foi recheada com 11 g de sílica gel (SiO₂), 1 g de alumina, 1 g de Na₂SO₄ e 1 g de cobre. As amostras foram fracionadas para separação dos n-alcanos (fração 1 – F1), aromáticos (fração 2 – F2), esteróis (fração 3 – F3) e álcoois graxos (fração – F5) da seguinte forma:

- ✚ A fração F1 foi eluída com adição de 85 mL de n-hexano.
- ✚ A fração F2 (não quantificada neste estudo) foi eluída com 55 mL de diclorometano:hexano (1:1 v/v).
- ✚ A fração F3 e F5 foi eluída através da adição de 50 mL de diclorometano:metanol (9:1 v/v).

A fração F1 (fração n-alcanos) foi reduzida a 1 mL no Turbovap e adicionado o padrão interno de quantificação (n-DC₂₄). Essas amostras foram mantidas no freezer até o momento da injeção em cromatógrafo à gas com detector de ionização de chama (CG-DIC).

As frações F3 e F5 (fração de esteróis e álcoois graxos) foram submetidas à etapa de derivatização a fim de aumentar a volatilidade desses compostos, através de sua conversão em ésteres-trimetil-silil.

4.6.7.2. Derivatização

As frações F3 e F5 foram derivatizadas e posteriormente quantificadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Inicialmente, estas frações foram levadas à secura sob fluxo de nitrogênio e, então, foram adicionados 500 µL de acetonitrila e 100 µL de BSTFA (reagente derivatizante), e aquecidas a 70 °C por 1 hr em banho de areia. Em seguida, as amostras foram evaporadas até secura e avolumadas a 1mL com diclorometano. Neste ponto foi adicionado 5000 ng do padrão interno de quantificação (PI), o colestano (5 α -coleston), em todas as amostras. Na Figura 4 está representado o fluxograma detalhando o processo ao qual foi submetida à fração de esteróis (F3) e álcoois graxos (F5).

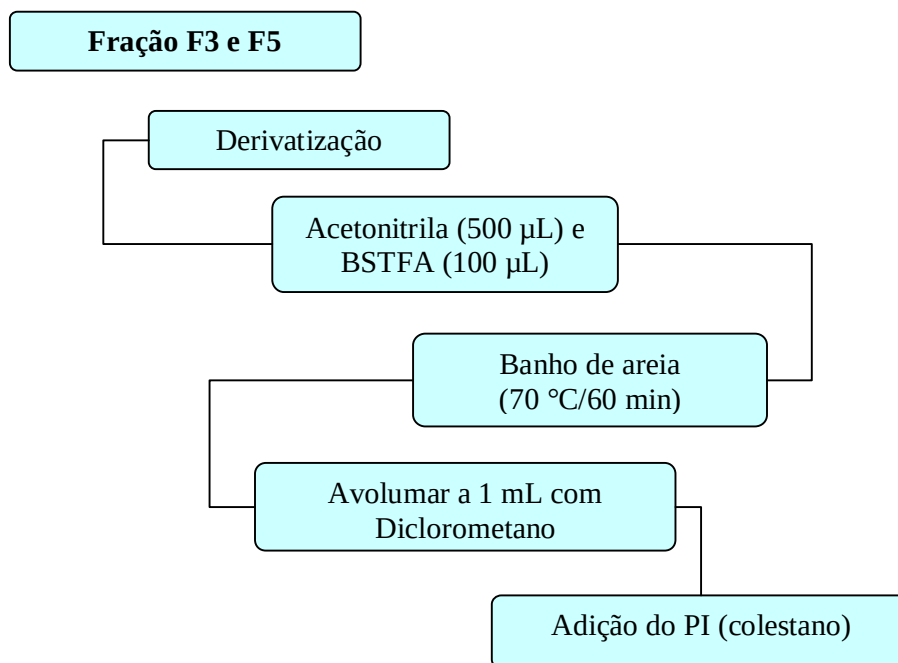


Figura 4. Fluxograma da metodologia adotada para fração neutra do extrato

Após adição do PI, os biomarcadores foram quantificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

4.6.8. Fração Ácida (SPA-A)

Ao sobrenadante obtido na etapa de saponificação, foram adicionados cerca de 10 g de Na_2SO_4 , mantendo-se a mistura em geladeira por 12 horas. Após este período foi procedida à troca de solvente, para metanol, utilizando o Turbovap.

O extrato contendo cerca de 1,0 mL de amostra foi submetido à metilação através da reação com o trifluoreto de boro em metanol (3% - BF_3/MeOH) por cerca de 1 hora a 85 °C, em atmosfera inerte. A seguir o material foi resfriado e novamente extraído com 5 mL de n-hexano, esta etapa foi repetida por mais duas vezes. A este extrato foram adicionados 10 g de Na_2SO_4 e armazenado na geladeira por 12 horas. Decorrido este período o extrato foi reduzido no Turbovap, avolumado a 1,00 mL e adicionado 5000 ng de padrão interno de quantificação (n- DC_{24}).

4.6.9.

Determinação Quali-Quantitativa para os n-Alcanos Estudados

A determinação dos n-alcanos quantificados neste estudo foi feita através de cromatografia em fase gasosa acoplada a um detector de ionização por chama de hidrogênio (CG-DIC; Focus CG), utilizando as condições resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições Cromatográficas estabelecidas na determinação dos biomarcadores avaliados utilizando CG-DIC.

Equipamento	Thermo Electron Corporation, modelo Focus/GC com injeção on-column
Condições do cromatógrafo	
Coluna	HP-5 (30 m, 0,32 mm de d e 0,25 μ m de filme)
Programa de temperatura	50 °C/1,0 min; 20°C/min até 80°C; 6,0 °C/min até 310 °C, permanecendo nesta temp. por 20 min.
Injeção	<i>splitless</i> ; 250 °C. Tempo total = 74 min.
Gás de arraste	He (2,0 mL min ⁻¹)
Volume de Injeção	2 μ L
Condições do detector	
Chama	
- Temperatura	290 °C
- modo de operação	com Make up

4.6.9.1.

Aquisição dos Resultados para os n-alcanos Quantificados neste capítulo

A identificação dos compostos por CG-DIC é baseada no tempo de retenção de cada composto comparado à do padrão referência autêntico injetado nas mesmas condições da amostra. O padrão de referência pode ser: um padrão interno, um padrão injetado junto com a amostra ou uma mistura de padrões autênticos injetados separadamente.

Os hidrocarbonetos alifáticos geram uma assinatura clássica de uma série homóloga. Neste trabalho foram identificados os n-alcanos de cadeias carbônicas variando entre 12 e 40 átomos de carbono, além do pristano e do fitano. Os tempos de retenção foram obtidos através da injeção de uma mistura de padrões autênticos contendo esses compostos. Para quantificação foram construídas curvas de calibração para todos os n-alcanos cuja faixa de concentração variou de 0,5 μ g

μL^{-1} a $5,0 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, em todos os compostos. Os coeficientes de correlação das curvas apresentaram valores de $r > 0,98$ (equação tipo: $Y = aX + b$). A calibração instrumental foi verificada injetando-se um padrão intermediário ao longo do processo analítico.

A identificação e quantificação dos n-alcenos foi realizada relacionando a concentração obtida pela curva de calibração dos padrões autênticos, incluindo o pristano e o fitano, com a área do padrão interno de quantificação (n-DC₂₄ – Tetracosano deuterado).

Na Tabela apresentada no Anexo 2 estão listados os tempos de retenção dos n-alcenos quantificados, e na Figura 5 é possível verificar o exemplo de um cromatograma obtido no CG-DIC para a amostra M.sed.10 (perfil CF02-01A) identificada neste estudo.

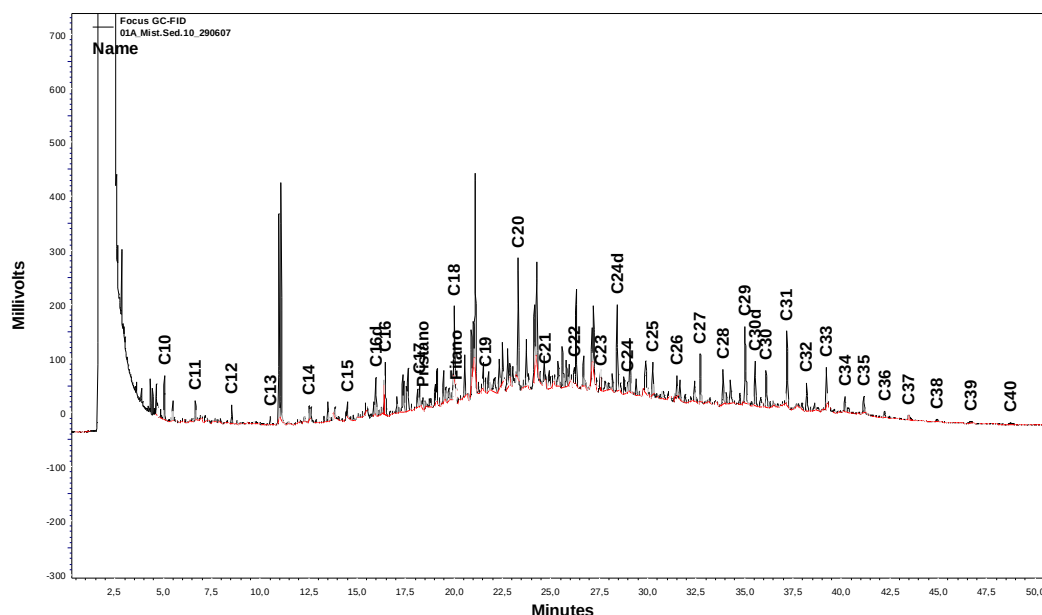


Figura 5. Exemplo de cromatograma obtido para a amostra M.sed 10 do perfil CF02-01A. No cromatograma estão também representados o padrão sub-rogado n-dC₃₀ e o padrão interno de quantificação n-dC₂₄.

As respostas obtidas por CG-DIC variam para cada n-alceno, pois a área de cada pico é relativa à estrutura da molécula e aos íons gerados. O Fator de Resposta Relativo (FRR) foi então calculado a partir da curva de calibração e de um padrão interno de quantificação (PI). E a quantificação dos n-alcenos foi feita

baseada no FRR e na área do PI. Nas equações 10 e 11 estão demonstrados, respectivamente, os cálculos do FRR e da concentração dos n-alcenos quantificados.

$$\text{FRR} = (\text{Área}_{\text{n-alcenos padrão}} / \text{Área}_{\text{PI}}) \times (\text{Conc.}_{\text{PI}} / \text{Conc.}_{\text{n-alcenos padrão}}) \quad (10)$$

Onde:

FRR = Fator de Resposta Relativo

$\text{Área}_{\text{n-alcenos padrão}}$ = Área dos n-alcenos da curva analítica

Área_{PI} = Área do padrão interno

$\text{Conc.}_{\text{n-alcenos padrão}}$ = Concentração dos n-alcenos da mistura de padrões autênticos.

$$\text{Conc.}_{\text{Analitos}} = (\text{Área do analito} / \text{Área do PI}) \times (\text{Conc.}_{\text{PI}} / \text{FRR}) \quad (11)$$

O resultado obtido na equação 11 é dado em $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$, assim dividindo este valor pela massa de sedimento extraída (g), foram obtidas as concentrações em g^{-1} de sedimento seco.

4.6.9.2.

Controle de Qualidade do Método Utilizado na Determinação dos n-alcenos

O controle de qualidade analítico considerou o percentual de recuperação do n-dC₃₀ que apresentou valores médios de $56,57 \pm 10,70$ % para o testemunho CF02-01A (N = 54) e de $52,42 \pm 5,63$ % para o testemunho CF02-02A (N = 27). As concentrações finais não foram corrigidas para a recuperação, que serviu apenas para verificar a eficiência do método.

O limite de detecção (LD) de um método é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 99 % de confiabilidade estatística e que pode ser determinada através de uma matriz que contenha o

analito (Wade & Cantillo, 1994). Uma das formas de se calcular o LD é através do desvio padrão (DP) de no mínimo 5 replicatas da mesma amostra. Neste caso foram injetadas 8 replicatas do menor valor mínimo detectável da curva analítica ($0,25 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$), sendo então calculado de acordo com a equação 12. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 6.

$$\text{LD} = 3 \times \text{DP} \quad (12)$$

Para o limite de quantificação (LQ) foram injetadas 10 replicatas do primeiro ponto da curva analítica, neste caso $0,5 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$. O resultado obtido em $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ foi dividido pela quantidade de sedimento extraído em peso seco ($\sim 9 \text{ g}$) obtendo-se valor igual a $0,056 \mu\text{g}$.

As massas médias dos n-alcanos nos brancos analíticos ficaram entre 5,19 e 532,35 ng (N = 6) para o perfil CF02-01A e para o perfil CF02-02A as médias ficaram entre 2,21 e 121,50 ng (N = 4). As massas médias de cada álcool encontrada nos brancos foram subtraídas dos resultados da amostras.

Tabela 6. Tabela contendo os Limites de detecção e quantificação para a metodologia utilizada na determinação dos n-alcanos estudados.

n-Alcanos	LD ($\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$)
n-C ₁₂	0,026
n-C ₁₃	0,070
n-C ₁₄	0,007
n-C ₁₅	0,010
n-C ₁₆	0,026
n-C ₁₇	0,007
pristano	0,004
n-C ₁₈	0,004
Fitano	0,003
n-C ₁₉	0,003
n-C ₂₀	0,002
n-C ₂₁	0,003
n-C ₂₂	0,002
n-C ₂₃	0,003
n-C ₂₄	0,004
n-C ₂₅	0,011
n-C ₂₆	0,002
n-C ₂₇	0,011
n-C ₂₈	0,003
n-C ₂₉	0,001
n-C ₃₀	0,035
n-C ₃₁	0,007
n-C ₃₂	0,002
n-C ₃₃	0,005
n-C ₃₄	0,006
n-C ₃₅	0,006
n-C ₃₆	0,006
n-C ₃₇	0,005
n-C ₃₈	0,009
n-C ₃₉	0,020
n-C ₄₀	0,011
Psub. (n-dC₁₆)	0,020
Psub (n-dC₃₀)	0,035

4.6.10.

Determinação Quali-Quantitativa para os Esteróis e Álcoois graxos Estudados

A determinação dos esteróis e dos álcoois graxos quantificados neste estudo, ambos como ésteres de trimetil silil, foram feitas através de cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa (GC-EM; Focus DSQ), utilizando as condições resumidas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições Cromatográficas estabelecidas na determinação dos biomarcadores (esteróis e álcoois graxos) avaliados utilizando CG-EM.

Equipamento	ThermoFinnigan, modelo Focus/DSQ, com injetor AS3000
Condições do cromatógrafo	
Coluna	HP-5 (30 m, 0,32 mm de d e 0,25 µm de filme)
Programa de temperatura	60 °C/1,0 min; 20°C/min até 220°C; 1,0 °C/min até 280 °C e 10°C/min até 300°C, com isoterma de 5 min.
Injeção	<i>splitless</i> ; 280 °C. Tempo total = 74 min.
Gás de arraste	He (1,4 mL min ⁻¹)
Volume de Injeção	1 µL
Condições do detector	
- linha de transferência	300 °C
- fonte	200 °C
- modo de operação	Monitoramento de íons*; impacto eletrônico (70eV)
* foram definidas 5 janelas de monitoramento, mantendo-se a taxa de aquisição e o tempo de scan semelhantes em todas as janelas.	

4.6.10.1.

Aquisição dos Resultados para os Esteróis Quantificados neste capítulo

Na quantificação dos esteróis foram consideradas as respostas de uma mistura de padrões autênticos contendo: 5α-androstan-3β-ol (androstanol), 5β-colestan-3β-ol (coprostanol), 5β-colestan-3α-ol (epicoprostanol), 5β-colestan-3-ona (coprostanona), 5α-colestan-3-ona (colestonona), colest-5-en-3β-ol (colesterol), 5α-colestan-3β-ol (colestonol), 24-metil-colest-5-en-3β-ol (campesterol), 24-etil-colesta-5,22-dien-3β-ol (estigmasterol) e 24-etil-colest-5-en-3β-ol (β-sitosterol). Todos foram derivatizados, em relação ao padrão interno (colestano 5000 ng mL⁻¹). Para cada um dos esteróis foram construídas curvas de calibração na faixa de 250 ng mL⁻¹ a 10.000 ng mL⁻¹, obtendo-se para todos os

compostos coeficiente de correlação $r > 0,98$ (equação tipo: $Y = aX + b$). A calibração instrumental foi verificada injetando-se um padrão intermediário ao longo do processo analítico.

A identificação dos esteróis foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos espectros de massa dos padrões, assim como dados encontrados na literatura. Para os padrões disponíveis foram consideradas as respostas dos íons-chave (m/z 129 para os estenóis e m/z 215 para os estanóis) em relação ao colestano. Para os demais compostos identificados foram consideradas as respostas do colesterol e/ou do β -sitosterol ($m/z = 129$) e a do colestanol ($m/z = 215$). Além dos íons de quantificação foram avaliados mais três íons característicos de cada composto (íons de confirmação). Na Tabela 8 estão listados os íons de quantificação e os íons de confirmação utilizados na identificação dos esteróis quantificados, enquanto na Figura 6 é possível verificar um cromatograma parcial (amostra M.sed.10) de alguns dos esteróis quantificados e na Figura 7 a representação estrutural dos esteróis identificados neste estudo.

Tabela 8. Tempos de retenção, íons de quantificação e íons de confirmação utilizados na identificação dos esteróis por CG-EM no sedimento de Cabo Frio.

Código	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	TR	TRR	Íon Molecular	Íon de Quant.	Quantificado em Relação	Íon 1	Íon 2	Íon 3
S1	5 β -colestano-3 β -ol	Coprostanol (C ₂₇)	33,88	0,89	460(5)	129	Colesterol	355	215	257
S2	5 β -colestano-3 α -ol	Epicoprostanol (C ₂₇)	34,59	0,91	460(3)	129	Colesterol	355	215	257
S3	5 β -colestano-3-ona	Coprostanona	35,51	0,94		129	Colesterol	231	316	
S4	5 α -colestano-3-ona	Colestanona	37,44	0,99		129	Colesterol	231	316	
S5	24-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol	- (26 $\Delta^{5,22}$)	30,61	0,81	442(15)	129+257	Colesterol	352	337	225
S6	24-nor-colesta-22-dien-3 β -ol	- 26 Δ^5	30,99	0,82	444(18)	129+257	Colesterol	429	374	257
S7	27-nor-24-metilcolestano-5,22-dien-3 β -ol	-	35,58	0,94	456(5)	129	Colesterol	366	351	327
S8	Colest-5,22-dien-3 β -ol	Desidrocolesterol (27 $\Delta^{5,22}$)	36,27	0,96	456	129	Colesterol	366	351	374
S9	5 α -colestano-22-en-3 β -ol	- 27 Δ^{22}	36,65	0,97	458(20)	129+257	Colesterol	374	359	345
S10	Colest-5-en-3 β -ol	Colesterol 27 Δ^5	37,89	1,00	458(18)	129+257	Colesterol	368	353	329
S11	5 α -colestano-3 β -ol	Colestanol 27 Δ^0	38,27	1,01	460(27)	215	Colestanol	445	370	355
S12	24-metil-colest-5,22-dien-3 β -ol	Diatomsterol 28 $\Delta^{5,22}$	39,85	1,05	470(10)	129	Colesterol	380	341	255
S13	24-metil-5 α -colest-5-en-3 β -ol	- 28 $\Delta^{5\alpha,5}$	40,25	1,06	472(30)	129	Colesterol	457	374	345
S14	24-metil-colest-5,24(28)-dien-3 β -ol	Metilenocolesterol 28 $\Delta^{5,24(28)}$	42,33	1,12	470(12)	129	Colesterol	386	380	296
S15	24-metil-colest-5-en-3 β -ol	Campesterol 28 Δ^5	42,61	1,12	472(20)	129	Colesterol	472	367	343

Código	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	TR	TRR	Íon Molecular	Íon de Quant.	Quantificado em Relação	Íon 1	Íon 2	Íon 3
S16	24-metil-5 α -colestano-3 β -ol	Campestanol 28 Δ^0	43,02	1,14	474(42)	215	Colestanol	459	369	215
S17	24-etil-colest-5,22-dien-3 β -ol	Stigmasterol 29 $\Delta^{5,22}$	44,19	1,17	484(10)	129	Stigmasterol	484	255	
S18	24-etil-colestano-5-en-3 β -ol	β -sitosterol 29 Δ^5	46,83	1,24	486(15)	129+359	β -sitosterol	357	486	
S19	24-etil-5 α -colestano-3 β -ol	β -sitostanol 29 Δ^0	47,26	1,25	488(45)	215	Colestanol	431	398	383
S20	4 α -23,24-trimetil-colest-22-en-3 β -ol	Dinosterol 30 Δ^{22E}	48,30	1,27	500(5)	129+359	β -sitosterol	388	359	271
Psub.	5 α -androstano-3 β -ol	Androstanol	13,71	0,36	333	333	Androstanol	257		
PI	5 α -colestano	Colestano	25,43	0,67	372	372	Colestano	217	372	357

Legenda: TR – Tempo de Retenção; TRR – Tempo de Retenção Relativo (TR de cada esterol dividido pelo TR do colesterol; permite a noção da ordem de separação dos esteróis pela coluna cromatográfica); Íon Quant. – Íon de Quantificação utilizado para identificação do composto pelo CG-EM, os demais íons (1 a 3) são os íons de confirmação da identificação do composto; Os números entre parênteses representam a intensidade espectral desses íons; Psub. – Padrão de recuperação analítica do método (Padrão Sub-rogado); PI – Padrão interno de quantificação dos esteróis utilizado pelo CG-EM.

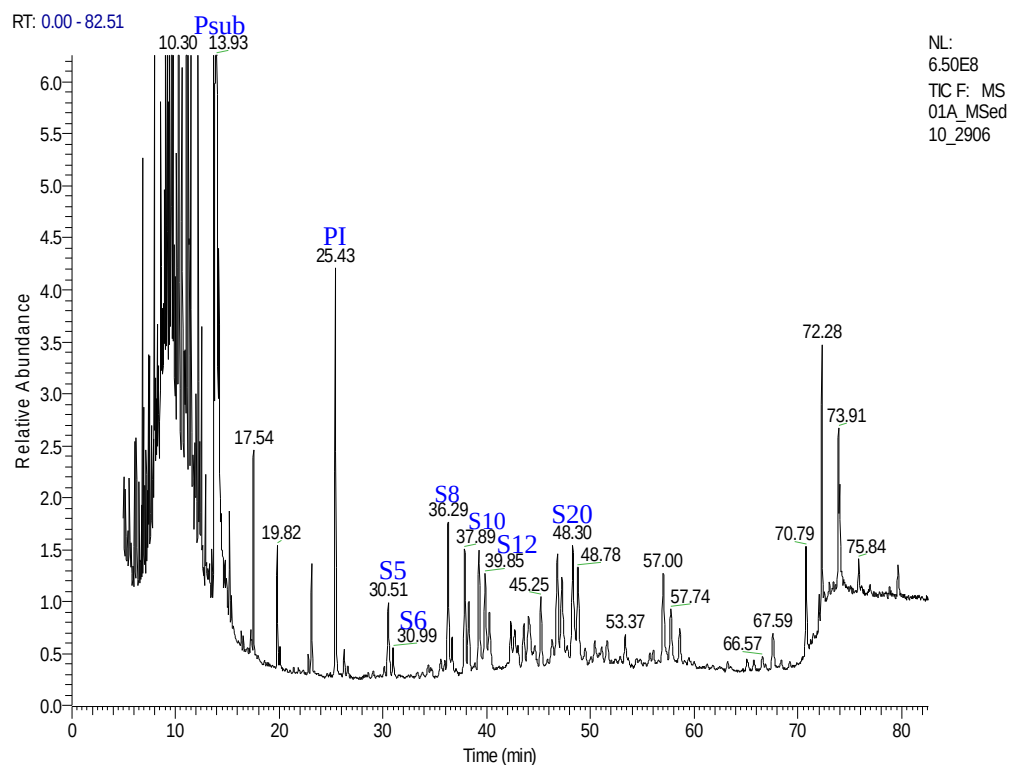


Figura 6. Exemplo de cromatograma demonstrando alguns dos esteróis (corrente total de íons – TIC) quantificados na amostra 01A_M.Sed.10 do perfil CF02-01A. Psub – Androstanol; PI – Colestano; S5 - 24-nor-colesta-5,22-dien-3 β -ol; S6 - 24-nor-colesta-22-dien-3 β -ol; S8 - Colest-5,22-dien-3 β -ol; S10 - Colest-5-en-3 β -ol; S12 - 24-metil-colest-5,22-dien-3 β -ol; S20 - 4 α -23,24-trimetil-colest-22-en-3 β -ol.

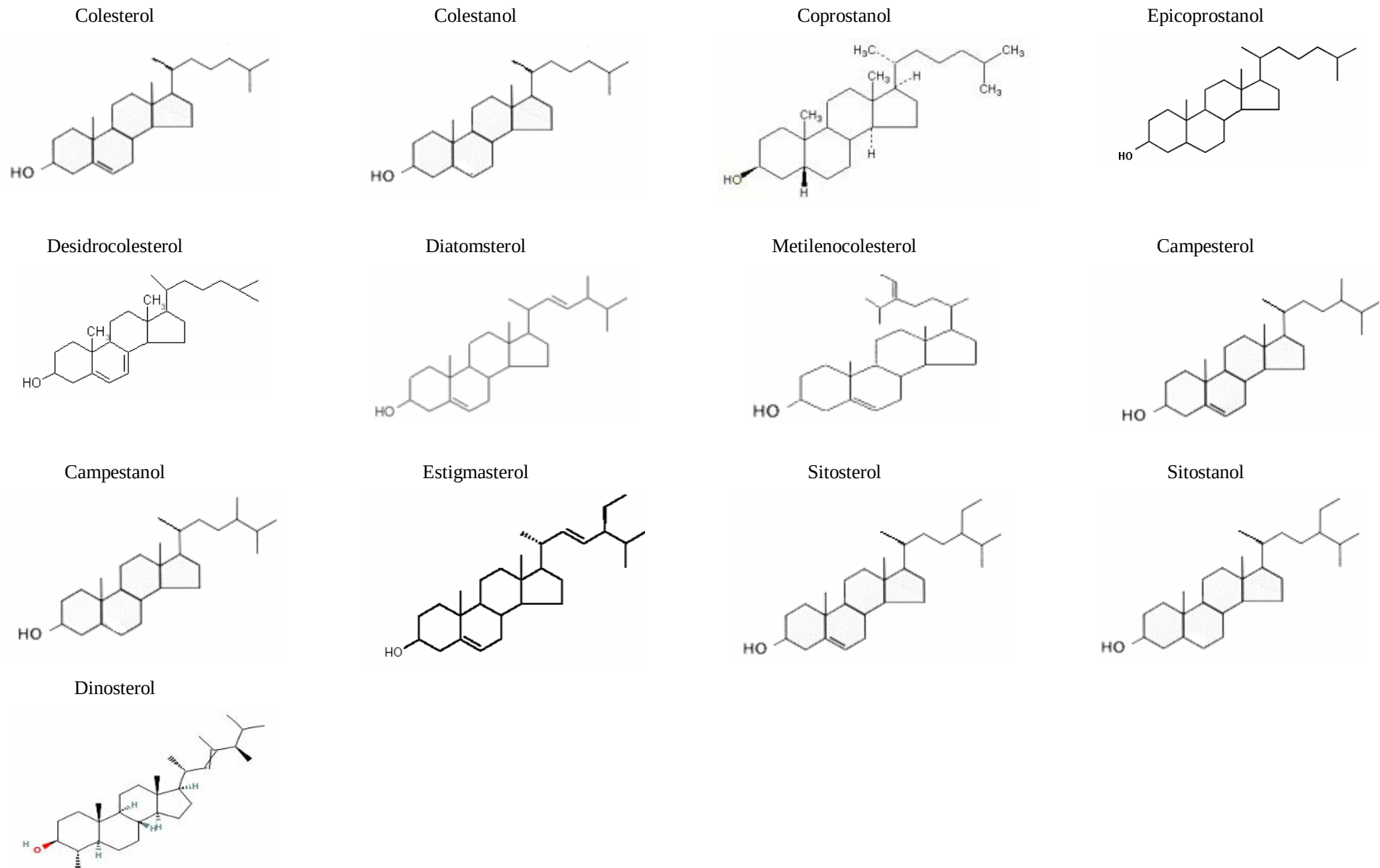


Figura 7. Estruturas químicas de alguns dos esteróis identificados neste estudo. Fonte: Steraloids (2007).

As respostas obtidas por CG/EM variam para cada esteroi, pois a área de cada pico é relativa à estrutura da molécula e aos íons gerados. Assim, foi calculado automaticamente pelo aparelho um Fator de Resposta Relativo (FRR) a partir da curva de calibração e de um padrão interno de quantificação (PI). A quantificação dos esteróis foi feita pelo software do equipamento, através das áreas do PI e do esteroi de interesse e do FRR, de acordo com a equação a seguir:

$$M_{\text{esteroi}} = (\text{Área}_{\text{esteroi}} / \text{Área}_{\text{PI}}) \times (\text{Massa}_{\text{PI}} / \text{FRR}) \quad (13)$$

Onde:

M_{esteroi} = Massa do esteroi em ng

M_{PI} = Massa do padrão interno em ng

Dividindo a massa do esteroi (ng) pela massa de sedimento extraída (g), foram obtidas as concentrações em ng g^{-1} de sedimento seco.

4.6.10.2.

Controle de Qualidade do Método Utilizado na Determinação dos Esteróis

O controle de qualidade analítico considerou o percentual de recuperação do androstanol (padrão sub-rogado), que apresentou recuperações médias iguais a $89,91 \pm 32,99 \%$ ($N = 63$) para o testemunho CF02-01A e $88,81 \pm 21,26 \%$ ($N = 25$) para o testemunho CF02-02A. Para avaliar a reprodutibilidade do método foi realizada a análise de três brancos contendo padrões autênticos (brancos fortificados), que consistiu em adicionar uma concentração conhecida da solução contendo os padrões autênticos (correspondente a um determinado ponto da curva) e submeter estes brancos a todo o protocolo analítico descrito anteriormente. A recuperação média e o desvio padrão para os brancos de padrões autênticos foram de: $80,93 \pm 6,26\%$ ($N = 3$). Na Tabela 3.2 em Anexos estão apresentados os resultados detalhados para os brancos fortificados.

Também foram preparados brancos analíticos que apresentaram, no extrato final, resultados entre não detectado e 718 ng. Os resultados médios obtidos para os brancos foram descontados dos resultados das amostras.

O limite de detecção dos esteróis foi considerado igual ao limite de quantificação da metodologia, ambos sendo iguais ao primeiro ponto (P1) da curva de calibração ($\sim 250 \text{ ng mL}^{-1}$). Considerando-se a massa média de sedimento extraída (9,0 g), o limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD) da metodologia, para os esteróis individuais, está representado na Tabela 9.

Tabela 9. Tabela contendo o limite de quantificação/detecção dos esteróis individuais em aproximadamente 9,0 g peso seco de sedimento extraído para os testemunhos CF02-01A (N = 57) e CF02-02A (N = 26).

Esteróis	P1 (ng mL^{-1})	LQ e LD (ng mL^{-1})
Androstanol	251,00	27,88
Coprostanol	253,50	28,11
Epicoprostanol	251,500	27,88
Colesterol	248,00	27,55
Colestanol	248,00	27,55
Coprostanona	248,50	27,55
Colestanona	252,00	28,00
Campesterol	84,50	9,38
Stigmasterol	500,60	55,62
β -sitosterol	260,90	28,89

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos serão avaliadas além dos biomarcadores moleculares supracitados, a composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e a composição elementar (carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (N_{total}) e razão C/N). A metodologia para quantificação dessas espécies foi descrita anteriormente no capítulo 3.

4.6.10.3.

Aquisição dos Resultados para os Álcoois Graxos Quantificados neste capítulo

Na quantificação dos álcoois graxos foram consideradas as respostas do de uma mistura de padrões autênticos contendo o C_{18OH} (octadecanol) e do C_{19OH} (eicosanol), ambos foram derivatizados em relação ao padrão interno de quantificação (colestano – 5000 ng mL^{-1}). Para cada um dos álcoois foram construídas curvas de calibração na faixa de 250 ng mL^{-1} a $10.000 \text{ ng mL}^{-1}$, ambas com $r > 0,99$ (equação tipo: $Y = aX + b$). Devido à indisponibilidade de padrões para todos os álcoois quantificados neste estudo, a resposta do C_{18OH} foi utilizada na quantificação do C_{14OH} , C_{16OH} e fitol, e a resposta do C_{19OH} foi utilizada na quantificação dos demais álcoois identificados. Ao longo das análises, foi injetado um padrão intermediário da curva para checar a calibração instrumental.

A identificação dos álcoois graxos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa dos quais foram utilizados íons de quantificação e mais três íons característicos de cada composto (íons de confirmação). Na Tabela 10 estão listados os íons de quantificação e os íons de confirmação utilizados na identificação dos álcoois graxos quantificados. E na Figura 8 é possível verificar um cromatograma parcial de alguns dos álcoois graxos quantificados.

Tabela 10. Tempos de retenção, íons de quantificação e íons de confirmação utilizados na identificação dos álcoois graxos por CG-EM no sedimento de Cabo Frio.

Código	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	TR	Íon Molecular	Íon de Quant.	Quantificado em Relação	Íon 1	Íon 2	Íon 3
S1	Tetradecanol	C ₁₄ OH	8,60	286	271	C ₁₈ OH	57	75	103
S2	Hexadecanol	C ₁₆ OH	9,70	341	299	C ₁₈ OH	57	75	103
S3	Octadecanol	C ₁₈ OH	11,24	342	327	C ₁₈ OH	57	75	103
S4	3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2E-enol	Fitol	11,45	158	143	C ₁₈ OH	57	75	103
S5	Eicosanol	C ₂₀ OH	13,15	370	355	C ₁₉ OH	57	75	103
S6	Eneicosanol	C ₂₁ OH	15,38	384	369	C ₁₉ OH	57	75	103
S7	Docosanol	C ₂₂ OH	17,49	398	383	C ₁₉ OH	57	75	103
S8	Tricosanol	C ₂₃ OH	20,05	412	397	C ₁₉ OH	57	75	103
S9	Tetracosanol	C ₂₄ OH	23,07	426	411	C ₁₉ OH	57	75	103
S10	Pentacosanol	C ₂₅ OH	26,55	440	425	C ₁₉ OH	57	75	103
S11	Hexacosanol	C ₂₆ OH	30,43	454	439	C ₁₉ OH	57	75	103
S12	Heptacosanol	C ₂₇ OH	34,64	468	453	C ₁₉ OH	57	75	103
S13	Octacosanol	C ₂₈ OH	39,16	482	467	C ₁₉ OH	57	75	103
S14	Nonacosanol	C ₂₉ OH	43,87	496	481	C ₁₉ OH	57	75	103
S15	Triacontanol	C ₃₀ OH	48,68	510	495	C ₁₉ OH	57	75	103
S16	Untriacontanol	C ₃₁ OH	53,56	524	509	C ₁₉ OH	57	75	103
S17	Dotriacontanol	C ₃₂ OH	58,49	538	523	C ₁₉ OH	57	75	103
Psub	Eicosanol	C ₁₉ OH	12,31	356	341	C ₁₉ OH	57	75	103
PI	5 α -colestano	Colestano	25,43	372	372	Colestano	217	372	357

Legenda: TR – Tempo de Retenção; Íon Quant. – Íon de Quantificação utilizado para identificação do composto pelo CG-EM, os demais íons (1 a 3) são os íons de confirmação da identificação do composto; Os números entre parênteses representam a intensidade espectral desses íons; Psub. – Padrão de recuperação analítica do método (Padrão Sub-rogado); PI – Padrão interno de quantificação dos álcoois graxos utilizado pelo CG-EM.

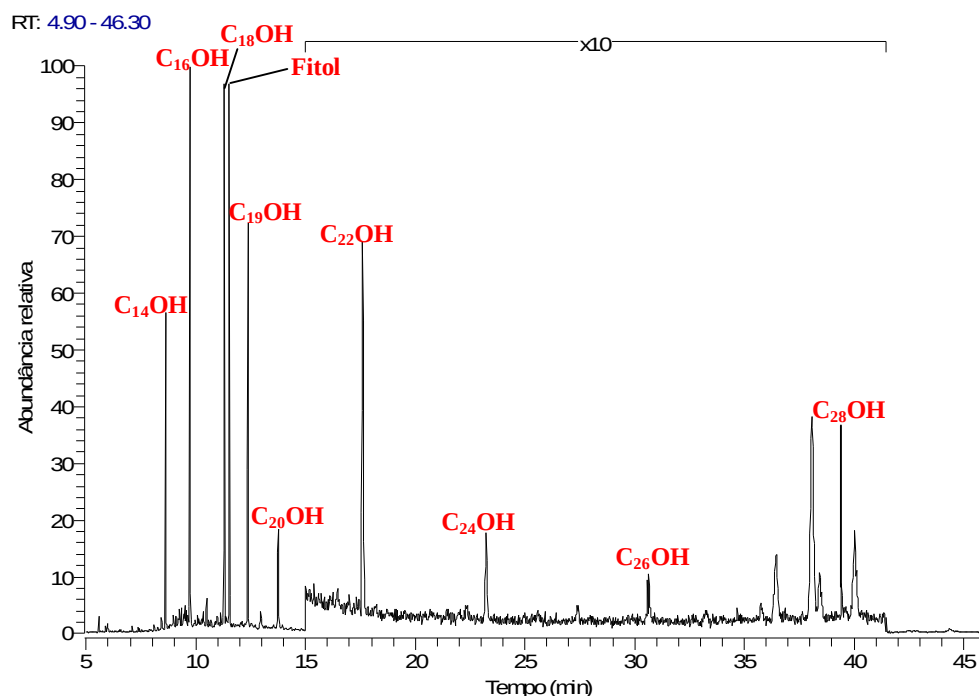


Figura 8. Exemplo de cromatograma parcial com íons-chave para identificação e quantificação de álcoois graxos e fitol. Entre 15 e 41 min. A escala de abundância é ampliada em 10 vezes. $C_{19}OH$ – Padrão sub-rogado; PI – Colestano.

As respostas obtidas por CG/EM variam para cada álcool graxo, pois a área de cada pico é relativa à estrutura da molécula e aos íons gerados. Assim, como dito anteriormente, o Fator de Resposta Relativo (FRR) foi calculado automaticamente pelo aparelho a partir da curva de calibração e de um padrão interno de quantificação (PI). A quantificação dos álcoois foi feita pelo software do equipamento, através das áreas do PI, do álcool de interesse e do FRR, de acordo com a equação 13 descrita anteriormente.

Como dito anteriormente, as concentrações dos álcoois (em $ng\ g^{-1}$ de sedimento seco) foram obtidas dividindo-se a massa do álcool graxo (ng) pela massa de sedimento extraída (g).

4.6.10.4.

Controle de Qualidade do Método Utilizado na Determinação dos Álcoois Graxos

O controle de qualidade analítico considerou o percentual de recuperação do C_{19OH} (padrão sub-rogado – Eicosanol) que apresentou valores médios de $61,31 \pm 21,43$ % para o testemunho CF02-01A ($N = 58$) e de $59,15 \pm 10,58$ % para o testemunho CF02-02A ($N = 29$). As concentrações finais não foram corrigidas para a recuperação, que serviu apenas para verificar a eficiência do método.

Para testar a reprodutibilidade do método foram preparados 6 brancos onde foram adicionados o C_{19OH} e o C_{18OH} com concentrações em torno de 1000 ng. Esses brancos foram submetidos a todo o protocolo analítico e apresentaram as seguintes recuperações médias: $58,29 \pm 10,30$ % para o C_{18OH} e $53,49 \pm 1,80$ % para C_{19OH} ($N = 5$). E considerando que a % CV foi, respectivamente, 0,19 % e 0,03%, respectivamente concluiu-se que o método é reprodutivo e pode, portanto ser utilizado na quantificação dos álcoois graxos. No Anexo 4.2 estão apresentados os resultados detalhados para esses brancos analisados.

O limite de detecção (LD) dos álcoois graxos foi considerado igual ao limite de quantificação (LQ) da metodologia, ambos sendo iguais ao primeiro ponto (P1) da curva de calibração. Na Tabela 11 estão apresentados os valores determinados para o LD e para o LQ dos álcoois graxos presentes na mistura de padrões autênticos, considerando a massa média de sedimento extraída igual a 9,0 g peso seco.

Tabela 11. Tabela contendo o limite de quantificação/detecção dos álcoois graxos (C_{18OH} e C_{19OH}) em aproximadamente 9,0 g peso seco de sedimento extraído para os testemunhos CF02-01A ($N = 58$) e CF02-02A ($N = 29$).

Ácido graxos	P1 (ng mL ⁻¹)	LQ e LD (ng mL ⁻¹)
C_{18OH}	285,00	31,67
C_{19OH}	265,00	29,44

As massas médias dos álcoois graxos nos brancos analíticos ficaram entre 374,01 e 640,40 ng ($N = 7$) para o perfil CF02-01A e para o perfil CF02-02A as médias ficaram entre não detectado e 795,42 ng ($N = 3$). As massas médias de cada álcool encontrada nos brancos foram subtraídas dos resultados da amostras.

4.6.11.

Determinação Quali-quantitativa para os Ácidos Graxos

Os ácidos graxos determinados neste estudo foram identificados e quantificados (como ésteres metílicos) utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG-DIC), de acordo com as condições resumidas na Tabela 12.

Tabela 12. Condições instrumentais utilizadas no CG-DIC para a determinação dos ácidos graxos.

Equipamento	ThermoFinnigan, modelo Focus/DSQ, com injetor AS3000
Condições do cromatógrafo	
Coluna	HP-5 (30 m, 0,32 mm de di e 0,25 μ m de filme)
Programa de temperatura	60 °C/1,0 min; 30°C/min até 110°C; 3,0 °C/min até 250 °C e 10°C/min até 300°C, com isoterma de 5 min. Tempo total = 59,3 min.
Injeção	<i>splitless</i> ; 280 °C; pressão 20 psi/2min.
Gás de arraste	He (1,4 mL min ⁻¹)
Volume de Injeção	1 μ L
Condições do detector	
Gases	
Make-up	Nitrogênio: 33 mL min ⁻¹
Detector	Ar: 360 mL min ⁻¹ ; Hidrogênio: 33 mL min ⁻¹
Temperatura detector	300 °C

4.6.11.1.

Aquisição dos Resultados para os Ácidos Graxos Quantificados neste capítulo

A identificação dos ácidos graxos individuais (saturados, insaturados e ramificados) foi feita por comparação dos tempos de retenção de uma mistura contendo 37 padrões (C37FAME marca Supelco®). A confirmação da identificação e a verificação de co-eluições foi feita realizada pela injeção da mistura C37FAME e de amostras selecionadas no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (CG-EM) seguindo as mesmas condições instrumentais utilizadas nas determinações de esteróis e álcoois graxos descritas anteriormente. Na Figura 9 é possível verificar um cromatograma obtido para a amostra 01A-M.sed. 50 (3001 anos AP) do perfil CF02-01A.

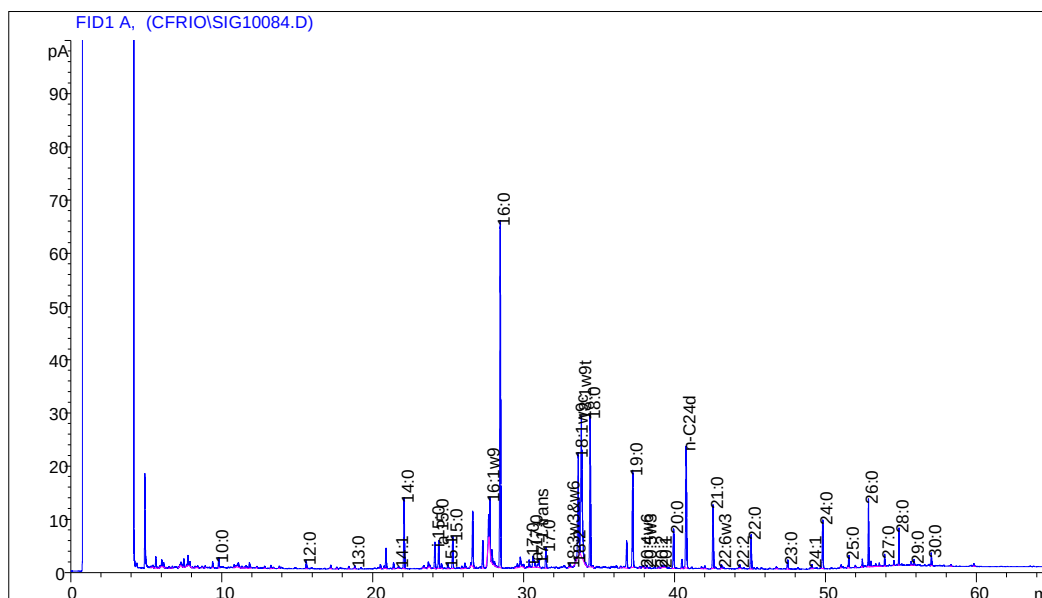


Figura 9. Exemplo de cromatograma CG-FID dos ácidos graxos quantificados na amostra 01A - M.sed. 50 (3001 anos AP) do perfil CF02-01A.

Na quantificação dos ácidos graxos foram construídas curvas de calibração com os padrões da mistura C37FAME na faixa entre 1000 ng mL^{-1} a $10.000 \text{ ng mL}^{-1}$, relacionando a concentração obtida com a área do padrão interno de quantificação (n-dC₂₄ – Tetracosano deuterado). Os coeficientes de correlação das curvas de calibração foram sempre superiores a 0,999. A calibração analítica foi verificada, periodicamente, através da injeção de um padrão intermediário da curva de calibração. Na Tabela 13 estão representados os tempos de retenção obtidos para os ácidos graxos quantificados.

Tabela 13. Tabela contendo os tempos de retenção, a nomenclatura usual e a nomenclatura IUPAC dos ácidos graxos quantificados neste estudo.

Ácidos graxos (quantificados)	Nomenclatura IUPAC	Tempo de retenção (min.)
Ácido Cáprico (C _{10:0})	Ácido decanóico	9,80
Ácido undecanóico (C _{11:0})	Ácido unodecanóico	12,53
Ácido Láurico (C _{12:0})	Ácido duodecanóico	16,60
Ácido tridecanóico (C _{13:0})	Ácido tridecanóico	18,82
Ácido miristoleico (C _{14:1})	Ácido 11-tetradecaenóico	21,66
Ácido mistúrico (C _{14:0})	Ácido tetracanóico	22,08
Ácido iso-pentadecanóico (iC _{15:0})	Ácido iso-pentadecanóico	24,13
Ácido ante-iso- pentadecanóico (aC _{15:0})	Ácido ante-iso- pentadecanóico	24,47
Ácido cis-pentadecanóico (C _{15:1})	Ácido cis 10 – pentadecaenóico	24,90
Ácido pentadecanóico (C _{15:0})	Acido pentadecanóico	25,31
Ácido 9-palmitoleico (C _{16:1w9})	Ácido 5-hexadecaenóico	27,77
Ácido Palmítico (C _{16:0})	Ácido hexadecanóico	28,44
Ácido iso-heptadecanóico (iC _{17:0})	Ácido iso-heptadecanóico	30,39
Ácido iso-heptadecanóico (aC _{17:0})	Ácido iso-heptadecanóico	30,68
Ácido cis-10- heptadecanóico (C _{17:1c})	Ácido cis-10- heptadecanóico	30,76
Ácido trans-10- heptadecanóico (C _{17:1t})	Ácido trans-10- heptadecanóico	30,97
Ácido heptadecanóico (C _{17:0})	Ácido heptadecanóico	31,45
Ácido α-g-linolenico (C _{18:3w3&w6})	Ácido 9,12,15- octadecatrienóico	32,95
Ácido linoleico (C _{18:2})	Ácido 12,15- octadecadienóico	33,44
Ácido oleico (C _{18:1w9c})	Ácido cis-9-octadecaenóico	33,61
Ácido eláidico (C _{18:1w9t})	Ácido trans-9- octadecaenóico	33,84
Ácido esteárico (C _{18:0})	Ácido ocatadecanóico	34,40
Ácido aracdico (C _{20:4w6})	Ácido 5,8,11,14- eicosatetraenóico	38,02
Ácido Eicosapentaenóico (C _{20:5w3})	Ácido cis-5,8,11,14,17- eicosapentaenóico	38,19
Ácido Eicosatrienóico (C _{20:3})	Ácido 11, 14,17- eicosatrienóico	38,53
Ácido Eicosadienóico (C _{20:2})	Ácido 14,17- eicosadienóico	38,94
Ácido Eicosaenóico (C _{20:1})	Ácido 17-eicosaenóico	39,24
Ácido Eicosanóico (C _{20:0})	Ácido Eicosanóico	39,95
Ácido docosaexanóico (C _{22:6w3})	Ácido 4,7,10,13,16,19- docosaexanóico	43,09
Ácido docosadienóico (C _{22:2})	Ácido 16,19- docosadienóico	44,31
Ácido erucico (C _{22:1w9})	Ácido 13-docosenóico	44,42
Ácido behenico (C _{22:0})	Ácido docosanóico	45,09

Ácidos graxos (quantificados)	Nomenclatura IUPAC	Tempo de retenção (min.)
Ácido tricosanóico (C _{23:0})	Ácido tricosanóico	47,52
Ácido nervonico (C _{24:1})	Ácido 21-tetracosaenóico	49,27
Ácido lignocérico (C _{24:0})	Ácido tetracosanóico	49,67
Ácido pentacosanóico (C _{25:0})	Ácido pentacosanóico	51,48
Ácido hexacosanóico (C _{26:0})	Ácido hexacosanóico	52,92
Ácido heptacosanóico (C _{27:0})		54,00
Ácido octacosanóico (C _{28:0})	Ácido octacosanóico	54,83
Ácido nonacosanóico (C _{29:0})	Ácido nonacosanóico	56,16
Ácido triacontanóico (C _{30:0})	Ácido triacontanóico	57,14
Tetracosano deuterado (n-dC ₂₄)	Tetracosano deuterado	40,77
Ácido nonadecanóico (C _{19:0})	Ácido nonadecaenóico	37,22
Ácido heneicosanóico (C _{21:0})		42,56

O limite de detecção (LD) foi considerado igual ao limite de quantificação (LQ) da metodologia analítica, ambos sendo iguais ao primeiro ponto da curva de calibração (1000 ng mL⁻¹). Considerando-se que a massa média do sedimento extraída foi de ~9,0 g peso seco, o limite de quantificação e o limite de detecção da metodologia apresentou o seguinte resultado: aproximadamente 50 ng g⁻¹ para os ácidos graxos individuais.

Considerando que as respostas obtidas por CG-DIC variam para cada ácido graxo. O Fator de Resposta Relativo (FRR) foi calculado a partir da curva de calibração e de um padrão interno de quantificação (PI), neste caso o n-dC₂₄. Assim, a quantificação dos ácidos graxos foi feita baseada no FRR e na área do PI. Nas equações 10 e 11 é possível verificar os cálculos utilizados para a quantificação dos biomarcadores identificados neste trabalho.

O resultado obtido na equação 11 é dado em ngμL⁻¹, assim dividindo este valor pela massa de sedimento extraída (g), foram obtidas as concentrações em ng g⁻¹ de sedimento seco.

4.6.11.2.**Controle de Qualidade do Método Utilizado na Determinação dos Ácidos Graxos**

O controle de qualidade analítico considerou o percentual de recuperação do $C_{19:0}$ (padrão sub-rogado – ácido eicosanóico) e do $C_{21:0}$ (padrão sub-rogado – ácido heneicosanoico) que apresentaram as seguintes recuperações médias respectivamente: $53,60 \pm 16,27 \%$ e $52,24 \pm 22,62 \%$ para o perfil CF02-01A (N = 35) e de $10,64 \pm 9,59 \%$ e $24,54 \pm 18,65 \%$ para o perfil CF02-02A (N = 18). As concentrações finais não foram corrigidas para a recuperação, que serviu apenas para verificar a eficiência do método.

A avaliação da reprodutibilidade do método foi feita através da análise de dois brancos fortificados, que foram os mesmos utilizados para verificar a influência da saponificação na mistura C37FAME. O coeficiente padrão obtido, neste caso ficou entre 0,00 – 0,27 % demonstrando que o método é eficiente na determinação dos ácidos graxos. O resumo dos resultados para o teste de reprodutibilidade analítica está apresentado no Anexo 1.

Os brancos analíticos (N= 5) apresentaram massas que variaram entre não detectado e 745,94 ng para o perfil CF02-01A e entre não detectado e 276,92 ng para o perfil CF02-02A no extrato final. As massas médias de cada ácido encontrada nos brancos foram subtraídas dos resultados da amostras.