Rafael André Lourenço

**Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos
orgânicos em sedimentos – Hidrocarbonetos Alifáticos e
Aromáticos, Esteróis e Alquenonas.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica.

Orientadora:
Profa. Dra. Márcia Caruso Bicego

São Paulo
2003

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

**Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos
orgânicos em sedimentos – Hidrocarbonetos Alifáticos e
Aromáticos, Esteróis e Alquenonas.**

Rafael André Lourenço

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área Oceanografia Química e Geológica

Aprovada em __/__/2003

Profa. Dra. Márcia Caruso Bicego
Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Michel Michaelovitch de Mahiques
Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Jorge Moreira Vaz
Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Comissão Nacional de Energia Nuclear – São Paulo

ÍNDICE

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
I – INTRODUÇÃO.....	12
I.1) CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
I.2) MARCADORES GEOQUÍMICOS.....	15
I.2.1) Hidrocarbonetos Alifáticos (Hcs Alifáticos).....	16
I.2.1.1) n-Alcanos	16
I.2.1.2) Alcanos Isoprenóides.....	18
I.2.2) Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs).....	19
I.2.2.1) PAHs de Origem Petrogênica.....	21
I.2.2.2) PAHs de origem Pirolítica.....	21
I.2.3) Esteróis.....	22
I.2.3.1) Esteróis Naturais.....	23
I.2.3.2) Esteróis Indicadores de Poluição por Esgoto.....	23
I.2.4) Alquenonas.....	25
I.2.4.1) Índice U_{37}^K e Temperatura.....	27
II – OBJETIVOS.....	30
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
III.1) ÁREA DE ESTUDOS.....	31
III.2) METODOLOGIA.....	34
III.2.1) Amostragem.....	34

III.2.2) Limpeza dos materiais.....	35
III.2.3) Tratamento dos reagentes.....	36
III.3) IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE.....	36
III.3.1) Identificação e Quantificação Usando o GC-FID.....	36
III.3.1.1) Hidrocarbonetos Alifáticos.....	36
III.3.1.2) Alquenonas.....	38
III.3.1.3) Condições Cromatográficas para Análise dos Hcs Alifáticos e Alquenonas.....	41
III.3.2) Identificação e Quantificação Usando o GC-MS.....	41
III.3.2.1) Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	42
III.3.2.2) Condições Cromatográficas para Análise dos PAHS.....	43
III.3.3.3) Esteróis.....	44
III.3.3.4) Condições Cromatográficas para Análise dos Esteróis.....	46
III.4) OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	47
III.4.1) Teste de Hidrólise Alcalina.....	48
III.4.2) Teste Alterando a Polaridade dos Solventes e o Número de Frações.....	51
III.4.3) Teste Utilizando Sílica e Sílica-Alumina como Adsorventes.....	53
IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
IV.1) OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	55
IV.1.1) Avaliação do Uso da Hidrólise Alcalina	55
IV.1.2) Avaliação do Uso de Solventes Mais Polares na Extração e do Número de Frações.....	58
IV.1.3) Avaliação do Uso da Sílica Alumina na Coluna Cromatográfica.....	60
IV.1.4) Resultado da Avaliação dos Testes Metodológicos.....	63
IV.2) AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....	67
IV.2.1) Limite de Detecção.....	67
IV.2.2) Verificação da Qualidade do Método.....	70
IV.2.3) Validação Metodologia Analítica	73

IV.2.3.1) Validação da Metodologia para HCs Alifáticos e PAHs.....	73
IV.2.3.2) Validação da Metodologia para Esteróis.....	76
IV.2.3.3) Validação da Metodologia para Alquenonas.....	76
IV.3) APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NAS AMOSTRAS DO TESTEMUNHO.....	78
IV.3.1) Alquenonas.....	78
IV.3.2) n-Alcanos e Alcanos Isoprenóides.....	80
IV.3.2.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica.....	80
IV.3.2.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta de Influência Antrópica ..	82
IV.3.3) Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	84
IV.3.3.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica.....	84
IV.3.3.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta de Influência Antrópica....	85
IV.3.4) Esteróis.....	87
IV.3.4.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica.....	88
IV.3.4.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta de Influência Antrópica....	89
IV.5) COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS BIOMARCADORES COM A COMPOSIÇÃO DO SEDIMENTO.....	89
V) CONCLUSÕES.....	91
VI) CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos n-alcenos.....	16
Figura 2: Estrutura básica dos alcanos isoprenóides pristano e fitano.....	19
Figura 3: Estrutura de alguns PAHs.....	20
Figura 4: Estrutura básica dos esteróis.....	22
Figura 5: Transformação do colesterol.....	24
Figura 6: Alquenonas insaturadas – insaturação x temperatura da água....	27
Figura 7: Relação teórica entre a temperatura e o índice U_{37}^K	29
Figura 8: Localização de Cabo Frio.....	31
Figura 9: Localização do ponto de coleta do testemunho.....	34
Figura 10: Exemplo de cromatograma com padrões de Hcs alifáticos.....	36
Figura 11: Cromatograma obtido em laboratório pela análise sedimento marinho.....	39
Figura 12: Exemplo de cromatograma contendo alquenonas de cadeia longa (Gogou, 1997).....	39
Figura 13: Cromatograma obtido para amostra de sedimento marinho extraído em laboratório.....	40
Figura 14: Cromatograma obtido para amostras contendo padrões de alquenonas.....	40
Figura 15: Rampa de temperatura do injetor para as alquenonas.....	41
Figura 16: Rampa de temperatura na coluna para análise dos Hcs alifáticos.....	42
Figura 17: Exemplo de cromatograma com padrões de PAHs.....	43
Figura 18: Rampa de temperatura na coluna para análise dos PAHS.....	44
Figura 19: Reação de derivatização dos esteróis.....	45
Figura 20: Exemplo de cromatograma com padrões de esteróis.....	46
Figura 21: Rampa de temperatura na coluna para análise dos esteróis.....	47
Figura 22: Fluxograma da metodologia adaptada com hidrólise alcalina....	49
Figura 23: Fluxograma da metodologia adaptada sem hidrólise alcalina....	50

Figura 24: Fluxograma da metodologia aumentando a polaridade dos solventes na extração	52
Figura 25: Fluxograma da metodologia para comparação do uso da sílica-alumina com a sílica na coluna cromatográfica.....	54
Figura 26: Cromatograma de Hcs alifáticos do teste de metodologia com hidrólise alcalina – análise em FID.....	56
Figura 27: Cromatograma de HCs alifáticos do teste de metodologia sem hidrólise alcalina – análise em FID.....	56
Figura 28: Cromatograma de PAHs do teste de metodologia com hidrólise alcalina – análise em MS.....	57
Figura 29: Cromatograma de PAHs do teste de metodologia sem hidrólise alcalina – análise em MS.....	57
Figura 30: Cromatograma de Hcs alifáticos e alquenonas do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em FID.....	58
Figura 31: Cromatograma de PAHs do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em MS.....	59
Figura 32: Cromatograma de esteróis do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em MS.....	59
Figura 33: Cromatograma de HCs alifáticos e alquenonas utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.....	60
Figura 34: Cromatograma de HCs alifáticos e alquenonas utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica.....	61
Figura 35: Cromatograma de PAHs utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.....	61
Figura 36: Cromatograma de PAHs utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica.....	62
Figura 37: Cromatograma de esteróis utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.....	62

Figura 38: Cromatograma de esteróis utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica.....	63
Figura 39: Fluxograma da metodologia analítica proposta.....	65
Figura 40: Variação da concentração das alquenonas e da temperatura ao longo do testemunho.....	69
Figura 41: Perfil das razões entre os HCs alifáticos ao longo do testemunho.....	82
Figura 42: Relação linear entre $n\text{-C}_{27} + n\text{-C}_{29} + n\text{-C}_{31}$ e a temperatura da Superfície Oceânica (SST).....	83
Figura 43: Perfil da somatória dos PAHs ao longo do testemunho.....	84
Figura 44: Relação linear entre Σ PAHs e a temperatura da superfície oceânica (SST).....	87
Figura 45: Perfil da somatória dos esteróis e da relação colesterol/ β -sitosterol ao longo do testemunho.....	88
Figura 46: Correlação dos dados da composição do sedimento com a temperatura da superfície oceânica estimada através das alquenonas.....	91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos testes metodológicos para identificação e quantificação dos compostos.....	66
Tabela 2: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para HCs alifáticos.....	68
Tabela 3: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para alquenonas.....	68
Tabela 4: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para PAHs.....	69
Tabela 5: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para esteróis.....	70
Tabela 6: Recuperação individual dos compostos no branco adicionado.....	72
Tabela 7: Resultados obtidos para HCs alifáticos na análise do material de referência IAEA – 383 e valores apresentados pelo MEL/IAEA.....	74
Tabela 8: Resultados obtidos para PAHs alifáticos na análise do material de referência IAEA – 383 e valores apresentados pelo MEL/IAEA.....	75
Tabela 9: Comparação dos resultados fornecidos pelo exercício de comparação entre laboratórios para alquenonas com os obtidos pela quantificação das alquenonas.....	76
Tabela 10: Resultados das extrações das alquenonas – testemunho.....	78
Tabela 11: Resultados das extrações dos HCs alifáticos – testemunho	81
Tabela 12: Resultados das extrações dos PAHs – testemunho.....	86
Tabela 13: Resultados das extrações dos esteróis – testemunho.....	87

RESUMO

O destino de grande parte da matéria orgânica presente nos oceanos é o sedimento marinho. Essa matéria orgânica, que vai sendo armazenada ao longo dos anos, produz uma reserva única de informações sobre os processos biogeoquímicos ocorridos no passado e como esses processos responderam às mudanças ambientais.

Certas moléculas orgânicas são sintetizadas apenas por organismos marinhos ou somente por plantas superiores terrestres. A abundância relativa desses compostos em sedimentos marinhos pode ser usada para determinar a contribuição de matéria orgânica terrestre ou marinha que foi depositada. Outros compostos, cujas fontes naturais são raras ou inexistem, encontrados em sedimentos, refletem a influência antrópica no meio. Há ainda compostos, com origem biológica específica, cujas estruturas são influenciadas pelo controle enzimático dos organismos que os produzem, que são influenciados pelo meio. Esses compostos, cuja presença pode fornecer evidências inequívocas da sua fonte ou informações sobre condições oceanográficas recebem o nome de marcadores biológicos e são comumente abreviados como biomarcadores.

Esse trabalho produziu uma metodologia analítica para identificação e quantificação de biomarcadores como os hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróis e alquenonas através de uma única extração lipídica. Essa metodologia foi avaliada por diversos critérios analíticos e validada através de materiais de referência e de exercícios de comparação entre laboratórios.

A metodologia foi aplicada em um testemunho de sedimento marinho obtido em Cabo Frio. A quantificação das alquenonas nas amostras do testemunho permitiu estimar a variação da temperatura da superfície oceânica ao longo dos anos e correlacioná-la com variações na intensidade da ressurgência, além de permitir verificar como os demais biomarcadores variaram em função da variação da temperatura do meio onde foram sintetizados.

ABSTRACT

The fate of most organic matter in the oceans is the marine sediment. This preserved organic matter became an unique reservoir of information about the operation of biogeochemical processes in the geological past, and how these processes responded to environmental changes.

Some molecules are only synthesized by sea organisms, others only by higher plants. The relative abundance among these compounds in sea sediments can be used to determine the source of the organic matter. Other organic compounds, without natural sources, are an indicative of anthropogenic influence. The marine sediment also can accumulate compounds with the specific biological sources, which structures are influenced by the enzymatic control of the precursor organisms. All of these compounds, which can provide clear evidences of its sources or information about oceanographic conditions, are called biological markers or biomarkers.

The present work put out an analytic method to identify and quantify biomarkers like aliphatic hydrocarbons, PAHs, sterols and alkenones with only one lipidic extraction. This method was evaluated by several analytic criteria and validated by reference material and by interlaboratory comparison study.

The method was used to analyze a marine sediment core from Cabo Frio. The alkenones quantification in this core allowed not only appreciate changes in the sea surface temperature (SST) along the years and correlate them with changes in the upwelling, but also verify how the other biomarkers responded to SST changes.

I – INTRODUÇÃO

I.1) Considerações Gerais

A maioria do Carbono Orgânico dos oceanos está presente nos sedimentos, e cerca de 80% de todo o sedimento reside na margem continental (Grimalt & Albaiges, 1990). As margens continentais são, portanto, o principal reservatório do carbono orgânico do ambiente marinho e recebem 130×10^{12} g de carbono orgânico total por ano (Prahl *et al.* 1994), sendo computado, nesta estimativa, tanto o material de origem terrestre como marinha. O entendimento da natureza química, a quantificação de compostos orgânicos e suas interações com o sistema químico e biológico são muito importantes para o entendimento do ciclo do Carbono Global.

A matéria orgânica sedimentar fornece uma variedade de indicadores que podem ser usados tanto para definir a origem dos compostos presentes como para reconstruir os registros dos paleoambientes, marinhos e continentais, e paleoclimas.

Certas moléculas orgânicas são sintetizadas apenas por organismos marinhos ou somente por plantas superiores e terrestres. Essas últimas podem ser transportadas para o oceano através de diversos mecanismos de transporte e serem preservadas em sedimentos marinhos. A abundância relativa desses compostos em sedimentos marinhos pode ser usada para determinar a contribuição de matéria orgânica, terrestre ou marinha, que foi depositada. Outros compostos, com origem biológica específica, podem refletir um controle enzimático em suas estruturas moleculares.

Tanto a produção como a preservação da matéria orgânica são afetadas pelas mudanças ambientais. Alguns compostos orgânicos têm auxiliado na dedução de muitos fatores sobre o ecossistema e os ambientes passados, em função da matéria orgânica que foi depositada. A produtividade biológica pode ser inferida através do acúmulo de massa de carbono orgânico assim como as condições paleoceanográficas e paleoclimáticas podem influenciar na preservação da matéria orgânica.

Estes parâmetros ambientais refletem a circulação nos corpos de água que também dependem de fatores climáticos. Períodos de altas e baixas temperaturas têm deixado suas impressões em resíduos moleculares de organismos que viveram no passado e que agora são parte do registro sedimentar (Meyers, 1997).

Os compostos de origem biológica, cuja presença pode fornecer uma evidência inequívoca da sua fonte, ou uma informação sobre certas condições paleoceanográficas, recebem o nome de marcadores biológicos, que são comumente abreviados como biomarcadores (Grimalt & Olive, 1993; Eglinton *et al.*, 1993).

Outros indicadores, tais como as razões entre carbono orgânico e nitrogênio total ou as razões isotópicas de carbono e nitrogênio, têm sua importância na caracterização do aporte de matéria orgânica para o ambiente marinho.

As razões C/N têm sido amplamente usadas para diferenciar a matéria orgânica, proveniente de fontes marinhas e terrestres (Prahl *et al.*, 1988, Meyers, 1997). Valores típicos de C/N para algas, ficam entre 4 e 10, enquanto que para plantas vasculares essa razão é maior que 20 (Meyers, 1994). A diferença reside na ausência de celulose em algas marinhas e na sua abundância, em plantas vasculares, além do conteúdo protéico que é muito rico nas algas (Meyers, 1997).

Na margem continental sudeste do Brasil, Mahiques *et al.* (1999) comprovam a natureza orgânica do nitrogênio sedimentar e observam ser possível a utilização da razão C/N na caracterização da origem da matéria orgânica depositada.

As razões isotópicas de carbono e nitrogênio sobre sedimentos fornecem informações, tanto sobre a natureza e origem da matéria orgânica (Stein, 1991; Meyers, 1997; Ruttenberg & Goñi, 1997; Mahiques *et al.*, 1999), como para interpretações paleoambientais (Arz *et al.*, 1999; Pride *et al.*, 1999). A utilização das variações nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ baseia-se nas diferentes assinaturas isotópicas em plantas C_3 e C_4 , organismos bentônicos, fito- e zooplânctônicos (Anderson & Artur, 1983).

A matéria orgânica apresenta assinatura isotópica de valores de $\delta^{13}\text{C}$ (PDB) e $\delta^{15}\text{N}$ (Ar) característica, em função de sua origem (PrahI *et al.*, 1995) e, no caso de organismos marinhos, em função do nível trófico (Wada, 1986). Em geral valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre $-20,5$ e $-21,1$ ‰ e valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre $6,9$ e 9 ‰ são associados a organismos marinhos.

Alguns autores relatam modificações pós-deposicionais nas razões isotópicas (Westerhausen *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1996) que dificultariam a utilização das mesmas na interpretação ambiental. Por outro lado, outros autores confirmam o potencial da utilização deste parâmetro em estudos ambientais e pretéritos (Meyers, 1994; Andrews *et al.*, 1998). Para a margem continental do Estado de São Paulo, Mahiques *et al.* (1999) obtiveram resultados bastante significativos na interpretação da dinâmica sedimentar atual com o auxílio de isótopos de carbono e nitrogênio.

A natureza da matéria orgânica sedimentar pode ser determinada a partir de vários indicadores. Stein (1991), observa que a análise isolada de um único parâmetro da matéria orgânica não é conclusiva em termos de indicação de sua origem, sendo sempre recomendada à análise comparativa do maior número de parâmetros independentes possíveis. Alguns compostos produzidos pelo homem podem se depositar no sedimento marinho e refletir, então, a atividade antrópica e, conseqüentemente, a contribuição continental de matéria orgânica para o sedimento. Há, também, compostos produzidos exclusivamente por organismos marinhos, os quais podem ser utilizados como indicadores de contribuição marinha de matéria orgânica para o sedimento.

Está sendo proposto, neste trabalho, a otimização da metodologia analítica para a determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos marinhos.

I.2) Marcadores Geoquímicos

A distribuição de biomarcadores nos sedimentos contém uma reserva única de informações sobre os processos biogeoquímicos no passado geológico e como estes processos responderam a mudanças ambientais. Isto ocorre parcialmente pela informação da fonte que ele fornece e também pela menor sensibilidade às alterações e destruição, embora não sejam imunes à diagênese (Eglinton *et al.*, 1993).

Para interpretar corretamente essa distribuição é necessária a caracterização detalhada dos biomarcadores, informações sobre degradação microbiana além de cuidadosas correlações com a estratigrafia e com registros de outros sedimentos, que devem ser consideradas. Deve-se considerar, quando conveniente, dados como a estereoisomeria de compostos ou a relação isotópica de elementos como o carbono, enxofre e nitrogênio (Eglinton, 1993).

Os biomarcadores são geralmente considerados compostos de baixo ou médio peso molecular (Peters & Moldowan, 1993). Uma vez que os biomarcadores presentes na fração lipídica de organismos (biolipídios) ou em sedimentos (geolipídios) devem refletir tanto indicações da origem (pelo organismo) quanto processos biogeoquímicos envolvidos, a extração lipídica por solventes orgânicos torna-se bastante útil (Eglinton, 1993). Dessa forma a distribuição dos biomarcadores pode ser usada para inferir a operação de processos no passado, fornecendo base para interpretações detalhadas dessas operações no ambiente presente.

A extração lipídica de sedimentos fornece uma série de compostos orgânicos como: hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas, aldeídos e compostos correlatos, sendo que muitos destes compostos são biomarcadores geoquímicos. Este trabalho tem como interesse o estudo dos seguintes biomarcadores: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), esteróis e alquenonas.

I.2.1) Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são uma classe de compostos que apresentam uma boa estabilidade química em água e sedimentos e têm sido muito usados como biomarcadores e como indicadores de poluição de petróleo. Existem várias fontes desses compostos e sua distribuição varia muito de uma área para outra. As principais fontes biológicas incluem plantas terrestres, bactérias, microalgas e macroalgas, além de animais. Produtos de combustão industrial ou exaustão de veículos podem significar uma fonte importante, dependendo da área. Quantidades consideráveis de derivados de petróleo são introduzidos no ambiente marinho através da drenagem urbana, efluentes industriais e domésticos, atividades náuticas e derrames de óleo. Parte desses hidrocarbonetos, que são introduzidos no ambiente marinho, sofre processo de remoção ou degradação e uma fração deles pode ficar nos sedimentos por muitos anos (Volkman *et al.*, 1992).

I.2.1.1) n-Alcanos

A maioria dos hidrocarbonetos biogênicos corresponde aos saturados de cadeia linear, conhecidos como n-alcanos (Figura 1).

Os n-alcanos naturais apresentam cadeias com número ímpar de átomos de carbono.

No fitoplâncton marinho e algas bentônicas, os n-alcanos mais abundantes são os ímpares, entre o n-C₁₅ e n-C₂₁, predominando o n-C₁₅ e o n-C₁₇ (Blumer *et al.*, 1971; Youngblood & Blumer, 1973). Em algumas bactérias são encontrados n-alcanos contendo 13 a 31 átomos de carbono, sendo que a faixa principal está entre 17 e 20, não havendo predominância entre pares e ímpares (Saliot, 1981).

Figura 1: Estrutura de um exemplo de n-alceno.

Em compostos de origem terrestre, associados principalmente às plantas superiores, cujas ceras cuticulares são caracterizadas por n-alcanos com peso molecular mais alto, ocorre também o predomínio de cadeias ímpares entre n-C₂₃ a n-C₃₃ (Saliot, 1981; Volkman *et al.*, 1992), com destaque aos compostos n-C₂₇, n-C₂₉ e n-C₃₁, mais abundantes, conforme características da vegetação local (Eglinton & Hamilton, 1967).

Os n-alcanos de origem fóssil apresentam uma composição variada, conforme sua fonte específica: petróleo bruto e produtos derivados de petróleo. Os diferentes tipos de petróleo apresentam em sua composição uma gama de n-alcanos variando de 1 a 40 átomos de carbono, caracterizados pela ausência de uma dominância par ou ímpar no número de cadeias moleculares (Simoneit, 1993).

O Índice de Preferência de Carbono (CPI) (Equação 1), determinado com base nas abundâncias de n-alcanos pares e ímpares, foi introduzido há mais de 40 anos (Bray & Evans, 1961) e, desde então, tem sido extensivamente usado para estimar a contribuição de plantas terrestres em uma grande variedade de ambientes (Venkatesan *et al.* 1987; Hostettler *et al.* 1999, Chernova *et al.* 1999). Este índice é dado pela expressão (Bray & Evans 1961):

$$CPI = \frac{1}{2} \left\langle \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32}} + \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32} + C_{34}} \right\rangle \quad (1)$$

Valores de CPI variando entre 4 e 7 refletem uma presença predominante de n-alcanos biogênicos, cuja origem, continental ou marinha, pode ser inferida a partir do número de carbonos do conjunto de n-alcanos considerados no cálculo; valores em torno de 1 indicam geralmente contaminação petrogênica. (Bouloubassi, 1990)

Outro índice utilizado para a averiguação da fonte de hidrocarbonetos é o TAR (razão entre o material terrígeno e aquático) (Equação 2), proposto por Bourbonniere & Meyers (1996). Este índice para os n-alcanos é calculado pela equação:

$$TAR = \left\langle \frac{nC27 + nC29 + nC31}{nC15 + nC17 + nC19} \right\rangle \quad (2)$$

Valores mais altos para estes parâmetros indicam um aumento das fontes terrígenas sobre as fontes aquáticas.

Estudos prévios utilizando n-alcanos como marcadores geoquímicos para determinação da origem antrópica ou biogênica destes compostos foram realizados em sedimentos da margem continental sudeste da costa brasileira (Zanardi *et al.* 1999; Weber & Bicego, 1987; Medeiros, 2000).

I.2.1.2) Alcanos Isoprenóides

Os alcanos isoprenóides são hidrocarbonetos de cadeia ramificada com estrutura molecular comum derivada do isopreno, um alceno ramificado com cinco átomos de carbono que constitui um dos blocos de construção de cadeias carbônicas favoritos da natureza (Morrison & Boyd, 1995)

O pristano (1,6,10,14 – tetrametil-pentadecano) e o fitano (2,6,10,14-tetrametil-hexadecano) (Figura 2) são isoprenóides muito utilizados em estudos sobre origem de hidrocarbonetos no meio marinho (Cripps, 1989; Cripps 1992; Green *et al.* 1992; Bicego *et al.* 1996). Esses hidrocarbonetos são produzidos a partir da degradação do fitol ($C_{20}H_{40}O$), um álcool abundante na natureza, constituinte da clorofila-a, sendo que a formação de um ou de outro está associada a condições oxidantes (pristano) ou redutoras (fitano), sendo que o pristano é geralmente encontrado em concentrações superiores ao fitano no meio marinho (Cripps, 1989). A determinação da origem dos hidrocarbonetos no meio marinho é feita utilizando-se a relação pristano/fitano. Valores para essa razão superiores a 1,00, geralmente entre 3,00 e 5,00, indicam ausência de contaminação por óleo (Steinhauer & Boehm, 1992). Para valores próximos ou inferiores a 1,00 torna-se necessária a utilização de outros parâmetros, como a concentração de n-alcanos totais, para inferir sobre a origem dos hidrocarbonetos pois, neste caso, pode indicar contaminação por petróleo ou indicar contribuição (Cripps, 1989).

Figura 2: Estrutura básica dos alcanos isoprenóides pristano e fitano.

I.2.2) Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são moléculas que apresentam em sua estrutura pelo menos dois anéis aromáticos, sendo o naftaleno o composto mais simples desse grupo. Os anéis aromáticos podem estar ou não substituídos por cadeias alifáticas como, por exemplo, os derivados metílicos do naftaleno (Figura 3).

Apesar dos PAHs serem sintetizados por fontes naturais como bactérias, plantas e fungos isso raramente ocorre. Assim a sua origem está principalmente associada às fontes antrópicas, como combustão parcial de combustíveis fósseis e seus derivados (contribuição pirolítica), derrames de petróleo (contribuições petrolíticas) e descarte de efluentes domésticos e industriais (Law & Biscaya 1994).

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura
Naftaleno		Fluoranteno
1-metilnaftaleno		Pireno
2-metilnaftaleno		Benzo(a)antraceno
Bifenil		Criseno
2,6-dimetilnaftaleno		Benzo(b)fluoranteno
Acenaftileno		Benzo(k)fluoranteno
Acenafteno		Benzo(e)pireno
2,3,5-trimetilnaftaleno		Benzo(a)pireno
Fluoreno		Perileno
Fenantreno		Indeno[1,2,3-cd]pireno
Antraceno		Dibenzo(ah)antraceno
1-metil-fenantreno		Benzo(g,h,i)perileno

Figura 3: Estrutura de alguns PAHs.

I.2.2.1) PAHs de origem petrogênica

Em geral PAHs de origem petrogênica apresentam principalmente dois ou três ciclos aromáticos em sua estrutura, sendo comum a presença de homólogos alquilados e compostos contendo heteroátomos como oxigênio e enxofre em sua estrutura (Neff 1979). No petróleo bruto os principais PAHs presentes são o naftaleno e seus derivados alquilados, podendo apresentar ainda fenantreno e seus derivados alquilados e antraceno (UNEP, 1991).

I.2.2.2) PAHs de origem pirolítica

Esses PAHs são caracterizados por apresentarem principalmente mais do que 3 ciclos aromáticos e apresentarem um baixo grau de alquilação, se comparado aos PAHs petrogênicos (Neff, 1979).

Os PAHs pirolíticos mais abundantes são: fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)fluorantenos, benzopirenos, indeno(1,2,3-c,d)pireno e benzo(ghi)perileno.

A utilização de razões relativas entre compostos homólogos não substituídos e alquilados, ou entre homólogos de mesmo peso molecular, pode fornecer informações adicionais sobre a origem dos PAHs no meio marinho.

A razão entre a soma da concentração dos metil-fenantrenos e a concentração de fenantreno ($\Sigma m\text{-fenantrenos}/\text{fenantreno}$) indica origem petrogênica ou de óleos derivados quando fornece resultado entre 2,0 e 6,0, enquanto valores próximos a 1,0 indicam possível origem pirolítica ou óleo (Medeiros 2000). Essa razão é ainda apoiada pela razão entre a soma das concentrações dos metil-naftalenos e a concentração de naftaleno ($\Sigma m\text{-naftalenos}/\text{naftaleno}$), que segue o mesmo princípio uma vez que também associa a presença de derivados alquilados à introdução de petróleo (Martins 2001).

Outras relações empregadas são a razão entre benzo(a)antraceno e criseno ($\text{benzo(a)antraceno}/\text{criseno}$) que, fornecendo valores entre 0,06 e 0,40 indica contaminação por petróleo, e a razão fluoranteno/pireno, que quando resulta valores entre 0,60 e 1,40 é também uma indicativa de poluição por essa mistura (Medeiros 2000).

I.2.3) Esteróis

A região costeira é, em geral, a porção do ambiente oceânico com maior tendência à poluição e os estuários são a parte mais afetada da zona costeira. Os ambientes estuarinos são altamente vulneráveis à poluição devido à deposição de partículas de sedimento contaminado de origem terrestre e entrada de águas de rios. De um modo geral, grande parte dos problemas verificados nas regiões costeiras é proveniente de descarga de esgoto doméstico, o qual é despejado no mar *in natura* ou precariamente tratado.

A poluição causada por resíduos de esgoto doméstico é basicamente determinada pela presença de coliformes fecais, principalmente *Escherichia coli* e o grupo dos enterococos. Entretanto esses organismos não sobrevivem muito tempo no ambiente marinho. É necessário, portanto, que outros indicadores químicos ou biológicos sejam utilizados para se constatar a presença ou não de contaminação por esgoto doméstico. Entre as substâncias passíveis de servirem como indicadores dessa poluição os esteróis revelam-se de grande utilidade.

Esteróis e seus derivados, constituintes ubíquos de todos os organismos vivos, são, portanto, importantes biomarcadores geoquímicos. Estes compostos são biosintetizados em uma grande variedade estrutural, apresentam um esqueleto carbônico básico constituído de 17 a 29 átomos de carbono, podendo apresentar grupos metílicos em especial nos carbonos 10 e 13. Sua classificação é baseada principalmente pela presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura (Figura 4).

Figura 4: Estrutura básica dos esteróis.

Os esteróis têm sido usados para distinguir a contribuição marinha ou continental da matéria orgânica sedimentar (Volkman, 1986; Saliot *et al.* 1991; Mudge & Norris, 1997; Fahl & Stein, 1999).

I.2.3.1) Esteróis Naturais

Os sedimentos marinhos apresentam os seguintes esteróis naturais: dinosterol, colesterol, campesterol, β -sitosterol, β -sistostanol e colestanol.

Como os outros lipídeos, os esteróis são bem preservados em ambientes sedimentares. Em sua distribuição no plâncton observam-se os esteróis C_{27} e C_{28} como os mais abundantes. Fezes de fito e zooplâncton são dominadas pelo C_{27} , enquanto que o zooplâncton propriamente dito contém o C_{28} , particularmente o colesterol (cholest-5-en-3 β -ol) (Volkman 1986). O dinosterol é sintetizado apenas por dinoflagelados (Boon *et al.*, 1979; Kokke *et al.* 1982). Os maiores constituintes de plantas superiores são os esteróis C_{29} , o β -sitosterol (24-etil-coleste-5-en-3 β -ol) e o estigmasterol (24-etil-coleste-5,22E-dien-3 β -ol) (Huang & Meinschein, 1979; Volkman, 1986; Saliot *et al.*, 1991). Cálculos baseados nas taxas de C_{27} e C_{29} propostos por Huang & Meinschein (1979), determinam a contribuição terrígena ou marinha no material orgânico sedimentar.

O β -sitosterol, encontrado em plantas vasculares terrestres pode ser associado com o colesterol através da razão colesterol/ β -sitosterol, onde valores próximos a zero indicam que a matéria orgânica encontrada no sedimento tem origem terrígena (Mudge&Lintern, 1999).

I.2.3.2) Esteróis Indicadores de Poluição por Esgoto

Os sedimentos marinhos contaminados por esgoto apresentam, além dos esteróis naturais citados, o coprostanol e o epicoprostanol (Venkatesan & Kaplan, 1990).

O coprostanol e o epicoprostanol são os esteróis mais citados em estudos de determinação do impacto de esgotos, pois não são naturais dos sedimentos marinhos, sendo denominados esteróis fecais (Figura 5).

FIGURA 5: Transformações do colesterol: (I) colesterol (cholest-5-en-3 β -ol); (II) colesteno (cholest-4-en-3-ona); (III) colestano (5 β -colestan-3-ona); (IV) coprostanol (5 β -colestan-3 β -ol); (V) colestano (5 α -colestan-3-ona); (VI) colestanol (5 β -colestan-3 α -ol).

Embora seja uma substância frequentemente encontrada na natureza, proveniente de plantas e organismos, de um modo geral a presença do coprostanol tem sido investigada principalmente como indicadora de contaminação por esgoto urbano.

Quéméneur & Marty (1994) estudando a composição lipídica dos efluentes domésticos verificaram que de 50 a 60% do total de esteróis particulados correspondem ao coprostanol, 24-metil-coprostanol e 24 etil-coprostanol.

Por apresentarem baixa solubilidade em água esses compostos tendem a se associar ao material particulado e a se acumular nos sólidos presentes no esgoto. Isso leva a duas situações: nos tratamentos de esgoto que envolvem a remoção de sólidos encontram-se efluentes com baixos teores de esteróis; por outro lado, em sua forma particulada, os esteróis podem acumular-se nos sedimentos, o que permite inferir se a contaminação por esgoto daquela região é

recente ou contínua, uma vez que em ambientes anóxicos sua degradação é muito lenta.

Venkatesan & Santiago (1989) propuseram a razão entre as concentrações de coprostanol e epicoprostanol (cop/e-cop), como forma de diferenciar a contribuição de esteróis fecais de origem humana da contribuição de esteróis de origem natural. Foi proposta ainda uma outra relação entre a porcentagem de colesterol em relação à concentração total dos esteróis quantificados (colesterol/OLs-totais). Segundo esses autores, valores altos para essa última relação identificam contribuição de fontes naturais, pois mamíferos e aves marinhas contribuem com grandes quantidades de colesterol, enquanto que baixos valores indicam predominância de esteróis fecais, coprostanol e epicoprostanol, cuja principal origem são as fezes humanas. Por esses motivos pode-se utilizar ainda essa relação para avaliar a contribuição marinha ou terrestre.

Uma forma de reforçar a validade desse tipo de indicador é avaliar juntamente com ele a razão C/N. Plantas e organismos, fontes naturais de coprostanol para o meio, liberam no meio, pela degradação de seus tecidos, tanto carbono quanto nitrogênio, constituintes da estrutura de suas proteínas. A entrada de material orgânico por esgoto doméstico fornece quantidades maiores de carbono do que as emitidas pelas plantas. Assim, a razão C/N pode servir como reforço para o uso de esteróis como indicadores de poluição antrópica.

I.2.4) Alquenonas

A determinação de paleotemperaturas é um elemento importante nos estudos de paleoceanografia e paleoclimatologia. Registros das temperaturas de superfície da água fornecem informações sobre mudanças nas correntes oceânicas, intensidade das ressurgências, e estratificação da superfície. Na medida em que a dinâmica das massas d'água pode ser considerada um dos mecanismos mais importantes na movimentação de água de margens continentais, o estudo de suas variações, representado por um de seus

parâmetros mais característicos, a temperatura, pode fornecer informações importantes sobre a dinâmica sedimentar.

Os requerimentos bioquímicos para que os organismos possam sobreviver a uma variação termal e manter uma fluidez constante nas suas membranas celulares têm fornecido muitas respostas para a geoquímica orgânica na determinação de paleotemperaturas. Indicadores geoquímicos de paleotemperaturas podem se basear em propriedades químicas genéricas, cujos pontos de fusão de determinadas moléculas orgânicas são inversamente proporcionais ao número de suas insaturações (Meyers, 1997). Como resultado disto observa-se que os peixes que vivem em águas mais frias têm uma proporção maior de ácidos graxos polinsaturados em seu teor total de lipídeos do que os peixes que vivem em águas mais quentes (Farkas & Csengeri, 1976). Esse fenômeno de aumento do número de insaturações lipídicas com o decréscimo da temperatura como forma de manter a fluidez nas membranas é chamado de adaptação homeoviscosa. A composição lipídica dos peixes, entretanto, representa normalmente uma soma de ambientes pelos quais os peixes migram e são parcialmente afetados pela dieta. Para que indicadores de temperatura, baseados na bioquímica dos organismos, possam ser úteis para reconstruções paleoceanográficas eles devem ser baseados em organismos que representem um ambiente conhecido que é relativamente pouco ou nada afetado pela dinâmica da cadeia alimentar.

Uma série de metil e etil cetonas de cadeia longa, di, tri e tetra insaturadas, foi, pela primeira vez, encontrada em sedimentos ricos em matéria orgânica em 1980 (De Leeun, *et al.* 1980) e subsequentemente observada como amplamente distribuída em sedimentos marinhos (Brassel *et al.*, 1986). Tais compostos, abundantes na *Emiliania huxleyi*, conhecidos como alquenonas, foram identificados como sendo derivados de algas cocolitoforóides da família Gephyrocapsaceae (Volkman *et al.*, 1980). Estes organismos são ainda mais importantes por serem ubíquos na superfície oceânica desde o Pleistoceno Médio, cerca de 1 milhão de anos atrás; pelas alquenonas, por eles produzidas, serem encontradas em sedimentos marinhos; e por satisfazerem muitos dos requisitos

para serem usados como paleoindicadores (Meyers, 1997). Estas alquenonas, que ocorrem amplamente em vastas localidades marinhas, resistem à destruição diagenética em sedimentos tão antigos quanto o Eoceno (Marlowe *et al.*, 1990).

Estudos com algas cultivadas em laboratório demonstraram que estes organismos são capazes de ajustar a insaturação das suas alquenonas em resposta à sua temperatura de crescimento (Versteegh *et al.* 2001). O número de insaturações na distribuição das cetonas na *E. huxleyi* varia entre 1 e 4, e o número de duplas ligações diminui com o aumento da temperatura da água (Figura 6). Baseado nestes estudos foi proposto que as alquenonas depositadas em sedimentos marinhos fornecem um registro químico da temperatura da superfície da água no tempo em que o fitoplâncton, fonte destes compostos, vivia (Brassel *et al.*, 1986; Prahl *et al.*, 1988).

Figura 6: Alquenonas insaturadas – insaturação x temperatura da água.

I.2.4.1) Índice U_{37}^K e Temperatura

A relação experimental entre temperatura e a distribuição de cetonas di, tri e tetra insaturadas, sintetizadas pelos cocolitoforídeos, é expressa por equações empíricas que relacionam a composição relativa dos homólogos da alquenona C_{37} mais abundantes e sensíveis à temperatura.

A composição relativa de alquenonas C_{37} é expressa pelo índice:

$$U_{37}^{K'} = \left\langle \frac{[C37:2] - [C37:4]}{[C37:2] + [C37:3] + [C37:4]} \right\rangle \quad (3)$$

onde [C_{37:2}], [C_{37:3}], [C_{37:4}] são respectivamente as concentrações de 15E, 22E heptatriaconta-dien-2ona; 8E, 15E, 22E heptatriaconta-trien-2ona e 8E, 15E, 22E, 29E heptatriaconta-tetraen-2ona.

A Equação 3 geralmente é simplificada para:

$$U_{37}^k = \left\langle \frac{[C_{37:2}]}{[C_{37:2}] + [C_{37:3}]} \right\rangle \quad (4)$$

A Equação 4 não considera a concentração dos homólogos tetrainsaturados uma vez que essa espécie é componente minoritário e encontrado em sedimentos oceânicos de média e alta latitude.

A relação entre o índice U_{37}^K e a temperatura (T) em graus Celsius é dada pela Equação 5 relatada por Prahl and Wakeman (1987)

$$U_{37}^K = 0,033T + 0,043 \quad (5)$$

Reorganizando essa equação, tem-se:

$$T = 30,30 U_{37}^K - 1,30 \quad (6)$$

Isso significa que quanto maior for a temperatura, maior será o número de alquenonas di insaturadas em relação às tri insaturadas.

Esta expressão foi obtida através de experimentos usando culturas de laboratório e a resposta obtida mostrou uma linearidade excelente entre as temperaturas de 8 a 25 °C, com precisão melhor que 0,5 ° C. (Villanueva & Grimalt, 1995) (Figura 7).

O uso do U_{37}^K como indicador de temperatura requer uma calibração sólida. Para validar os trabalhos feitos em laboratório foram feitas calibrações com análises do material orgânico particulado ao longo da coluna d'água e com coletas em "sediment traps" (Prahl & Wakeman, 1987; Conte & Eglington, 1993; Prahl *et al.* 1993; Sawada *et al.*, 1998; Bentaleb, *et al.* 1999) e, ainda extraíndo-se material

orgânico de sedimentos recentes (Rossell-Mellé *et al.* 1995; Sozongoni *et al.* 1997) provenientes de diferentes oceanos. Em ambos os casos, foram obtidos coeficientes de correlação significativos entre o U_{37}^K e as temperaturas de superfície do mar observadas.

Figura 7 – Relação teórica entre a temperatura e índice U_{37}^K .

Vários trabalhos têm sido realizados para investigar as temperaturas da superfície da água do mar desde o último período glacial usando dados de insaturação das alquenonas (U_{37}^K) (Prah, *et al.*, 1989; Prah, *et al.* 1995; Chapman, *et al.* 1996; Doose, *et al.* 1997).

Estudos de calibração entre 60° S e 60° N no leste do Oceano Atlântico mostraram boa correlação entre os índices U_{37}^K e temperaturas de superfície do mar (Müller *et al.*, 1998). Em um estudo recente (Benthien & Müller, 1999), foi realizada uma calibração cobrindo a área do Atlântico Sul entre 5° N e 50° S e 60° W a 20° W, a partir de amostras coletadas ao longo da costa da América do Sul e obteve-se uma ótima correlação entre os índices U_{37}^K e temperaturas de superfície do mar em todos os pontos ao Norte de 32° S.

Considerando os estudos de calibração realizados para o oeste do Atlântico Sul, (Müller *et al.*, 1998, Benthien & Müller, 1999), a temperatura obtida através do índice U_{37}^K apresenta um desvio de $\pm 1,5^\circ$ C, correspondente a $\pm 0,05 U_{37}^K$, em relação à média anual de temperatura para o Atlântico Sul (Benthien & Müller, 1999).

II - OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivos:

1. Otimização da metodologia analítica para a identificação e quantificação de biomarcadores geoquímicos orgânicos, já aplicada no Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO – USP, sendo eles, hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e esteróis e incluir na metodologia a extração e identificação das alquenonas $C_{37:2}$ e $C_{37:3}$.
2. Aplicação da metodologia em sedimentos da região de Cabo Frio.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1) Área de Estudo

Cabo Frio localiza-se na baixada litorânea a nordeste do estado do Rio de Janeiro, estende-se por uma superfície de 400,2 Km², sendo as coordenadas geográficas da sede municipal da cidade 22°52'46" S e 42°01'07" W, numa altitude média de 2m acima do nível do mar. O município limita-se ao norte com Casimiro de Abreu, ao sul com Arraial do Cabo, a oeste com Araruama e São Pedro da Aldeia e a leste com o Oceano Atlântico e Búzios.

Nessa região ocorre o ponto extremo de inflexão da costa brasileira na região sudeste, sendo a mudança na orientação da linha de costa, seguindo de norte para sul, de quase 90° no sentido de leste para oeste (Figura 8).

Figura 8. Localização de Cabo Frio, ponto máximo de inflexão da linha de costa na região sudeste

Na margem continental brasileira, o Cabo Frio marca a transição entre os ambientes tropicais, a norte, e os subtropicais, a sul (Rocha *et al.*, 1975). Esta transição é marcada por características oceanográficas bastante diferenciadas e uma dinâmica sedimentar distinta, havendo o predomínio da sedimentação carbonática ao norte do Cabo Frio (margem continental leste) e da sedimentação terrígena ao sul (margem continental sul). Particularmente, na região ao largo do Cabo Frio, o processo de ressurgência leva à deposição de lamas, ricas em matéria orgânica.

Na região do Cabo Frio, o clima tropical e subtropical úmido, dá lugar a um micro-clima seco, condicionado pelo regime de ventos.

A dinâmica de massas d'água na plataforma continental interna e média da plataforma continental sudeste do Brasil é dominada pelo deslocamento de três massas, que apresentam sazonalidade acentuada (Castro Filho *et al.*, 1987). Entre novembro e março a Água Central do Atlântico Sul (ACAS) avança, pelo fundo em direção à linha de costa, induzindo o deslocamento da Água Costeira (AC), e mantendo a Água Tropical (AT) relativamente distante da linha de costa. A partir de março, com o recuo da ACAS em direção ao talude continental, a AT passa a exercer maior influência sobre os processos de plataforma.

Segundo Mahiques *et al.* (1999) o deslocamento da AC em direção a porções mais externas da plataforma, nos meses de verão, é o responsável maior pela exportação e deposição de matéria orgânica, de natureza terrígena, em áreas mais profundas.

Parece haver uma maior estabilidade na dinâmica de massas d'água sobre a plataforma externa, talude e áreas mais profundas. A AT exerce influência até profundidades da ordem de 200 metros, seguida pela ACAS, que se estende até cerca de 600 metros de profundidade e marca o desenvolvimento de uma termoclina pronunciada. Abaixo da ACAS deslocam-se, em sequência, para norte a Água Intermediária Antártica (AIA), até cerca de 2500 metros de profundidade, para sul a Água Profunda do Atlântico Norte (APAN), até 3500 metros e, finalmente, para norte, a Água Antártica de Fundo (AAF), até o fundo das bacias oceânicas.

O fenômeno da ressurgência é ocasionado pela divergência das águas superficiais, o que faz com que as águas de fundo subam, tomando o lugar da água superficial em deslocamento. A ressurgência traz águas normalmente mais frias, menos salinas e com maior concentração de nutrientes do que as águas superficiais. Esse processo resulta em uma maior produtividade primária, com reflexos positivos em toda a cadeia alimentar e tem enorme importância comercial para a pesca. O fenômeno pode ser sazonal e a disponibilidade de nutrientes também corresponderá a essas mudanças sazonais. Este é o processo que mais contribui para trazer a água rica em nutrientes, da zona mais profunda do oceano para a superfície.

Na costa brasileira o fenômeno da ressurgência costeira ocorre principalmente na região Cabo Frio (Emilsson, 1961). Nesta área, este é um processo sazonal, ocorrendo com muito maior frequência no verão do que no inverno (Ikeda *et al.*, 1974;).

Um dos trabalhos precursores sobre a ressurgência de Cabo Frio é o de Allard (1955), que registrou a correlação entre os eventos de afloramento de água fria e a predominância de ventos provenientes do quadrante leste. Desde então, diversos autores têm analisado aspectos particulares do fenômeno, e estudos indicam que a água fria e rica que aflora na superfície pertence à Água Central do Atlântico Sul (ACAS) (Silva & Rodrigues, 1966, Miranda, 1985).

III.2) Metodologia

III.2.1) Amostragem

Para a aplicação da metodologia foi escolhido um testemunho coletado na região de Cabo Frio, estação oceanográfica 6952, latitude $23^{\circ}00'48''$ S, longitude $41^{\circ}44'98''$ W, (figura 9) durante um cruzeiro realizado em maio de 2001 com o Navio Oceanográfico Prof. W. Besnard, do IOUSP, dentro do Projeto: “Importância e Caracterização da Quebra da Plataforma Para Recursos Vivos e não Vivos”, financiado pelo CNPq (PADCT). A amostragem foi feita em frente à área de ressurgência de Cabo Frio, com um box corer. Foram realizadas sub-amostragens contínuas de 2 cm de espessura em todas atingindo 26 cm de espessura. As sub-amostras foram datadas utilizando a técnica AMS ^{14}C .

Figura 9. Localização do ponto de coleta da amostra

As amostras de sedimento para análise de compostos orgânicos foram estocadas em papel alumínio em temperaturas abaixo de -15°C para posterior liofilização.

Depois de liofilizadas, as amostras foram submetidas à metodologia otimizada.

III.2.2) Limpeza do Material

Toda a vidraria e objetos utilizados foram deixados em banho de Extran alcalino (Merk) durante pelo menos 8 horas a fim de eliminar qualquer resíduo orgânico. O material foi então enxaguado em água corrente e por fim em água destilada. Todo o material foi seco em estufa a aproximadamente 150°C , com exceção do material volumétrico que foi seco a temperatura ambiente, e devidamente armazenado. No momento da utilização o material foi lavado 3 vezes com n-hexano grau resíduo de forma a minimizar a possibilidade da inserção de contaminantes orgânicos nas análises.

III.2.3) Tratamento dos Reagentes

Uma vez que se deseja analisar traços de compostos, todos os solventes empregados necessitam ter um alto grau de pureza para que não interfiram nas análises. Dessa forma utilizou-se apenas solventes grau resíduo, com exceção do etanol absoluto, que foi bidestilado em laboratório.

Tanto a sílica quanto o sulfato de sódio foram aquecidos à temperatura de 400°C durante 4 horas com a finalidade de eliminar possíveis interferentes orgânicos. Depois de aquecidos foram armazenados em frascos de vidro e estocados em dessecador sob vácuo. Antes da utilização da sílica, essa foi totalmente ativada em estufa a 140°C , resfriada em dessecador sob vácuo e parcialmente desativada com 5% de água. A água utilizada para desativação da sílica foi isentada de compostos orgânicos através da extração com n-hexano (7 x 30 ml de n-hexano / L de água).

III.3) Identificação e Quantificação dos Analitos de Interesse

A quantificação de compostos utilizando análises cromatográficas exige que sejam definidas as condições nas quais as amostras serão injetadas no cromatógrafo de modo que se resolvam todos os compostos de interesse. A descrição de como a identificação dos compostos foi realizada bem como as rampas de temperatura no injetor e na coluna do cromatógrafo e as curvas de calibração utilizadas que melhor responderam as propostas do trabalho são descritas a seguir.

III.3.1) Identificação e quantificação usando o GC-FID

III.3.1.1) Hidrocarbonetos Alifáticos

A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos se baseou em seus respectivos tempos de retenção, obtidos através da injeção de padrões externos, de concentrações conhecidas, contendo os n-alcenos de 12 a 34 átomos de carbono e o isoprenóide pristano (Figura 10). Para os n-alcenos n-C₁₃, n-C₁₅, n-C₁₉, n-C₂₇, n-C₂₉, n-C₃₁, n-C₃₃ e o isoprenóide fitano, cujos padrões de referência não foram obtidos, a identificação foi feita calculando o índice de retenção desses compostos.

Figura 10 - Exemplo de cromatograma com padrões de hidrocarbonetos alifáticos

Para a quantificação de cada um dos hidrocarbonetos alifáticos, foram feitas curvas de calibração com soluções diluídas contendo mistura de padrões desses hidrocarbonetos na faixa de $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, que foram injetadas no GC-FID nas mesmas condições das análises. No caso dos n-alcenos que não foram obtidos os padrões, utilizaram-se os fatores de resposta dos n-alcenos imediatamente anteriores e, para o isoprenóide fitano, utilizou-se o fator de resposta do isoprenóide pristano. A validação da curva de calibração de um determinado composto está associada ao índice de correlação de Pearson, que deve ser igual ou superior a 99,5%, $r \geq 0,995$ (Sericano, 1998). As curvas de calibração de todos os hidrocarbonetos alifáticos apresentaram $r \geq 0,995$.

A quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos picos cromatográficos obtidos. Para a quantificação dos analitos utilizou-se o método de adição de padrão interno (PI), como forma de correção de possíveis perdas ou adições de compostos durante o processo metodológico. Como padrões internos utilizaram-se o hexadeceno ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}$) e o eicoseno ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}$). Com a finalidade de monitorar a perda do padrão interno durante o processo de extração foi adicionado, antes da injeção no cromatógrafo, um padrão interno cromatográfico (PICG). Assim a perda no padrão interno é dada por:

$$R_{(PICG)} = \frac{C_{obPI}}{C_{obPICG}} \times \frac{C_{rPICG}}{C_{rPI}} \times 100 \quad (7)$$

Sendo $R_{(PICG)}$ a recuperação do PICG, C_{obPI} a concentração de PI obtida, C_{obPICG} a concentração de PICG obtida, C_{rPI} a concentração de PI real e C_{rPICG} a concentração de PICG real.

Os padrões internos são adicionados antes da extração e os padrões internos cromatográficos são adicionados antes da injeção no cromatógrafo. Como padrão interno cromatográfico utilizou-se o tetradeceno ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}$).

III.3.1.2) Alquenonas

A identificação e quantificação das alquenonas passou por um processo mais complicado, uma vez que, no início das tentativas de identificação não haviam padrões disponíveis desses compostos. Inicialmente as tentativas de identificação das alquenonas foram feitas comparando-se visualmente os cromatogramas obtidos de amostras reais com cromatogramas extraídos da literatura (Villanueva, 1995, Villanueva, 1996, Gogou 1997). Nas tentativas de identificação das alquenonas encontrou-se comportamento parecido nos cromatogramas obtidos através da análise de amostras de sedimento marinho (Figura 11) com os extraídos da literatura (Figura 12). A confirmação da identificação das alquenonas só foi feita após a obtenção do padrão de alquenonas, fornecido pelo laboratório do Dr. Fredrick Prahl da Universidade do Estado de Oregon, Corvallis, USA., comparando-se os tempos de retenção das alquenonas no cromatograma gerado pelas amostras de sedimento (Figura 13) com os tempos de retenção das alquenonas observados no cromatograma gerado pela solução contendo o padrão das alquenonas (Figura 14).

Definidas as condições analíticas que tornam possível a separação e a identificação das alquenonas, montou-se uma curva de calibração, utilizando os padrões de alquenonas, com faixa de concentração variando entre 0,5 e 6 ng.μL⁻¹.

Da mesma forma como foi feito para os hidrocarbonetos alifáticos, o método de quantificação se baseou na adição de padrão interno. O padrão interno adotado foi o hexatriacontano (C₃₆H₇₄), devido à sua longa cadeia carbônica, com um carbono a menos que a cadeia das alquenonas, o que faz com que o tempo de retenção deste seja próximo ao das alquenonas.

Para controle do padrão interno foi adotado o mesmo padrão interno cromatográfico utilizado para os hidrocarbonetos alifáticos, o tetradeceno.

Figura 11 – Cromatograma obtido no laboratório pela análise de amostras de sedimento marinho.

Figura 12 - Exemplo de cromatograma contendo alquenonas de cadeia longa -(Gogou, 1997).

Figura 13 - Cromatograma obtido para amostra de sedimento marinho extraída no laboratório

Figura 14 - Cromatograma obtido para as amostras contendo padrões de alquenonas, C_{37:3} = heptatriaconta-8E,15E,22E-trien-2-ona, C_{37:2} = heptatriaconta-15E,22E-dien-2-ona.

III.3.1.3) Condições cromatográficas para análise de hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas

Para a realização das análises dos hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas utilizou-se um cromatógrafo a gás Agilent (modelo 6890) com injetor automático Agilent (modelo 7683) equipado com detector de ionização de chama (FID). A injeções foram feitas em modo “on column”. O injetor foi programado com pressão constante de 7,24 psi e temperatura variando de 40° C a 300° C conforme rampa mostrada na figura 15.

Figura 15: Rampa de temperatura do injetor.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica (HP 5) com as seguintes dimensões: 50m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,17 µm de espessura do filme, sendo a fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi o H₂ (pureza > 99,999%), com pressão constante de 7,24 psi no injetor.

A rampa de temperatura no forno, para separação dos compostos, iniciou em 40° aumentando até 60° C na razão de 20° C.min⁻¹. A partir daí a temperatura aumentou até 250° C à taxa de 5° C.min⁻¹. Nesse ponto a taxa de aquecimento foi alterada para 20° C.min⁻¹, elevando a temperatura até 300° C, quando a taxa de aquecimento foi novamente alterada para 6° C.min⁻¹, elevando a temperatura até 320°C e permanecendo constante por 20 minutos, totalizando o tempo de separação dos compostos em 84,83 minutos (Figura 16)

Figura 16: Rampa de temperatura na coluna para análise dos hidrocarbonetos alifáticos.

O detector foi mantido a 325° C recebendo fluxo de H₂ de 30 mL.min⁻¹, fluxo de ar sintético de 350 mL.min⁻¹, e fluxo de N₂ (auxiliar) de 30 mL.min⁻¹. A taxa de aquisição de sinal foi programada em 20 Hz.

III.3.2) Identificação e quantificação usando o GC-MS

III.3.2.1) Hidrocarbonetos Aromáticos (PAHs)

Para a identificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizou-se soluções de padrões externos contendo cada um dos PAHs de interesse. Essas soluções foram injetadas nas mesmas condições de análise das amostras. A identificação dos compostos se deu pela análise do espectro de massa obtido pelo GC-MS a partir do sistema de aquisição. A aquisição desses espectros foi feita em modo de sistema de monitoramento de íons (SIM), por impacto eletrônico, sendo a tensão do eletromultiplicador 400V e as razões que foram monitoradas de m/z mostradas na figura 17. Com essas soluções, de concentrações de PAHs variando entre 0,1 e 1,0 ng.µL⁻¹, foram montadas curvas de calibração para cada um dos compostos. A quantificação dos mesmos também se fez utilizando padrão interno. Para isso utilizou-se 5 padrões internos, hidrocarbonetos aromáticos deuterados, sendo eles: naftaleno d8, acenafteno d10, fenantreno d10, criseno d12 e perileno d12. Como forma de controle do padrão interno adotou-se o padrão interno cromatográfico 9,10 dihidroantraceno.

Figura 17 - Cromatograma com padrões de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e respectivas razão m/z.

III.3.2.2) Condições cromatográficas para análise dos PAHs

Para realização da análise dos hidrocarbonetos aromáticos utilizou-se um cromatógrafo a gás Agilent (modelo 6890) com injetor automático Agilent (modelo 7683), acoplado a um detector de massa Agilent (modelo 5973). A injeções foram feitas em modo “sem divisão de fluxo”. O injetor foi programado com temperatura constante de 280° C.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica (HP Ultra 2) com as seguintes dimensões: 50m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,17µm de espessura do filme, sendo a fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi o He (pureza > 99,999%), com fluxo constante de 1mL.min⁻¹.

A rampa de temperatura no forno, para separação dos compostos, iniciou em 40° C, permanecendo nessa temperatura durante 20 minutos, a partir de então foi aumentando até 60° C na razão de 20° C.min⁻¹. A partir daí a temperatura aumentou até 290° C à taxa de 5° C.min⁻¹, permanecendo constante por 5 minutos. Nesse ponto a temperatura foi elevada até 300° C, ainda à taxa de 5° C.min⁻¹, sendo então mantida constante por 10 minutos, totalizando o tempo de separação dos compostos em 66 minutos (Figura 18).

Figura 18: Rampa de temperatura na coluna para análise dos PAHs.

O detector de massa foi mantido à temperatura constante de 300° C.

III.3.2.3) Esteróis

Devido à baixa volatilidade e alto peso molecular a análise dos esteróis é dificultada quando realizada por cromatografia a gás. Uma forma de se aumentar a volatilidade dos esteróis é o processo de derivatização, onde os esteróis são convertidos a ésteres trimetil-silícicos através da substituição do hidrogênio da hidroxila (-OH) da posição 3 dos esteróis pelo grupo trimetil-silícico (-Si(CH₃)₃) do reagentes N,O-bis(trimetil-silil-trifluor-acetamida)/trimetil-cloro-silano (9:1) (BSTFA/TCMS). (Figura 19). Essa substituição possibilita a resolução dos esteróis por cromatografia gasosa (Martins 2001).

Figura 19: Reação de derivatização dos esteróis.

Para a identificação dos esteróis foram utilizadas soluções de padrões externos contendo cada um dos esteróis de interesse. Essas soluções foram derivatizadas e injetadas. A derivatização é feita levando a solução que contém os esteróis a secar, sob fluxo de N₂ (g), adicionando 40 µL de BSTFA/TCMS e aquecendo essa solução a 65° C em banho-maria durante 1,5 horas. A solução é novamente seca em fluxo de N₂ (g) e os compostos recuperados em solvente.

A identificação dos esteróis foi feita com base nos tempos de retenção obtidos a partir das soluções de padrões externos e na razão m/z de cada composto (Figura 20). O espectro de massa foi obtido em modo de sistema de monitoramento de íons (SIM), por impacto eletrônico, sendo a tensão do eletromultiplicador 400V. Com essas soluções, de concentrações de esteróis variando entre 0,5 e 10 ng.µL⁻¹, foram montadas curvas de calibração para cada um dos compostos. A quantificação dos esteróis foi feita utilizando padronização interna. O padrão interno adotado foi o 5α androstanol. Como forma de controle do padrão interno adotou-se o padrão interno cromatográfico 5α colestano.

Figura 20: Exemplo de cromatograma com padrões de esteróis

III.3.2.4) Condições cromatográficas para análise dos esteróis

Para realização da análise dos esteróis utilizou-se um cromatógrafo a gás Agilent (modelo 6890) com injetor automático Agilent (modelo 7683), acoplado a um detector de massa Agilent (modelo 5973). As injeções foram feitas em modo “sem divisão de fluxo”.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica (HP Ultra 2) com as seguintes dimensões: 50m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,17 μ m de espessura do filme, sendo a fase estacionária composta por 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano. O gás de arraste utilizado foi o He (pureza > 99,999%), com fluxo constante de 0,8 ml.min⁻¹.

A rampa de temperatura no forno, para separação dos compostos, iniciou em 40° C aumentando até 240° C na razão de 20° C.min⁻¹, a partir daí a temperatura aumentou até 255° C à taxa de 0,25° C.min⁻¹, permanecendo constante por 10 minutos. Nesse ponto a temperatura foi elevada até 300° C, à taxa de 20° C.min⁻¹, sendo então mantida constante por 5 minutos, totalizando o tempo de separação dos compostos em 87,25 minutos (Figura 21).

Figura 21: Rampa de temperatura na coluna para análise dos esteróis.

O detector de massa foi mantido à temperatura constante de 300° C.

III.4) Otimização da Metodologia Analítica

A análise de compostos biomarcadores geoquímicos orgânicos – hidrocarbonetos alifáticos, esteróis e PAHs – é feita rotineiramente no Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO – USP através de uma metodologia satisfatória. Com o intuito de analisar além desses compostos, as alquenonas de cadeia longa C_{37:2} e C_{37:3} realizando uma única extração lipídica no sedimento, e de promover a redução no tempo de extração e no volume de solventes orgânicos utilizados, foram realizados testes metodológicos para se obter um protocolo analítico que respondesse aos objetivos do trabalho.

O procedimento analítico foi baseado nos trabalhos de Gogou (1997), Villanueva (1996) e Benthien (1999) sendo os procedimentos descritos pelos autores adaptados para as propostas deste trabalho. Foram feitos testes utilizando ou não a hidrólise alcalina, utilizando diferentes solventes na extração lipídica, e utilizando sílica e sílica-alumina como adsorventes na coluna cromatográfica.

III.4.1) Teste de Hidrólise Alcalina

O procedimento analítico adotado com base nos trabalhos já mencionados está descrito abaixo. Com esse procedimento testou-se a influência da hidrólise alcalina na extração dos biomarcadores geoquímicos orgânicos. As figuras 22 e 23 resumem a metodologia empregada com e sem o uso da hidrólise alcalina, respectivamente.

10 g de amostra foram pesados em frascos de aproximadamente 25 mL, adicionadas de padrões internos (PI) e para amostras spike, de padrões externos (PE), de forma a se obter nos extratos finais $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de n-alcenos, $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de PAHs e $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de esteróis. A extração foi feita em ultra-som utilizando CH_2Cl_2 (3x10 mL – 3x30 min). As frações da extração foram transferidas para um balão de 125 mL. Aos balões foi adicionado cobre metálico (cerca de 5 g) para eliminação de sulfetos. Após 2 horas os extratos foram evaporados até volume aproximado de 1 mL. Para o extratos em que se desejava testar a hidrólise alcalina aplicou-se o processo em destaque abaixo, para o teste sem a hidrólise alcalina, pulou-se esse processo.

Hidrólise Alcalina

Os extratos foram transferidos para frascos graduados e evaporados até secar sob fluxo de N_2 e banho de 60°C . Em cada frasco foram adicionados 3 mL de solução de KOH 6% em etanol e estocado por 6 horas em temperatura ambiente. Adicionou-se então a cada frasco 2 mL de água e foi feita extração com n-hexano (3 x 3 mL). Com auxílio de pipeta Pasteur a fase orgânica foi transferida para um balão de 125 mL

Ao concentrado aplicou-se o processo de separação utilizando coluna de 35 x 0,6 cm contendo 2g de sílica 5% desativada na seguinte ordem de eluição: 15 mL de n-hexano (HCs alifáticos F1), 15 mL de n-hexano - CH_2Cl_2 20% (PAHs e alquenonas F2) e 15 mL de n-hexano – Acetato de Etila (EtAc) 30% (esteróis F3). As frações foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo até volume aproximado de 0,5 mL e transferidas para frasco âmbar graduado de 1 mL. Em F1 e F2 foram adicionados padrões internos cromatográficos, de forma a se obter nos extratos finais, respectivamente, $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de n-alcenos, $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de PAHs, e os volumes completados para 1 mL. F1 foi analisada em

GC - FID e F2 em GC – FID e em MS. F3 foi derivatizada, adicionada de padrão interno cromatográfico, de forma a se obter na solução final $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de esterol, e analisada em GC – MS.

Figura 22: Fluxograma da metodologia adaptada com hidrólise alcalina.

Figura 23: Fluxograma da metodologia adaptada (sem hidrólise alcalina)

III.4.2) Teste Alterando a Polaridade dos Solventes e o Número de Frações

Nesse teste foram utilizados solventes mais polares tanto na extração lipídica quanto na coluna cromatográfica visando otimizar a extração dos analitos de interesse. Além de aumentar a polaridade dos solventes optou-se por unir em uma única fração os hidrocarbonetos alifáticos, alquenonas e PAHs. O procedimento utilizado está descrito abaixo e é resumido na figura 24.

10 g de amostra foram pesados em frascos de aproximadamente 25 mL, adicionadas de PI e as amostras spike de PE, de forma a se obter nos extratos finais $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de n-alcenos, $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de PAHs e $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de esteróis, e feita a extração por ultra-som utilizando CH_2Cl_2 – etanol (EtOH) 50% (2x10 mL) e CH_2Cl_2 100% (10 mL). As frações foram unidas em balões de 125 mL. Aos balões foram adicionados cobre metálico (cerca de 5g). Após 2 horas os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo até o volume aproximado de 1 mL e transferidos para frascos graduados. Aos concentrados foram adicionados 3 mL de KOH 6% em etanol e estocados por 6 horas em temperatura ambiente. Aos frascos foram adicionados 2 mL de água para eliminar traços de KOH e extraídos com n-hexano (3x3 mL), sendo a fase orgânica transferida para balões de 250 mL e concentradas para 2 mL. Aos concentrados aplicou-se o processo de separação utilizando coluna de 35 x 0,6 cm contendo 2 g de sílica 5% desativada na seguinte ordem de eluição: 12 mL de DCM - n-hexano (8:2) -(HCs alifáticos, alquenonas e PAHs - F1) e 12 mL de EtOH - CH_2Cl_2 (8:2) (esteróis – F2). As frações foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo até volume aproximado de 1 mL e transferidas para frasco âmbar graduado de 1 mL. Sob fluxo de N_2 as frações foram concentradas até pouco menos de $100 \mu\text{L}$. Em F1 foi adicionado padrão interno cromatográfico de forma a se obter nos extratos finais $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de n-alcenos, $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de PAHs e o volume completado até $100 \mu\text{L}$. F1 foi analisada em GC - FID para identificação dos HCs alifáticos e alquenonas e em GC-MS para análise dos PAHs. F2 foi derivatizada, adicionada de padrão interno cromatográfico de forma a

se obter na solução final $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de esterol, recuperada em n-hexano até volume de $100 \mu\text{L}$ e analisada em GC – MS.

Figura 24: Fluxograma da metodologia utilizada aumentando a polaridade dos solventes orgânicos na extração e unindo em uma só fração HCs alifáticos, alquenonas e PAHs.

III.4.3) Testes Utilizando Sílica e Sílica-Alumina como Adsorventes

Com o intuito de se obter cromatogramas com o mínimo de interferentes foi testado o uso da sílica-alumina como adsorvente na coluna cromatográfica. Além do uso da sílica-alumina decidiu-se partir de 15g de amostra ao invés de 10g e concentrar o volume final de F1 para 250 μ L para facilitar a injeção da fração tanto do GC-FID quanto no GC-MS. O procedimento, resumido na figura 25 está descrito abaixo.

15 g de amostra foram pesados em frascos de aproximadamente 25 mL, adicionadas de PI e as amostras spike de PE, de forma a se obter nos extratos finais 5,0 ng. μ L⁻¹ de padrões de n-alcanos, 0,5 ng. μ L⁻¹ de padrões de PAHs e 5,0 ng. μ L⁻¹ de padrões de esteróis e feita a extração por ultra-som utilizando CH₂Cl₂ – etanol (EtOH) 50% (2x10 mL) e CH₂Cl₂ 100% (10 mL). As frações foram unidas em balões de 125 mL. Aos balões foram adicionados cobre metálico (cerca de 5g). Após 2 horas os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo até o volume aproximado de 1 mL e transferidos para frascos graduados. Aos concentrados foram adicionados 3 mL de KOH 6% em etanol e estocados por 6 horas em temperatura ambiente. Aos frascos foram adicionados 2 mL de água para eliminar traços de KOH e extraídos com n-hexano (3x3 mL), sendo a fase orgânica transferida para balões de 250 mL e concentradas para 2 mL. O concentrado foi fracionado utilizando coluna cromatográfica de 35 x 0,6 cm contendo 2 g de sílica 5% desativada e para o teste utilizando sílica-alumina, 2g de sílica 5% desativada e 1g de alumina, na seguinte ordem de eluição: 12 mL de DCM - n-hexano (8:2) -(HCs alifáticos, alquenonas e PAHs - F1) e 12 mL de EtOH - CH₂Cl₂ (8:2) (esteróis – F2). As frações foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo até volume aproximado de 1 mL e transferidas para frasco âmbar graduado de 1 mL. Sob fluxo de N₂ as frações foram concentradas até cerca de 100 μ L. Em F1 foi adicionado padrão interno cromatográfico de forma a se obter nos extratos finais 5,0 ng. μ L⁻¹ de padrão de n-alcanos, 0,5 ng. μ L⁻¹ de padrão de PAHs e o volume completado até 250 μ L. F1 foi analisada em GC - FID para

identificação dos HCs alifáticos e alquenonas e em GC-MS para análise dos PAHs. F2 foi derivatizada, adicionada de padrão interno cromatográfico, de forma a se obter na solução final $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrão de esteroide, recuperada em n-hexano até volume de $250 \mu\text{L}$. analisada em GC – MS.

Figura 25: Fluxograma da metodologia utilizada para se comparar o uso da sílica-alumina com o uso da sílica na coluna cromatográfica.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1) Otimização da Metodologia Analítica

Os testes realizados para otimizar a metodologia para a análise dos hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alquenonas e esteróis permitiram avaliar a influência das varias etapas empregadas na metodologia analítica e obter, assim, um protocolo analítico que satisfaça os requisitos desse trabalho.

IV.1.1) Avaliação do Uso da Hidrólise Alcalina

Ambos os procedimentos testados, com e sem hidrólise alcalina, permitiram resolver os hidrocarbonetos alifáticos e PAHs e quantificar os hidrocarbonetos alifáticos, mas mostraram-se insatisfatórios para a quantificação dos PAHs e não resolveram as alquenonas e esteróis. Os cromatogramas obtidos para essas extrações são mostrados nas figuras 26, 27, 28 e 29.

A não utilização da hidrólise alcalina gerou cromatogramas, tanto para os hidrocarbonetos alifáticos quanto para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, com mais interferentes dos que os cromatogramas gerados quando a hidrólise alcalina foi realizada. Sendo assim, o uso da hidrólise alcalina foi retomado. Em nenhum dos casos foi possível identificar as alquenonas e os esteróis.

Com base nesses resultados optou-se por aumentar a polaridade dos solventes utilizados tanto na extração por ultra-som quanto na coluna cromatográfica como forma de aumentar a eficiência da extração de compostos mais polares, como os esteróis e as alquenonas, e de extrair em uma única fração os hidrocarbonetos alifáticos, os PAHs e as alquenonas.

Figura 26: Cromatograma de hidrocarbonetos alifáticos (F1) do teste de metodologia com hidrólise alcalina - análise em FID

Figura 27: Cromatograma de hidrocarbonetos alifáticos (F1) do teste de metodologia sem hidrólise alcalina – análise em FID

Figura 28: Cromatograma de PAHs (F2) do teste de metodologia com hidrólise alcalina - análise em MS

Figura 29: Cromatograma de PAHs (F2) do teste de metodologia sem hidrólise alcalina – análise em MS

IV.1.2) Avaliação do Uso de Solventes Mais Polares na Extração e da Redução do Número de Frações

O emprego de solventes mais polares e a união em uma única fração dos HCs alifáticos, alquenonas e PAHs permitiu a identificação e quantificação tanto dos hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas em F1 pelo FID (Figura 30) e dos PAHS em F1 (Figura 31) e esteróis em F2 (Figura 32) pelo MS.

Apesar do método permitir a quantificação de todos os analitos de interesse, a quantificação dos PAHs foi dificultada pois, entre a injeção no FID e no MS, grande parte do solvente da solução final evaporava, prejudicando a quantificação dos compostos. Com esses resultados decidiu-se aumentar a quantidade de amostra a ser extraída e aumentar o volume final de F1.

Figura 30: Cromatograma de hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas (F1) do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em FID

Figura 31: Cromatograma de PAHs (F1) do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em MS

Figura 32: Cromatograma de esteróis (F2) do teste de metodologia utilizando solventes mais polares – análise em MS

IV.1.3) Avaliação do Uso da Sílica-Alumina na Coluna Cromatográfica

O aumento no volume da solução final de F1 possibilitou identificar e quantificar todos os analitos de interesse sem que o problema da evaporação do solvente acarretasse em erros na quantificação dos compostos. O uso de sílica-alumina na coluna cromatográfica não forneceu resultados melhores do que os obtidos utilizando apenas sílica, sendo sua utilização descartada. As figuras 33 e 34, 35 e 36, e 37 e 38 mostram os resultados obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas, PAHs e esteróis utilizando apenas sílica e utilizando sílica-alumina.

Figura 33: Cromatograma de HCs alifáticos e alquenonas utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.

Figura 34: Cromatograma de HCs alifáticos e alquenonas utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica.

Figura 35: Cromatograma de PAHs utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.

Figura 36: Cromatograma de PAHs utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica.

Figura 37: Cromatograma de esteróis utilizando apenas sílica na coluna cromatográfica.

Figura 38: Cromatograma de esteróis utilizando sílica + alumina na coluna cromatográfica

VI.1.4) Resultado da avaliação dos testes metodológicos

Através da avaliação dos testes metodológicos realizados foi possível adotar um procedimento analítico que resolvesse todos os compostos de interesse, sendo esse procedimento descrito detalhadamente abaixo.

Em frascos de 25 mL são tomados 15g de amostra seca, adicionadas de padrão interno, de forma a se obter nos extratos finais $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de n-alcenos (nC_{16} , nC_{20}), $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de PAHs (naftaleno d8, acenafteno d10, fenantreno d10, criseno d12 e perileno d12) e $5,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de padrões de esteróis (5α androstanol) e extraídas em ultra-som utilizando solventes e misturas de solventes orgânicos com diferentes polaridades: EtOH (1x15 mL), EtOH- CH_2Cl_2 50% (10 mL) e n-hexano 100% (10mL) (30 min cada). Cada fração da extração é transferida com auxílio de pipeta Pasteur para balão de fundo chato, onde é adicionado cobre metálico (cerca de 5 g). Após 1h de reação para eliminação de sulfeto, o extrato é concentrado em evaporador rotativo a vácuo até volume aproximado de 1mL. A esse concentrado adiciona-se 3mL de KOH 6% em etanol, sendo estocado por cerca de 6 horas em temperatura ambiente (hidrólise alcalina). Ao final da hidrólise são adicionados 2 mL de água e é feita a extração

com n-hexano (3x3 mL), sendo a fase orgânica transferida para outro balão e concentrada a 1 mL em evaporador rotativo a vácuo.

Ao concentrado obtido é feita uma separação utilizando coluna de vidro de 35 cm x 0,6 cm contendo 2g de sílica 5% desativada com a seguinte ordem de eluição: 12mL de DCM - n-hexano (8:2) - (HCs alifáticos, alquenonas e PAHs - F1) e 12ml de EtOH - n-hexano (8:2) - (esteróis - F2). As frações são novamente concentradas em evaporador rotativo a vácuo até volume aproximado de 0,5 mL.

F1 é transferido para um frasco âmbar graduado de 1mL. Sob fluxo de N_2 as frações são concentradas até pouco menos de 250 μ L. É adicionado então padrão interno cromatográfico, de forma a se obter nos extratos finais 5,0 ng. μ L⁻¹ de padrão de n-alcenos (nC_{14}), 0,5 ng. μ L⁻¹ de padrão de PAHs (9,10 dihidroantraceno) e o volume completado para 250 μ L com n-hexano. Essa fração é analisada em GC-FID para identificação dos hidrocarbonetos alifáticos e alquenonas, e em GC-MS para análise dos PAHs.

A F2 é levada a secar sob fluxo de $N_{2(g)}$, e adicionada de 40 μ L de BSTFA/TCMS. A reação de derivatização ocorre a 65° C em banho-maria por 1,5 horas. O reagente é então evaporado em fluxo de $N_{2(g)}$, ao sólido restante é adicionado padrão interno, de forma a se obter na solução final 5,0 ng. μ L⁻¹ de padrão de esterol (5α colestano), e a solução recuperada até o volume de 1 mL em n-hexano, e analisada em GC - MS para identificação dos esteróis (Figura 39).

Figura 39: Fluxograma da metodologia analítica proposta.

A tabela 1 mostra o resumo das metodologias empregadas e resultados obtidos na identificação e quantificação dos compostos.

Tabela 1: Resumo dos testes metodológicos para identificação e quantificação dos compostos

Solventes utilizados na extração	CH ₂ Cl ₂ (3x10mL)	CH ₂ Cl ₂ (3x10mL)	CH ₂ Cl ₂ /EtOH (2x10 mL) CH ₂ Cl ₂ (1x10mL)	CH ₂ Cl ₂ /EtOH (2x10 mL) CH ₂ Cl ₂ (1x10mL)	EtOH (1x15mL) EtOH/ CH ₂ Cl ₂ 50% (1x10mL) n-hexano (1x10ml)
Hidrólise alcalina	sim	não	sim	sim	sim
Número de frações obtidas na coluna cromatográfica	3	3	2	2	2
Solventes utilizados na coluna cromatográfica	F1: n-hexano F2: n-hexano/ CH ₂ Cl ₂ 20% F3: n-hexano/ Acet. de etila 30%	F1: n-hexano F2: n-hexano/ CH ₂ Cl ₂ 20% F3: n-hexano/ Acet. de etila 30%	F1: n-hexano/ CH ₂ Cl ₂ 80% F2: n-hexano/ EtOH 80%	F1: n-hexano/ CH ₂ Cl ₂ 80% F2: n-hexano/ EtOH 80%	F1: n-hexano/ CH ₂ Cl ₂ 80% F2: n-hexano/ EtOH 80%
Adsorvente	sílica	sílica	sílica	sílica-alumina	sílica
Compostos resolvidos	HCs alifáticos PAHs	HCs alifáticos PAHs	HCs alifáticos PAHs Alquenonas Esteróis	HCs alifáticos PAHs Alquenonas Esteróis	HCs alifáticos PAHs Alquenonas Esteróis
Compostos quantificáveis	HCs alifáticos	HCs alifáticos	HCs alifáticos Alquenonas Esteróis	HCs alifáticos PAHs Alquenonas Esteróis	HCs alifáticos PAHs Alquenonas Esteróis
Compostos não resolvidos	PAHs Alquenonas Esteróis	PAHs Alquenonas Esteróis			
Avaliação do teste	Não resolve todos os compostos de interesse	A não realização da hidrólise alcalina gera mais interferentes e não resolve todos os compostos	O aumento na polaridade dos solventes permitiu identificar todos os compostos	O uso da sílica-alumina não melhorou os cromatogramas	A mudança na polaridade dos solventes aumentou a eficiência da extração dos compostos

IV.2) Avaliação do Método

IV.2.1) Limite de detecção

O limite de detecção de um método (LD) é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 99% de confiança e que pode ser determinada em uma matriz contendo o analíto (Wade & Cantillo, 1994). Uma das formas de se calcular o limite de detecção é através do desvio padrão (DP) de, no mínimo, 5 replicatas da mesma amostra. O limite de detecção do método é dado então pela equação:

$$LD = 3 \times DP$$

Como se deseja trabalhar com amostras de sedimentos marinhos, foi tomada uma amostra de sedimento e feita a análise de cinco replicatas dessa amostra. Os analítos de interesse foram quantificados e calculado o desvio padrão e o limite de detecção para cada um dos compostos.

Alguns dos compostos que se desejava analisar não foram identificados na amostra de sedimento. Para esses compostos foi considerado o limite de detecção como sendo igual ao limite de detecção de um composto quimicamente semelhante, encontrado na amostra.

Sericano (1998) propôs que o branco deve conter no máximo dois compostos com concentração maior que três vezes o limite de detecção do método.

As tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos das extrações da amostra de sedimento marinho e o limite de detecção calculado para cada um dos analítos de interesse para metodologia aplicada.

Tabela 2: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para hidrocarbonetos alifáticos, sendo D.P. o desvio padrão, L.D. o limite de detecção do método e n.i. não identificado.

HCs Alifáticos								
Composto - (ng.g ⁻¹)	Branco	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	D.P.	L.D.
C12	12.20	135.23	135.37	116.73	117.09	125.25	9.20	27.61
C13	n.i.	3.60	5.00	4.28	4.84	3.57	0.67	2.01
C14	n.i.	12.49	8.65	8.81	8.25	11.51	1.92	5.75
C15	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	5,75
C16	3.53	12.51	9.51	10.48	8.47	7.92	1.82	5.45
C17	5.01	12.11	12.25	11.37	9.54	12.21	1.15	3.45
Pristano	n.i.	7.83	9.13	7.57	8.59	7.43	0.73	2.18
C18	4.12	17.73	17.90	17.04	13.54	15.19	1.87	5.61
Fitano	n.d.	13.06	14.23	12.72	11.11	12.24	1.14	3.42
C19	3.30	24.49	25.10	24.73	26.11	23.60	0.92	2.75
C20	3.83	27.46	24.33	20.70	27.02	25.86	2.73	8.19
C21	n.i.	23.48	24.55	21.59	22.86	21.87	1.21	3.62
C22	n.i.	20.34	19.73	18.59	16.59	18.42	1.44	4.33
C23	n.i.	13.13	14.64	15.27	12.63	11.98	1.38	4.14
C24	n.i.	8.73	9.88	8.14	8.32	8.58	0.68	2.04
C25	n.i.	11.93	11.70	11.08	11.73	10.37	0.64	1.92
C26	n.i.	9.13	10.97	11.39	10.42	7.31	1.65	4.96
C27	4.05	26.46	22.11	21.82	28.10	11.61	6.42	19.27
C28	4.74	9.44	14.70	12.54	13.76	10.09	2.28	6.85
C29	3.62	32.29	32.63	31.76	26.42	29.27	2.62	7.86
C30	3.08	10.66	14.35	14.19	14.93	14.34	1.72	5.16
C31	n.i.	31.74	35.58	35.50	35.56	36.28	1.81	5.44
C32	n.i.	7.80	13.89	12.22	18.38	13.00	3.79	11.36
C33	n.i.	24.70	27.81	27.36	26.63	29.88	1.88	5.63
C34	n.i.	12.49	13.37	7.74	15.61	23.72	5.86	17.57

Tabela 3: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para as alquenonas, sendo D.P. o desvio padrão, L.D. o limite de detecção do método e n.i. não identificado.

Alquenonas								
Composto (ng.g ⁻¹)	Branco	R1	R2	R3	R4	R5	D.P.	L.D.
Alq C37:3	n.i.	65.21	69.38	57.13	65.19	64.95	4.45	13.35
Alq C37:2	n.i.	320.58	352.79	324.73	330.42	331.74	12.43	37.29

Tabela 4: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para os PAHs, sendo D.P. o desvio padrão, L.D. o limite de detecção do método e n.i. não identificado.

PAHs								
Composto - (ng.g ⁻¹)	Branco	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	D.P.	L.D.
Naftaleno	2.17	4.17	4.17	4.17	4.17	4.16	0.00	0.01
2-Metilnaftaleno	1.17	3.83	3.83	4.17	3.83	3.67	0.15	0.45
1-Metilnaftaleno	n.i.	2.50	2.33	2.50	3.00	2.33	0.14	0.41
Bifenil	3.67	4.33	4.00	4.83	5.33	5.00	0.53	1.60
2-Etilnaftaleno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	0.65
2,6-Dimetilnaftaleno	n.i.	2.17	2.33	2.50	2.67	2.67	0.22	0.65
1,3-Dimetilnaftaleno	n.i.	2.17	2.17	2.67	2.33	2.17	0.22	0.65
1,7-Dimetilnaftaleno	n.i.	2.00	2.17	2.83	3.17	2.33	0.53	1.60
2,3-Dimetilnaftaleno	n.i.	1.00	1.00	0.83	0.83	0.83	0.09	0.27
Acenaftileno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	0.22
1,5-Dimetilnaftaleno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	0.65
Acenafteno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	0.22
1,6,7-Trimetilnaftaleno	n.i.	0.67	0.50	0.67	0.67	0.67	0.09	0.27
1,4,6-Trimetilnaftaleno	n.i.	0.83	0.83	0.83	0.83	0.82	0.00	0.01
2,3,6-Trimetilnaftaleno	n.i.	1.00	0.67	0.83	0.83	0.67	0.14	0.42
2,3,5-Trimetilnaftaleno	n.i.	n.d.	0.67	0.67	n.d.	n.d.	0.42	1.27
Fluoreno	n.i.	0.50	0.50	0.50	0.33	0.50	0.07	0.22
1,4,5-Trimetilnaftaleno	n.i.	0.50	0.00	n.i.	n.i.	0.33	0.25	0.76
1,2,3,4-Tetrametilnaftaleno	n.i.	1.83	1.67	2.00	1.83	1.83	0.12	0.35
Dibenzotiofeno	n.i.	0.83	0.83	0.50	0.83	n.d.	0.18	0.55
Fenantreno	0.67	2.83	2.33	2.33	2.33	2.33	0.22	0.67
Antraceno	1.50	2.17	2.33	2.17	2.33	2.00	0.14	0.42
1-Metildibenzotiofeno	0.17	0.67	0.67	0.50	0.67	0.67	0.07	0.22
3-Metildibenzotiofeno	n.i.	0.50	0.33	0.50	0.67	0.50	0.12	0.35
4-Metildibenzotiofeno	n.i.	0.33	0.33	0.33	0.33	0.32	0.12	0.36
9-Metilfenantreno	n.i.	1.33	1.17	1.33	1.17	1.17	0.09	0.27
2-Metilfenantreno	n.i.	1.17	1.17	1.00	1.17	1.17	0.12	0.35
1-Metilfenantreno	n.i.	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.00	0.01
Dimetildibenzotiofeno	n.i.	1.17	1.17	1.17	1.17	1.16	0.00	0.01
2,7-Dimetilfenantreno	n.i.	1.67	1.50	1.67	1.67	1.50	0.09	0.27
3,6-Dimetilfenantreno	n.i.	1.00	1.17	1.00	0.83	0.83	0.14	0.42
Fluoranteno	n.i.	1.67	1.67	1.67	1.67	1.60	0.00	0.01
Pireno	n.i.	1.50	1.50	1.33	1.33	1.33	0.09	0.27
2,3,5-Trimetilfenantreno	n.i.	0.67	1.00	0.83	1.00	0.83	0.14	0.42
Benzo[a]antraceno	n.i.	0.83	0.67	0.67	0.83	0.67	0.09	0.27
Criseno	n.i.	0.67	0.83	0.50	0.83	0.83	0.15	0.45
Benzo[b]fluoranteno	n.i.	0.83	1.50	1.17	0.50	2.00	0.33	1.00
Benzo[k]fluoranteno	n.i.	0.33	0.33	0.17	0.50	0.17	0.09	0.27
Benzo[e]pireno	n.i.	0.83	0.50	0.50	0.67	0.67	0.09	0.27
Benzo[a]pireno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	2.82
Perileno	n.i.	3.33	2.33	3.67	1.33	3.17	0.94	2.82
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	2.82
Dibenzo[a,h]antraceno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	2.82
Benzo[g,h,i]perileno	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	2.82

Tabela 5: Resultados da extração da amostra de sedimento marinho e limite de detecção para os esteróis, sendo D.P. o desvio padrão, L.D. o limite de detecção do método e n.i. não identificado.

Esteróis								
Composto - (ng.g ⁻¹)	Branco	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	D.P.	L.D.
coprostanol	n.i.	4.33	8.00	7.67	7.50	7.17	1.48	4.45
epicoprostanol	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	4.45
5b coprostanona	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	-	61.64
colesterol	153.17	574.67	624.33	588.50	604.17	577.83	20.55	61.64
colestanol	7.17	129.00	124.17	125.67	127.50	125.67	1.87	5.62
campesterol	n.d.	75.83	64.33	78.33	78.17	73.00	5.79	17.36
estigmasterol	17.83	143.17	149.00	164.00	147.00	146.00	8.19	24.58
b sitosterol	34.83	263.17	249.17	174.67	329.00	272.67	55.46	166.39

Em nenhuma das classes de marcadores foram encontrados, na quantificação dos analitos resolvidos no branco, compostos com concentração superior a três vezes o limite de detecção, satisfazendo, portanto, o critério estabelecido.

IV.2.2) Verificação da Qualidade do Método

O controle de qualidade do método foi feito através dos resultados obtidos na extração de um branco (sulfato de sódio), um branco adicionado de padrões externos (branco spike) e uma matriz adicionada de padrões externos (matriz spike).

Os critérios para o controle de qualidade de uma metodologia, segundo Sericano (1998) são:

- O branco adicionado (spike) deve conter 80% dos analitos com recuperação entre 40% e 130 %
- A matriz adicionada (spike) deve conter 80% dos analitos com recuperação entre 40 e 130%, sendo que nesse cálculo entram apenas os compostos originalmente presentes na amostra em quantidade igual ou superior à adicionada.
- Os padrões internos devem ser recuperados entre 40% e 120% em todas as amostras analisadas.

Para os hidrocarbonetos alifáticos, a recuperação individual dos compostos no branco adicionado ficou entre 43% e 102% (tabela 6). Na análise da matriz, não foram encontrados compostos originalmente presentes na amostra com concentração igual ou superior à adicionada. A recuperação dos padrões internos de todas as amostras analisadas ficou entre 62% e 81%. Dessa forma o método aplicado responde, para os hidrocarbonetos alifáticos, aos critérios acima estabelecidos.

Para os esteróis a recuperação dos compostos no branco adicionado ficou entre 69% e 146%, sendo que 86% dos compostos tiveram recuperação entre 40% e 130%. (Tabela 06). Na análise da matriz adicionada, dos compostos originalmente presentes na amostra com concentração igual ou superior à adicionada, 100% deles tiveram recuperação dentro do intervalo de 40% a 130%, sendo eles: o colesterol com recuperação de 125%, o colestanol com 66% de recuperação, o campesterol com 106%, o estigmasterol com 52% e o b-sitosterol com 100% de recuperação. Esses resultados mostram que a resolução do método para a análise dos esteróis é satisfatória de acordo com os critérios estabelecidos.

Para os hidrocarbonetos aromáticos, a recuperação individual dos compostos no branco adicionado ficou entre 45% e 180%, sendo que 61% dos compostos tiveram recuperação entre 40% e 130%. (Tabela 06). Na análise da matriz adicionada não foram encontrados compostos originalmente presentes na amostra com concentração igual ou superior à adicionada. A recuperação dos padrões internos de todas as amostras analisadas ficou entre 47% e 58%.

Uma vez que as concentrações nas quais os PAHs encontrados na amostra foram muito baixas, em média 1 ng.g^{-1} , é de se esperar que os erros na quantificação desses compostos sejam maiores do que para as demais classes de compostos.

Para as alquenonas a recuperação do padrão interno em todas as amostras analisadas ficou entre 60% e 85%. Os demais critérios estabelecidos não foram verificados em função da pouca quantidade e baixa concentração de padrões de alquenonas disponíveis, o que torna inviável a análise do branco adicionado e da matriz adicionada.

Tabela 6 – Recuperação individual dos compostos no branco adicionado.

HCs Alifáticos		HCs Aromáticos		Esteróis	
Composto	Rec no Branco %	Composto	Rec no Branco %	Composto	Rec no Branco %
n-C12	102	Naftaleno	95	coprostanol	130
n-C14	43	2-Metilnaftaleno	107	epicoprostanol	75
n-C16	72	1-Metilnaftaleno	130	colesterol	146
n-C17	83	Bifenil	127	colestanol	76
Pristano	86	2,6-Dimetilnaftaleno	175	campesterol	97
n-C18	85	Acenaftileno	140	estigmasterol	69
n-C20	83	Acenafteno	117	b sitosterol	117
n-C21	81	2,3,5-Trimetilnaftaleno	180		
n-C22	71	Fluoreno	120		
n-C23	67	Fenantreno	147		
n-C24	61	Antraceno	117		
n-C25	59	1-Metilfenantreno	142		
n-C26	57	Fluoranteno	147		
n-C28	50	Pireno	147		
n-C30	51	Benzo[a]antraceno	77		
n-C32	49	Criseno	150		
n-C34	46	Benzo[b]fluoranteno	67		
		Benzo[k]fluoranteno	75		
		Benzo[e]pireno	95		
		Perileno	175		
		Indeno[1,2,3-c,d]pireno	80		
		Dibenzo[a,h]antraceno	50		
		Benzo[g,h,i]perileno	45		

IV.2.3) Validação da Metodologia Analítica

A exatidão e precisão na quantificação de compostos orgânicos em amostras de sedimentos marinhos são aspectos importantes para a avaliação da origem dos compostos (marinha ou terrígena/ natural ou antrópica) e da poluição marinha em ambientes costeiros e oceânicos. Dessa forma torna-se necessário que a metodologia analítica empregada para a análise dessas matrizes ambientais forneçam resultados confiáveis. Uma das formas de se garantir a confiabilidade dos resultados fornecidos por determinada metodologia analítica é através da validação dessa metodologia. Sem essa validação todos os resultados obtidos podem ser questionados. A validação pode ser feita aplicando-se a metodologia a amostras certificadas, ou seja, aplicar a metodologia ao material de referência certificado de forma a assegurar a produção de resultados exatos e precisos (UNEP/IOC/IAEA/FAO, 1989).

IV.2.3.1) Validação da Metodologia para Hidrocarbonetos Alifáticos e Policíclicos Aromáticos.

Para validar a metodologia proposta para a análise dos hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi utilizado o material de referência da International Atomic Energy Agency – Marine Environment Laboratory (MEL - IAEA) N° 383, o qual teve o certificado emitido com base nos resultados analíticos fornecidos por 41 laboratórios distribuídos pelo mundo, incluindo o Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da USP.

A análise do material de referência foi feita em triplicata, de maneira idêntica à aplicada para as amostras.

Os resultados obtidos na análise do material de referência e o intervalo de confiança segundo MEL/IEAE para os hidrocarbonetos alifáticos e para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão listados nas tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7: Resultados obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos na análise do material de referência IAEA – 383 e os valores apresentados pelo MEL/IAEA.

Composto	Intervalo de Confiança 95% (IAEA –383)	Concentração Obtida				Unidades
		R 1	R 2	R 3	Média	
Total de Alifáticos	14 – 85	49	51	50	51	$\mu\text{g.g}^{-1}$
Alifáticos Resolvidos	6,7 – 24	10.8	13	12.1	12	$\mu\text{g.g}^{-1}$
Alifáticos não resolvidos	11 – 79	38	38	38	38	$\mu\text{g.g}^{-1}$
n-C ₁₇	330 – 470	436	455	443	444	ng.g^{-1}
Pristano	36 – 240	62	74	54	64	ng.g^{-1}
n-C ₁₈	42 – 230	62	56	53	57	ng.g^{-1}
Fitano	43 – 150	71	77	78	73	ng.g^{-1}
Σ n-alcanos (C ₁₄ -C ₃₄)	5,3 – 6,8	6	6.2	5.2	5.5	$\mu\text{g.g}^{-1}$

Pela análise do material de referência, 100% dos hidrocarbonetos alifáticos apresentam quantificação com nível de confiança de 95%, o que torna a metodologia válida para todos os hidrocarbonetos alifáticos.

Para os 24 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados e relacionados no relatório do material de referência, levando em consideração o critério para validação do método proposto por Wade&Cantillo (1994) que leva em consideração um intervalo de $\pm 35\%$ em torno dos limites do intervalo de confiança estabelecido no certificado de análises, temos 88% dos compostos (incluindo o total de aromáticos resolvidos) dentro do intervalo que torna a metodologia válida. Os PAHs não validados pela metodologia foram o naftaleno, 1-metilfenantreno e 2-metilfenantreno, pois ficaram fora do intervalo de confiança..

Tabela 8 – Resultados obtidos para os hidrocarbonetos aromáticos na análise do material de referência IAEA – 383 e os valores apresentados pelo MEL/IAEA.

Composto	Intervalo de Confiança (95%) ± 35% (IAEA –383)	Concentração Obtida				Unidades
		R1	R2	R3	Média	
Naftaleno	34 - 149	26	29	26	27	ng.g ⁻¹
2-Metilnaftaleno	16 – 51,3	29	29	28	29	ng.g ⁻¹
1-Metilnaftaleno	12 - 38	20	23	23	22	ng.g ⁻¹
Bifenil	12 - 41	19	21	20	20	ng.g ⁻¹
2,6-Dimetilnaftaleno	05 - 31	12	15	15	14	ng.g ⁻¹
Acenaftileno	20 - 80	64	72	61	66	ng.g ⁻¹
Acenafteno	09 - 28	15	15	17	16	ng.g ⁻¹
Fluoreno	16 - 46	18	18	18	18	ng.g ⁻¹
Fenantreno	91 - 257	147	155	161	154	ng.g ⁻¹
Antraceno	16 - 46	14	17	16	16	ng.g ⁻¹
2-Metilfenantreno	16 - 51	13	14	14	14	ng.g ⁻¹
1-Metilfenantreno	18 - 38	14	14	15	14	ng.g ⁻¹
Fluoranteno	169 - 473	219	230	228	226	ng.g ⁻¹
Pireno	137 - 473	210	211	211	211	ng.g ⁻¹
Benzo[a]antraceno	54 - 176	83	93	88	88	ng.g ⁻¹
Criseo	78 - 297	204	215	212	210	ng.g ⁻¹
Benzo[b]fluoranteno	62 - 257	156	164	164	161	ng.g ⁻¹
Benzo[k]fluoranteno	31 - 103	92	101	99	97	ng.g ⁻¹
Benzo[e]pireno	78 - 284	120	123	127	123	ng.g ⁻¹
Benzo[a]pireno	50 - 189	85	169	168	140	ng.g ⁻¹
Perileno	27 - 176	54	63	46	54	ng.g ⁻¹
Indeno[1,2,3-c-d]pireno	85 - 216	190	234	196	207	ng.g ⁻¹
Dibenzo[a,h]antraceno	12 - 55	33	37	31	34	ng.g ⁻¹
Benzo[g,h,i]perileno	45 - 310	235	289	247	257	ng.g ⁻¹
Σ de Aromáticos Resolvidos	0,4 - 6	2.2	2.5	2.3	2.3	µg.g ⁻¹

IV.2.3.2) Validação da Metodologia para Esteróis

A validação da metodologia para os esteróis não pode ser realizada em função da ausência de material de referência para tais compostos.

IV.2.3.3) Verificação da Metodologia para análise de Alquenonas

Como forma de verificação dos resultados de alquenonas fornecidos pela metodologia proposta foram utilizadas 3 amostras de um exercício de comparação entre laboratórios – amostras intituladas no exercício como: sedimento A, sedimento B e sedimento E - (Rosell-Melé et al., 2001).

As três amostras de sedimento marinho foram analisadas em triplicata. A comparação dos resultados obtidos de concentração de alquenonas para as três amostras com os resultados fornecidos pelo exercício de comparação entre laboratórios estão expressas pelo índice U_{37}^K e pelo cálculo de temperatura em graus Celsius em função desse índice (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação dos resultados fornecidos com os obtidos pela quantificação das alquenonas.

	C37:3 (ng.g ⁻¹)	C37:2 (ng.g ⁻¹)	U_{37}^K obtido	U_{37}^K citado	Δ de U_{37}^K	T (° C) obtida	T (° C) citada	Δ de temp (citada;obtida)
Sedimento A								
A1	0,03	0,07	0,725			20,475		
A2	0,03	0,07	0,681			19,165		
A3	0,03	0,07	0,682			19,168		
média	0,03	0,07	0,696	0,653	0,043	19,608	18,486	1,122
Sedimento B								
B1	2,96	7,19	0,708			19,960		
B2	2,68	6,49	0,708			19,951		
B3	2,84	6,16	0,685			19,259		
média	2,83	6,61	0,700	0,649	0,051	19,734	18,365	1,369
Sedimento E								
E1	1,75	0,75	0,299			7,678		
E2	1,20	0,51	0,297			7,629		
E3	1,60	0,68	0,298			7,642		
média	1,52	0,64	0,298	0,297	0,001	7,652	7,699	0,047

Para o “sedimento A” a diferença entre a média dos valores de U_{37}^K obtida e o valor de U_{37}^K citado no estudo de comparação é de 0,043, a diferença entre o valor de temperatura citada no estudo e o valor de temperatura obtido é de 1,122° C.

Para o “sedimento B” a diferença entre a média dos valores de U_{37}^K obtida e o valor de U_{37}^K citado no estudo de comparação é de 0,051, a diferença entre o valor de temperatura citada no estudo e o valor de temperatura obtido é de 1,369° C.

Para o “sedimento E” a diferença entre a média dos valores de U_{37}^K obtida e o valor de U_{37}^K citado no estudo de comparação é de 0,001, a diferença entre o valor de temperatura citada no estudo e o valor de temperatura obtido é de 0,047 ° C.

Segundo Rosell-Melé et al. (2001) a temperatura estimada, em função de U_{37}^K , por diferentes laboratórios (reprodutibilidade) apresenta um nível de confiança de 95% se a diferença de temperatura for igual ou inferior a 2,1° C. No caso da temperatura ser estimada duas ou mais vezes por um mesmo laboratório (repetibilidade), o nível de confiança é de 95% se o valor for igual ou inferior a 1,6° C.

Os resultados obtidos ficaram dentro do nível de confiança de 95% tanto para a reprodutibilidade quanto para a repetibilidade. Isso indica que o método responde corretamente à quantificação das alquenonas.

IV.3) Aplicação da Metodologia nas Amostras do Testemunho

Através da datação da amostras do testemunho pelo ^{14}C foi possível estimar a taxa de sedimentação na região (em média 0,03 cm/ano) e estimar, assim, a idade das diferentes frações do testemunho.

Visto que os primeiros 4 cm do testemunho equivalem aos últimos 100 anos, não é possível que se faça a análise temporal da contribuição antrópica para os biomarcadores geoquímicos orgânicos encontrados. Por outro lado as frações compreendidas entre o 4º e o 29º cm do testemunho, que equivalem ao período entre 100 e 550 anos A.P. (antes do presente, onde o presente representa o ano de 1950), podem ser consideradas isentas de influência antrópica levando em consideração a idade da industrialização no Brasil, assim todos os biomarcadores encontrados nesse período possuem fontes exclusivamente naturais. Dessa forma, com exceção das alquenonas cujas fontes são exclusivamente naturais, o testemunho será analisado de duas formas: análise do topo do testemunho, período de contribuição antrópica; e análise das demais frações do testemunho, período isento de contribuição antrópica.

IV.3.1) Alquenonas

A quantificação das alquenonas 15E, 22E heptatriaconta-dien-2-ona e da 8E, 15E, 22E heptatriaconta-trien-2-ona permitiu estimar as temperaturas da superfície oceânica, no ponto de coleta, na época em que essas alquenonas foram sintetizadas. A tabela 10 mostra os resultados obtidos com a quantificação das alquenonas, juntamente com o índice U_{37}^K e o valor de temperatura da superfície oceânica (SST) em ° C obtido a partir desse índice.

Tabela 10: Resultados das extrações das alquenonas

Prof. (cm)	0 a 2	2 a 4	4 a 6	6 a 8	8 a 10	10 a 12	12 a 14	14 a 16	16 a 18	18 a 20	20 a 22	22 a 24	24 a 26	26 a 28	28 a 29
Idade (anos)	26	80	125	153	169	180	195	220	255	297	344	393	443	492	535
Composto (ng.g-1)															
Alq C37:3	289.9	210.6	230.7	93.1	89.4	178.7	154.4	91.8	125.6	167.6	84.3	91.2	90.6	74.4	76.3
Alq C37:2	1323.9	1196.8	1202.1	572	574.6	1151.1	1149.2	521.5	778.1	1045.3	491.6	563.9	542.7	495.6	550.3
Σ alquenonas	1614	1407	1433	665	664	1330	1304	613	904	1213	576	655	633	570	627
U_{37}^K	0.820	0.850	0.839	0.860	0.865	0.866	0.882	0.850	0.861	0.862	0.854	0.861	0.857	0.869	0.878
SST (° C)	23.6	24.5	24.1	24.8	24.9	24.9	25.4	24.5	24.8	24.8	24.6	24.8	24.7	25.0	25.3

O perfil da variação desses parâmetros ao longo dos anos e da coluna sedimentar é mostrado na figura 40.

Figura 40: Variação da concentração das alquenonas e da temperatura da superfície oceânica (SST) ao longo dos últimos 550 anos.

Pela figura nota-se uma tendência de queda na temperatura da superfície oceânica SST, que varia de 25,3° C há 550 anos A.P. até cerca de 23,6° C no tempo presente, sendo que essa tendência é quebrada no período entre 200 e 170 anos A.P., onde ocorre um máximo de temperatura (25,4° C).

A somatória das alquenonas ($C_{37:2} + C_{37:3}$) apresenta fraca relação com a SST ($R^2=0,1899$). Considerando que menores valores de temperatura na superfície oceânica, na região de estudo, apontam para períodos de maior ressurgência e, portanto, de maior produtividade primária e que a correlação obtida entre a somatória das alquenonas e a SST foi fraca, a quantidade total de alquenonas não pode ser utilizada como indicador de produtividade primária, apesar desses compostos serem sintetizados por algas.

IV.3.2) N-alcanos e Alcanos Isoprenóides

As concentrações individuais de n-alcanos contendo entre 13 e 34 átomos de carbono na molécula e alcanos isoprenóides encontrados nas diferentes profundidades do testemunho obtido em Cabo Frio estão apresentadas na tabela 11. A tabela contém, além das concentrações dos hidrocarbonetos alifáticos, a idade do sedimento, a somatória dos n-alcanos e razões úteis na avaliação da origem dos hidrocarbonetos (biogênica, antropogênica, marinha, terrígena). A figura 41 mostra os perfis das razões entre os hidrocarbonetos alifáticos ao longo do testemunho.

IV.3.2.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica

Nas duas primeiras fração do testemunho encontram-se as maiores concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (1874 ng.g^{-1}), os menores valores do CPI (2,22), os valores mais altos da TAR (11,3) e o maior valor para a razão pristano/fitano (3,3).

O aumento na quantidade de hidrocarbonetos alifáticos nos últimos 100 anos condiz com o fato do aumento do uso de combustíveis fósseis, do despejo de esgotos domésticos no oceano e do processo de industrialização ocorrido nesse período, o que acabou por gerar efluentes contendo hidrocarbonetos alifáticos, sendo que o destino de parte desses efluentes é o oceano.

Os menores valores de CPI indicam a inserção de hidrocarbonetos de fontes petrogênicas no ambiente.

O aumento das contribuições terrígenas, por conterem hidrocarbonetos mais pesados, respondem pelo aumento no valor da TAR, cujos valores mais altos indicam o predomínio de fontes terrígenas sobre as fontes marinhas de hidrocarbonetos alifáticos.

Esses resultados mostram que no topo do testemunho as razões entre os hidrocarbonetos alifáticos apontam para o aumento da influência antrópica no meio.

Tabela 11: Resultados das extrações dos hidrocarbonetos alifáticos no testemunho
(n.d. = abaixo do limite de detecção).

Prof. (cm)	0 a 2	2 a 4	4 a 6	6 a 8	8 a 10	10 a 12	12 a 14	14 a 16	16 a 18	18 a 20	20 a 22	22 a 24	24 a 26	26 a 28	28 a 29
Idade (anos)	26	80	125	153	169	180	195	220	255	297	344	393	443	492	535
Composto	(ng.g ⁻¹)														
n-C13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17.2	n.d.	n.d.	n.d.
n-C14	13.1	11.7	7.1	13.7	9.5	10.5	9.4	n.d.	8.4	11.6	15.1	11.3	20.7	13.2	48.4
n-C15	30.0	17.4	10.2	17.8	13.6	19.9	17.6	13.9	11.0	12.2	14.1	14.4	18.3	13.8	17.6
n-C16	7.5	6.0	6.1	7.9	8.5	12.9	6.9	5.8	6.9	10.0	9.1	7.1	11.1	8.4	12.8
n-C17	21.4	15.7	17.9	16.6	17.3	23.2	21.7	14.2	16.9	22.6	16.8	15.2	21.9	16.9	20.9
Pristano	31.4	14.9	12.7	11.1	10.4	12.6	12.8	5.4	5.8	12.9	6.3	4.1	7.5	5.6	8.6
n-C18	7.8	6.6	7.2	6.7	n.d.	11.3	6.2	6.7	6.7	7.4	6.4	6.0	11.1	7.5	10.7
Fitano	9.5	7.3	7.1	7.3	6.2	11.1	9.8	4.8	5.5	10.6	7.7	7.8	11.2	6.6	16.7
n-C19	8.1	6.2	6.7	6.5	6.0	7.1	6.2	4.4	4.1	6.2	4.1	3.5	5.0	4.1	6.0
n-C20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
n-C21	141.7	91.5	106.6	64.3	63.7	62.2	63.5	34.0	50.7	54.6	37.8	17.5	31.2	21.9	20.3
n-C22	229.2	127.6	84.8	52.5	50.9	63.9	65.0	36.6	52.9	56.2	36.2	27.2	44.7	26.8	27.1
n-C23	20.1	13.8	18.1	14.6	15.4	16.8	17.0	13.3	14.6	13.2	16.2	16.0	41	12.7	19.9
n-C24	12.8	6.4	9.0	10.2	7.9	6.9	7.8	5.9	7.2	6.9	7.7	4.5	23.5	7.9	8.4
n-C25	49.3	33.4	37.7	39.8	41.7	29.4	6.9	35.5	31.4	37.9	38.0	35.7	38.9	34.9	38.0
n-C26	5.9	5.0	6.6	19.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23.6	n.d.	7.1	17.1	22.1	17.5
n-C27	229.6	114.8	132.7	83.2	82.7	102.1	154.7	77.2	119.8	103.4	102.4	6.4	79.7	87.3	88.8
n-C28	108.5	33.6	38.5	24.1	27.5	34.1	67.6	7.3	34.8	29.4	7.4	6.4	27.1	28.5	29.1
n-C29	322.2	85.9	210.2	101.6	105.1	173.0	153.1	10.1	195.3	168.1	16.7	14.6	133.9	85.0	72.2
n-C30	90.6	14.3	47.4	26.0	36.4	45.2	39.1	32.7	31.2	30.7	32.7	3.7	29.0	24.7	23.8
n-C31	119.1	78.6	101.9	73.6	43.3	85.5	90.9	68.7	88.0	71.9	87.3	77.0	81.0	65.7	74.6
n-C32	51.3	8.4	25.9	20.2	29.7	21.1	33.2	16.7	17.9	17.1	15.6	6.7	11.2	16.3	13.5
n-C33	91.3	59.3	50.0	67.0	65.4	68.7	81.7	68.9	92.5	62.1	89.8	71.5	79.8	70.7	82.3
n-C34	314.1	88.3	117.1	91.8	105.9	69.8	11.9	50.3	92.5	90.4	94.1	59.4	47.7	53.3	45.1
Σ n-alcenos	1873.6	824.5	1041.7	757.7	730.5	863.6	860.4	502.2	882.8	835.5	647.5	411.2	773.9	621.7	677
Prist/fit	3.31	2.04	1.79	1.52	1.68	1.14	1.31	1.13	1.05	1.22	0.82	0.53	0.67	0.85	0.51
OPI	2.22	4.00	3.22	2.83	2.43	3.41	3.16	3.15	4.25	3.22	3.60	4.83	3.48	2.91	3.31
TAR	11.3	7.1	12.8	6.3	6.26	7.19	8.77	4.80	12.62	8.37	5.90	2.96	6.52	6.84	5.30

Figura 41: Perfil das razões entre os hidrocarbonetos alifáticos ao longo dos testemunho.

IV.3.2.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta da Influência Antrópica

Pela figura 41 pode-se notar que a somatória de hidrocarbonetos alifáticos apresenta valores praticamente constantes por toda a coluna sedimentar, em torno de 700 ng.g^{-1} .

O índice TAR mostra que ocorrem variações nas quantidades de HCs alifáticos de origem terrígena inseridas no meio ao longo dos anos. Destacam-se como os períodos de maior contribuição terrígena o período em torno de 250 anos A.P., com TAR igual a 12,62, e o período em torno de 190 anos A.P., com TAR igual a 8,77. Esse segundo máximo da TAR coincide com o máximo da SST. O período de menor contribuição terrígena, ocorre em torno de 390 anos A.P. (TAR = 2,96). Observa-se um predomínio de n-alcanos com cadeias carbônicas contendo número ímpar de carbono, refletidas através do CPI, que indica, assim como o TAR, a presença predominante de n-alcanos com origem em plantas terrígenas.

Analisando-se a somatória dos n-alcanos associados às plantas superiores ($nC_{27}+nC_{29}+nC_{31}$) com a SST, observa-se uma correlação negativa (quanto maior a SST, menor a concentração dos compostos) com forte relação linear ($R^2=0,8016$) (Figura 42). Esses dados concordam com o fato de que quanto maior for a SST, menor é a intensidade da ressurgência e portanto menor a ação dos ventos na região. A menor ação dos ventos responde pela diminuição do transporte de material terrígeno para o meio marinho.

A relação pristano/fitano apresenta um aumento ao longo da coluna sedimentar. Visto que o pristano está associado a condições oxidantes do meio enquanto que o fitano está associado a condições redutoras, esse aumento na razão entre eles pode ser resultado de que, quanto mais fundo na coluna sedimentar se encontra o sedimento, menor é a troca de água que ele sofre, portanto o potencial de redução diminui do fundo para o topo da coluna sedimentar, daí o aumento na razão pristano/fitano.

Figura 42: Relação linear entre $n-C_{27} + n-C_{29} + n-C_{31}$ e a temperatura da Superfície Oceânica (SST)

IV.3.3) Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

A tabela 12 mostra as concentrações obtidas para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e relações úteis na avaliação da origem desses compostos. A figura 43 mostra o perfil da somatória dos PAHs ao longo do testemunho.

IV.5.3.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica

Da mesma forma que para os n-alcanos, no topo do testemunho são encontradas as maiores concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A concentração desses compostos salta de cerca de 180 ng.g^{-1} para cerca de 290 ng.g^{-1} nos últimos 100 anos. Uma vez que as fontes naturais de PAHs são raras, esse aumento na concentração de PAHs pode ser atribuído à ação antrópica.

Figura 43: Perfil da somatória dos PAHs ao longo do testemunho

IV.3.3.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta da Influência Antrópica

A concentração total dos PAHs ao longo do testemunho é praticamente constante e varia em torno de 180 ng.g^{-1} . Entre os PAHs encontrados ocorre predomínio de PAHs com 4 ou 5 anéis aromáticos, destacando-se com concentrações mais elevadas o indeno [1,2,3-c,d]pireno e o benzo(g,h,i)perileno. A presença dos PAHs é relacionada a processos de combustão e ou pirólise de combustíveis fósseis, sendo os dois compostos citados os PAHs pirolíticos mais abundantes. Considerando que não houve contribuição antrópica de PAHs num passado posterior a 100 anos e que fontes biológicas de PAHs são praticamente inexistentes pode-se associar as fontes desses compostos às queimadas, que ocorrem naturalmente, sendo o transporte dos compostos produzidos para o meio marinho feito via atmosfera.

Dessa forma o perfil apresentado na figura 43 para a somatória dos PAHs representa a linha de base desses compostos, ou seja, as menores concentrações de PAHs que podem ser encontradas independentemente da influência antrópica.

A análise das variações da concentração total de PAHs com as variações na SST mostram uma correlação negativa com forte relação linear ($R^2 = 0,9153$) (figura 44). Da mesma forma que para os n-alcanos de origem terrígena, a diminuição dos PAHs com o aumento da SST se deve a diminuição na ação dos ventos.

Tabela 12: Resultados das extrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no testemunho (n.d. = abaixo do limite de detecção).

Prof. (cm)	0 a 2	2 a 4	4 a 6	6 a 8	8 a 10	10 a 12	12 a 14	14 a 16	16 a 18	18 a 20	20 a 22	22 a 24	24 a 26	26 a 28	28 a 29
Idade (anos)	26	80	125	153	169	180	195	220	255	297	344	393	443	492	535
Composto (ng.g ⁻¹)															
2-metil naftaleno	0.88	0.52	n.d.	0.99	1.14	1.53	0.97	0.56	0.66	2.72	1.18	0.98	1.08	0.87	1.22
1-metil naftaleno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.49	0.59	1.03	n.d.	n.d.	1.43	0.49	n.d.	n.d.	n.d.	0.53
2,6-dimetil naftaleno	1.82	1.28	n.d.	1.44	1.67	2.11	n.d.	1.15	1.32	2.02	1.49	1.28	1.36	1.33	1.59
Acenaftileno	3.47	2.89	4.04	3.93	3.59	3.12	4.28	3.66	4.74	3.65	3.48	3.18	4.32	3.28	2.49
Acenafteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,3,5-trimetil naftaleno	0.53	0.51	n.d.	n.d.	n.d.	1.08	n.d.	0.52	n.d.	1.10	0.53	0.53	0.74	n.d.	n.d.
Fluoreno	0.54	0.30	n.d.	0.34	n.d.	0.50	n.d.	0.28	0.24	0.26	0.49	0.46	0.47	n.d.	n.d.
Fenantreno	4.91	2.41	2.50	2.85	2.30	2.71	1.88	2.28	1.91	1.83	4.80	3.52	3.31	1.96	1.77
Antraceno	2.64	2.45	2.19	2.23	2.51	2.34	2.35	2.03	2.52	2.07	2.72	2.24	2.13	1.83	1.71
Fluoranteno	12.2	6.74	5.53	8.84	5.54	6.17	6.38	6.45	4.77	7.36	14.33	8.34	11.17	7.09	4.43
Pireno	13.8	9.15	7.00	11.43	7.23	7.20	7.29	9.44	7.65	8.06	13.31	8.40	10.60	7.88	4.62
benzo(a)antraceno	14.7	8.72	7.91	11.35	7.37	6.77	7.44	10.33	8.72	11.07	13.63	8.81	12.99	9.75	5.11
Criseno	10.8	6.43	5.53	8.25	5.48	5.07	5.39	7.42	6.52	7.53	9.16	6.75	8.42	6.04	3.39
benzo(b)fluoranteno	15.5	10.18	10.32	13.08	10.21	9.64	10.11	12.61	11.49	12.42	16.07	11.30	13.85	10.59	6.29
benzo(k)fluoranteno	13.8	7.92	8.05	10.39	7.80	7.38	7.74	9.83	9.13	9.98	11.92	8.73	11.03	8.41	4.82
benzo(e)pireno	11.8	7.45	7.11	9.27	7.11	6.66	7.10	8.87	8.17	8.54	11.14	7.84	9.55	7.14	4.07
benzo(a)pireno	20.7	12.36	11.62	15.59	11.79	10.60	11.03	14.35	12.92	14.47	19.01	12.84	16.26	12.61	6.90
Perileno	21.0	10.82	11.14	13.47	10.02	10.91	10.88	11.80	11.99	10.47	13.49	11.01	11.77	9.52	7.25
indeno[1,2,3-c,d]pireno	75.8	48.12	45.54	61.16	43.63	45.73	44.37	55.82	51.12	48.15	67.75	50.46	57.45	43.66	25.37
dibenzo(a,h)antraceno	13.3	9.26	7.86	12.62	9.11	9.31	7.97	11.66	10.62	10.62	13.29	11.05	12.21	9.34	4.75
benzo(g,h,i)perileno	54.2	34.18	31.95	41.65	31.09	31.99	31.02	37.38	34.72	32.06	46.08	33.39	37.74	28.40	16.67
Total de PAHs	292	181.7	168.3	228.9	168.1	171.4	167.2	206.4	189.2	195.8	264.4	191.1	226.5	169.7	103.0
fluoranteno/pireno	0.89	0.74	0.79	0.77	0.77	0.86	0.88	0.68	0.62	0.91	1.08	0.99	1.05	0.90	0.96
benzo(a)antrac/criseno	1.36	1.36	1.43	1.38	1.34	1.34	1.38	1.39	1.34	1.47	1.49	1.31	1.54	1.61	1.51

Figura 44: Relação linear entre Σ PAHs e a temperatura da Superfície Oceânica (SST)

IV.3.4) Esteróis

A tabela 13 apresenta os resultados obtidos na análise dos esteróis e relações entre os compostos

Tabela 13: Resultados das extrações dos esteróis no testemunho (n.d. = abaixo do limite de detecção, n.c.= não calculado).

Prof. (cm)	0 a 2	2 a 4	4 a 6	6 a 8	8 a 10	10 a 12	12 a 14	14 a 16	16 a 18	18 a 20	20 a 22	22 a 24	24 a 26	26 a 28	28 a 29
Idade (anos)	26	80	125	153	169	180	195	220	255	297	344	393	443	492	535
Composto [µg.g ⁻¹]															
coprostanol	75.3	42.8	n.c.	30.3	34.2	34.0	31.8	12.9	18.4	13.1	9.5	9.6	7.9	14.9	5.3
epicoprostanol	12.9	7.4	n.c.	10.1	26.5	18.2	10.0	26.2	29.2	24.2	13.4	15.6	18.2	9.2	3.8
5b coprostanona	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5a coprostanona	13.6	12.9	n.c.	10.0	9.0	n.d.	10.9	9.5	9.5	8.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.8
colesterol	1937.9	1294.9	n.c.	797.1	753.2	781.3	1046.0	914.9	623.4	559.4	376.5	389.1	322.6	410.2	386.7
colestanol	582.6	223.5	n.c.	378.2	377.2	363.4	356.7	260.1	326.4	114.5	104.1	169.8	193.8	167.1	85.8
campesterol	175.4	156.9	n.c.	67.9	26.2	n.d.	18.2	48.7	22.9	83.7	63.5	18.5	n.d.	20.0	n.d.
estigmasterol	354.2	54.8	n.c.	141.1	66.7	61.3	110.3	108.9	115.4	129.5	35.7	55.7	72.4	26.4	n.d.
b sitosterol	n.d.	503.4	n.c.	403.4	293.0	587.5	309.8	446.8	268.2	257.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	228.8
esteróis totais	3152	2297	-	1838	1586	1846	1894	1828	1414	1190	603	658	615	648	720
colesterol/bsitost	-	2.57	-	1.98	2.57	1.33	3.38	2.05	2.32	2.18	-	-	-	-	1.69

A fração do testemunho correspondente a 4 a 6 cm de profundidade foi perdida durante o processo de derivatização dos esteróis e portanto não foram obtidas as concentrações dos esteróis nessa fração.

A figura 45 mostra o perfil da variação da somatória dos esteróis e da relação colesterol/ β -sitosterol ao longo do testemunho.

Figura 45: Perfil da variação da somatória dos esteróis e da relação colesterol/ β -sitosterol ao longo do testemunho.

IV.3.4.1) Análise do Topo do Testemunho – Influência Antrópica

Assim como para os demais marcadores geoquímicos orgânicos, as maiores concentrações de esteróis foram encontradas junto à fração superficial do sedimento.

Os esteróis possuem tanto fontes naturais como fontes antrópicas. A inserção de esteróis de origem antrópica no meio marinho se dá, principalmente, através do despejo de esgotos domésticos no mar, isso justifica o fato das maiores concentrações de esteróis serem encontradas no topo do testemunho.

IV.3.4.2) Análise do Corpo do Testemunho – Isenta da Influência Antrópica

Pela figura 45 pode-se observar que a somatória das concentrações do esteróis apresenta uma variação positiva no período compreendido entre 200 e 160 anos A.P., sendo que nessa variação há um máximo em torno de 190 anos A.P. (1894 ng.g⁻¹).

O colesterol é um esteroide de origem marinha, já o β -sitosterol está associado a plantas vasculares terrestres. A relação colesterol/ β -sitosterol mostra valores praticamente constantes ao longo da coluna sedimentar, apresentando uma anomalia no mesmo intervalo de tempo acima citado e um máximo (3,38) também em torno de 190 anos atrás.

Comparando essas duas relações com o perfil de SST, pode-se observar que esses máximos entre as relações coincidem com a máxima SST.

A análise das variações da relação colesterol/ β -sitosterol e da concentração de β -sitosterol com as variações da SST, mostraram uma correlação linear fraca, $R^2=0,0427$ e $R^2=0,2531$, respectivamente. Dessa forma as variações na temperatura na superfície oceânica, ou melhor dizendo, na intensidade da ação dos ventos não é o principal responsável pela inserção de esteróis de origem terrígena no oceano.

IV.5) Comparação dos Resultados dos Biomarcadores com a Composição do Sedimento

A análise da composição do sedimento (areia, lama e carbonato), porcentagem de C, N e razões isotópicas no mesmo testemunho mostrou que as variações desses parâmetros apresentam uma anomalia entre 200 e 170 anos A.P. (figura 46). Segundo Mahiques essa anomalia é associada a um decréscimo na intensidade da ressurgência.

O perfil da temperatura da superfície oceânica ao longo dos anos, estimada em função das alquenonas (figura 40), mostrou que nesse mesmo período ocorre também uma anomalia na SST, caracterizada por um máximo de temperatura.

Considerando que a região em estudo é influenciada pelo fenômeno na ressurgência e que esse fenômeno é responsável pelo afloramento de águas frias para a superfície oceânica, pode-se associar que períodos de maiores SST equivalem a períodos de menor intensidade na ressurgência. Dessa forma o máximo da SST no período reforça a hipótese de decréscimo na intensidade da ressurgência.

Os resultados dos biomarcadores mostraram ainda um máximo na TAR, na somatória das concentrações dos esteróis e na relação colesterol/ β -sitosterol coincidindo com o máximo na SST. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que alterações na intensidade da ressurgência refletem variações na composição e concentração dos compostos orgânicos presentes no sedimento devido ao aumento ou diminuição da produtividade local, variações da intensidade das correntes, variações no regime dos ventos, entre outros.

Segundo Mahiques, a redução na intensidade da ressurgência nesse período compreendido entre 200 e 170 anos atrás pode estar relacionada a um aumento na ação e na intensidade de ventos provenientes do Sul, fenômeno que pode estar associado ao resfriamento da região Sudeste do Brasil durante o período.

A comparação dos resultados dos marcadores geoquímicos obtidos através da metodologia otimizada com os resultados da composição do sedimento obtidos por Mahiques mostra que as variações ao longo dos anos dos diversos parâmetros analisados apontam para os mesmos fenômenos climáticos e oceanográficos. Essa concordância entre os resultados fornecidos pelos diferentes métodos empregados reforça a validade da metodologia otimizada para análise dos biomarcadores geoquímicos orgânicos.

Figura 46. Correlação dos dados obtidos por Mahiques e a da temperatura da superfície oceânica estimada através das alquenonas

V - CONCLUSÕES

- A metodologia desenvolvida possibilitou a análise dos hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróis e alquenonas em sedimentos marinhos provenientes de regiões oceânicas.
- A aplicação da metodologia otimizada em material de referência para análise de hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e em material de exercício de comparação entre laboratórios para avaliação de alquenonas forneceu resultados que validam o protocolo proposto.
- A quantificação das alquenonas permitiu estimar a temperatura da superfície oceânica na época em que essas alquenonas foram

sintetizadas, fornecendo uma importante ferramenta em estudos paleoceanográficos e paleoclimáticos.

- No testemunho analisado, as maiores concentrações de biomarcadores se encontram na fração mais superficial do sedimento, equivalente aos últimos 100 anos. Levando em consideração de que nesse período houve um aumento substancial no uso de combustíveis fósseis e no despejo de esgotos domésticos e efluentes industriais no oceano, essas concentrações elevadas de biomarcadores são resultados da influência antrópica no meio.
- As concentrações de PAHs observadas no corpo do testemunho, representam as concentrações mínimas de PAHs que podem ser encontradas naquele ponto independentemente da influência antrópica, podendo esses valores serem usados como linha de base para esses compostos.
- A análise de amostras do testemunho evidenciou as anomalias entre as relações dos biomarcadores no período entre 200 e 160 anos A.P. onde foi observado um aumento na SST, indicando uma diminuição da intensidade da ressurgência. Outros estudos com o mesmo testemunho mostraram que nesse período também foram observadas anomalias na composição do sedimento, que apontam, da mesma forma, para a diminuição da ressurgência. Esses estudos independentes apontando para as mesmas variações climáticas e oceanográficas reforçam a confiança nos resultados produzidos utilizando a metodologia otimizada.

VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos biomarcadores descritos nesse trabalho, com exceção das alquenonas, é realizada no Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da USP (Lab-QOM) já há algum tempo. A extração desses compostos é realizada via soxhlet. Nesse trabalho optou-se por realizar a extração através do ultra-som. Com essa substituição foi possível reduzir substancialmente o volume de solvente orgânico utilizado nesse processo, 80 ml em média pelo soxhlet contra 35 ml em média pelo ultra-som. Em relação ao tempo consumido na extração, o uso do ultra-som também é vantajoso, enquanto que pelo soxhlet são necessárias cerca de 8 horas para a extração, pelo ultra-som são necessárias apenas cerca de 2 horas.

A aplicação da metodologia ao testemunho permitiu verificar que o método responde de forma coerente às variações temporais dos biomarcadores. A análise de outros testemunhos obtidos na região de Cabo Frio está sendo realizada no (Lab-QOM) com o intuito de se estudar as variações espaciais e temporais dos biomarcadores e verificar como eles se relacionam com as condições climáticas e oceanográficas, dadas em função da SST.

De forma geral a metodologia permitiu a análise dos marcadores geoquímicos orgânicos e permitiu estimar a temperatura da superfície oceânica em tempos passados através das alquenonas, cumprindo os objetivos desse trabalho.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, T.F.; M.A. Artur, 1983. Stable isotopes of oxygen and carbon and their application to sedimentologic and paleoenvironmental problems. In: Artur, M.A. (Ed.) Stable isotopes in Sedimentary Geology. SEPM Short Course No. 10. Dallas, SEPM. P. 1-151.
- Andrews, J.E.; A.M. Greenaway & P.F. Dennis, 1998. Combined carbon isotope and C/N ratios as indicators of source and fate of organic matter in a poorly

- flushed, tropical estuary: Hunts Bay, Kingston Harbour, Jamaica. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 46:743-756.
- Arz, H.W.; J. Pätzold & G. Wefer, 1999. The deglacial history on the western tropical Atlantic as inferred from high resolution stable isotope records off northeastern Brazil. *Earth and Planetary Science Letters*, 167:105-117.
- Bentaleb, I.; J.O. Grimalt; F. Vidussi; J.C. Marty; V. Martin; M. Denis; C. Hatté; M. Fontugne. 1999. The C₃₇ alkenone record of seawater temperature during seasonal thermocline stratification. *Marine Chemistry*. 64:310-313.
- Benthien, A.; P.J. Müller, 1999. Anomalous low alkenone temperatures caused by lateral particle and sediment transport in Malvinas Current region, western Argentine Basin. *Deep Sea Research I*. 47: 2369-2393.
- Bicego, M.C.; R.R. Weber & R.G. Ito, 1996. Aromatic hydrocarbons on surface waters of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar. Poll. Bull.*, 32: 549-553
- Blumer, M.; R.R. Guillard & T. Chase, 1971. Hydrocarbons in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 8: 183-189.
- Boloubassi, I.; J. Rullkötter; P.A. Meyers, 1999. Origin and transformation of organic matter in Pliocene-Pleistocene Mediterranean sapropels: organic geochemical evidence reviewed. *Mar. Geol.* 153:177-197.
- Boon, J.J.; W.I.C. Rijpstra; F. Langge; J.W. DeLeeuw; M. Yoshioka; Y. Shimizu, 1979. Black Sea sterol – a molecular fossil for dinoflagellate blooms, *Nature*, 277: 125-127.
- Bouloubassi, I., 1990. Aspects de la biogéochimie des hydrocarbures non aromatiques et aromatiques dans la colonne d'eau et les sédiments du milieu côtier: cas du delta du Rhône. Thèse de doctorat, Université Paris, France 344p
- Bourbonniere, R.A.; P.A. Meyer, 1996. Sedimentary geolipid records of historical changes in the water sheds and productivities of Lakes Ontario and Erie. *Limnology and Oceanography*. 41: 352-359.
- Brassel, S.C.; G. Eglington; T.T. Malowe; C. Pflaumann; M. Sarthein, 1986. Molecular stratigraphy, a new tool for climatic assessment. *Nature* 320: 129-133.

- Chapman, M.R.; N.J. Shackleton; M. Zhao; G. Eglinton, 1996. Faunal and alkenone reconstructions of subtropical North Atlantic surface hydrography and paleotemperature over the last 28 kyr. *Paleoceanography*. 11:343-357.
- Chernova, T.G.; A.L. Paropkari; Y.I. Pikoviski; T.A. Alekseeva, 1999. Hydrocarbons in Bay of Bengal and central Indian Basin bottom sediments: indicators of geochemical process in the lithosphere. *Marine Chemistry*, 231-243.
- Cohen, A.L. ; P.D. Tyson, 1995. Sea-surface temperature-fluctuations during the Holocene off the south coast of Africa – Implications for terrestrial climate and rainfall. *Holocene*, 5:304-312.
- Conte, M.H. & G. Eglinton, 1993. Alkenone and alkenoate distribution within the euphotic zone of the eastern North Atlantic: correlation with production temperature. *Deep sea Res. I*. 40:1935-1961.
- Cripps, G.C, 1989. Problems in the identification of anthropogenic hydrocarbons against natural background levels in Antarctic. *Antarc. Sci.*, 1: 307-312
- Cripps, G.C, 1992. Natural and Anthropogenic hydrocarbons in the Antarctic marine environment. *Mar Pollut. Bull.* 25: 266-273
- De Leeun, J. E. V. D.; F. Meer; W. I. C. Rypstra; P. A. Schenk, 1980. On the occurrence and structural identification of long chain unsaturated ketones and hydrocarbons in sediments. In: *Advances in Organic Geochemistry*. 1979. Ed: A.G. Douglas & Maxwell, J.R. 211-217. Pergamon Press.
- Dooe, H.F.G; Prahli; M.W. Lyle, 1997. Biomarker temperature estimates for modern and last glacial surface waters of California Current system between 33° e 42° N. *Paleoceanography*. 12: 604-614.
- Eglinton, G. & R.J. Hamilton, 1967. Leaf Epicuticular Waxes. *Science*, 156: 1322-1334.
- Eglinton, G.; R.J. Parker; M. Zhao, 1993. Lipid biomarkers in biogeochemistry: Future roles? *Mar. Geol.* 113: 141-145.
- Fahl, K. & R. Stein, 1999. Biomarkers as organic-carbon-source and environmental indicators in the Late Quaternary Arctic Ocean: problems and perspectives. *Marine Chemistry*, 63: 293-309.

- Farkas, T. & I. Csengeri, 1976. Biosynthesis of fatty acids in the carp *Cyprinus carpio*, in relation to environmental temperatures. *Lipids* 11: 410-407.
- Gogou, A. I.; M. Apostolaki; E. G. Stephanou, 1998. Determination of organic molecular markers in marine aerosols and sediments: on step flash chromatography compounds class fractionation and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*. 799: 215-231.
- Green, G.; J.H. Skerratt, R. Leeming & P.D. Nichols. 1992. Hydrocarbon and coprostanol levels in seawater, sea-ice algae and sediments near Davis Station in Eastern Antarctica: a regional survey and preliminary results for a field fuel spill experiment. *Mar. Pollut. Bull.*, 25: 293-302
- Grimalt, J.O.; J. Albaigés, 1990. Characterization of depositional environments of Ebro Delta (Western Mediterranean) by study of sedimentary lipid biomarkers. *Mar. Geol.* 95: 207-224.
- Grimalt, J.O.; J. Olive, 1993. Source input elucidation in aquatic systems by factors and principal component analysis of molecular marker data. *Analitica Chimica Acta*. 278:159-176.
- Holmes, M.E.; P.J. Müller; R.R. Schneider; M. Segl; J. Pätzold & G. Wefer, 1996. Stable nitrogen isotopes in Angola Basin surface sediments. *Marine Geology*, 134:1-12.
- Hostettler, F.D.; W.E. Pereira; A.K. Kevenvolden; A. Geen; S.M. Luoma; C.C. Euller; R. Anima, 1999. A record of hydrocarbons input to San Francisco Bay as traced by biomarker profiles in surface sediment and sediment cores. *Marine Chemistry*, 64: 115-127.
- Huang W.Y. & W.G. Mienschein, 1979. Sterols as ecological indicators. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 43: 739-745.
- Kooke W.C.M.C.; W. Fenical; C. Djerassi, 1982 Sterol of cultured dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *Steroids*. 40: 307-318.
- Law, R.J. & J.L. Biscaya, 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Mar. Pollut. Bull.*, 29: 235-241.

- Levitus, S.; T. Boyer, 1994. World Ocean Atlas. 4: Temperatures, NOAA Atlas NESDIS 4. U.S. Government Printing Office.
- Mahiques, M.M.; Y. Mishima; M. Rodrigues, 1999. Characteristics of the sedimentary organic matter on the inner and middle continental shelf between Guanabara Bay and São Francisco do Sul, southeastern Brazilian margin. *Continental Shelf Research*, 19: 775-798.
- Marlowe I.T.; G. Brassel; G. Eglinton; J.C. Green, 1990. Long chain alkenones and alkyl alkenoates and the fossil coccolith record of marine sediments. *Chemical Geology*, 88: 340-375
- Martins, C.C. 2001. Avaliação da introdução de esteróis fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da Bahia do Almirantado, Península Antártica. Dissertação de mestrado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo. 116p.
- Medeiros, P. M. 2000. Avaliação da origem de hidrocarbonetos marinhos em Santos e São Sebastião, utilizando-se marcadores geoquímicos. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo. 121p.
- Meyers, P.A. 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology*, 144: 289-302.
- Meyers, P.A. 1997 Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry*. 27: 213-250.
- Morrison, R. & R. Boyd. 1995. Química Orgânica. Trad: de Silva, M.A. 12º ed. Fundação Calouste/Gulbenkian; Lisboa.
- Mudge, S.M, & C.E. Norris, 1997 Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. *Marine Chemistry* 57:61-84
- Mudge, S.M.; D.G. Lintern, 1999. Comparison of sterol biomarkers for sewage with other measures in Victoria Harbour, B.C. Canada *Estuar. Coast. and Shelf SCI.*, 48: 27-38
- Muller, P.J.; G. Kirst; G. Ruhland; I. von Storch; A. Rosell-Melé, 1998. Calibration of the alkenone paleotemperature index U_{37}^K based on core tops from the

- eastern South Atlantic and the global ocean (60° N – 60° S). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62 (10), 1757-1772.
- Neff, J.M. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects. London, Applied Science. 262p
- Nyberg, J.; A. Kuijpers; B.A. Malmgren; H. Kunzendorf, 2001. Late Holocene changes in precipitation and hydrography recorded in marine sediments from the Northeastern Caribbean Sea. *Quaternary Research*, 56:87-102.
- Peter, K.; J. Moldowan, 1993. Biomarker Guide. Prentice Hall Englewood Cliffs. N.J. 347 pp
- Prahl, F.G. & S.G. Wakeham, 1987. Calibration of insaturation patterns in long chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. *Nature*, 330: 367-369.
- Prahl, F.G.; L.A. Muehlhausen & D.L. Zahnle, 1988. Further evaluation of long chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 52:2303-2310.
- Prahl, F.G.; L.A. Muehlhausen; M. Lyle, 1989. An organic geochemical assessment of oceanographic conditions at MANOP site C over the past 26000 years. *Paleoceanography*. 4: 495-510.
- Prahl, F.G.; R.B. Collier; J. Dymond; M. Lyle; M.A. Sparrow, 1993. A biomarker perspective on prymnesiophyte productivity in the northeast Pacific Ocean. *Deep Sea Research I*. 40: 2061-2076.
- Prahl, F.G.; J.R. Ertel; M.A. Goni; M.A. Sparrow; B. Eversmeyer, 1994. Terrestrial organic Carbon contribution to sediments on the Washington Margin. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 58: 3035-3048.
- Prahl, F.G.; P. Nicklas; M.A. Sparrow; A. Sabin, 1995. Assessment of sea surface temperature at 42°N in the California Current over the last 30000 years. *Paleoceanography*. 10: 763-773.
- Pride, C.; R. Thinnell; D. Sigman; L. Keigwin & M. Altabet, 1999. Nitrogen isotopic variations in the Gulf of California since the last deglaciation: Response to global climate change. *Paleoceanography*, 14:397-409.
- Rossel-Mel, A.; G. Elington; U. Pflaumann; M. Sarnthein, 1995. Atlantic Core-top calibration of the Uk37 index as sea surface paleotemperature indicator. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 59: 3099-3107.

- Rossel-Melé, A.; et al., 2001. Precision of the current methods to measure the alkenone proxy U^k_{37} and the absolute alkenone abundance in sediments: Results of an interlaboratory comparison study. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, vol.2, Paper number 2000GC000141.
- Ruttenberg, K.C. & M.A. Goñi, 1997. Phosphorus distribution, C:N:P ratios, and $d^{13}C_{oc}$ in arctic, temperate, and tropical coastal sediments: tools for characterizing bulk sedimentary organic matter. *Marine Geology*, 139: 123-145.
- Salot, A., 1981. Natural hydrocarbons in seawater. In: Duursma, E.K. & Dawson, R. eds. *Marine Organic Chemistry: Evolution, composition, interaction and chemistry of organic matter in seawater*. Amsterdam, Elsevier. p. 327-374.
- Salot, A; J. Laureillard; P. Scribe; M.A. Sicre, 1991. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry*, 36:233-248.
- Sawada, K.; N. Handa; T. Nakatsuka, 1998. Production and transport of long chain alkenones and alkyl alkenoates in sea water column in the northwestern Pacific off central Japan. *Mar. Chem.* 59:219-234.
- Sericano, J.L., 1998. Quantitative determination of chlorinated hydrocarbons by gas chromatography/electron capture detection. *Geochemical and Environmental Research Group, Standard Operating Procedures (SOP-9810)*, 21p
- Simoneit, B.R.T., 1993. Hidrothermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems in organic geochemistry – Principles and applications (M.H. Engel & S.A. Macho, eds); *Topics in geobiology* 11, Plenum Press, N.Y. p. 397-418)
- Sonzogni, C.; E. Bard; F. Rostek; R. Lafont; A. Rossel-Mellé; G. Eglinton, 1997. Core-top calibration of the alkenone index vs sea surface temperature in the Indian Ocean. *Deep Sea Research II* 44:1445-1460.
- Stein, R. 1991. Accumulation Of Organic Carbon In Marine Sediments. Results From The Deep Sea Drilling Project / Ocean Drilling Program. Berlin, Springer-Verlag. 217p.

- Steinhauer, M.S. & P.S. Boehm, 1992. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of Alaska Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbons input. *Mar. Envir. Res.*, 33: 223-253.
- UNEP (United Environment Programme). 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediment, reference methods for marine pollution studies. 97p.
- UNEP/IOC/IAEA/FAO 1989. Contaminant monitoring programmes using marine organisms: Quality Assurance and Good Laboratory Practice. Reference Methods for Marine Pollution Studies N° 57, UNEP, 27p.
- Venkatesan, M.I. & I.R. Kaplan, 1987. Lipid geochemistry of Antarctic marine sediments: Banzorf Strait. *Marine Chemistry*, 21: 347-375.
- Venkatesan, M.I. & I.R. Kaplan, 1990. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, southern California. *Envir. Sci. Technol.*, 24: 208-214.
- Venkatesan, M.I. & C.A. Santiago, 1989. Sterols in oceans sediments: novel tracers to examine habits of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. *Mar. Biol.*, 102: 431-437.
- Versteegh, G.J.M.; R.R.J.W. de Leeuw; J.H.F. Jansen, 2001. $U^{K'}_{37}$ values for *Isochrysis galbana* as a function of culture temperature, light intensity and nutrient concentrations. *Organic Geochemistry*, 32: 785-794
- Villanueva, J.; J.O. Grimalt, 1999. Pitfalls in chromatographic determination of the alkenone U^k_{37} index for paleotemperature estimation. *Journal of Chromatography A*, 723 (1996): 285-291
- Villeneuve, J.P.; F. Carvalho; C. Cattini, 1998. World wide and regional intercomparison for the determination of organochlorine compounds, petroleum hydrocarbons, and sterols in the sediment sample IAEA-383, International Atomic Energy Agency Marine Environment Laboratory, B.P. N° 800, MC-98012 Monaco.
- Villeneuve, J.P.; S.J. Mora; C. Cattini; F.P. Carvalho, 1999. World wide and regional intercomparison for the determination of organochlorine compounds, petroleum hydrocarbons, and sterols in the sediment sample IAEA-408,

- International Atomic Energy Agency Marine Environment Laboratory, B.P. N° 800, MC-98012 Monaco, 1998.
- Volkman, J.K.; G. Eglington; E.D.S. Corner; J.R. Sargent, 1980. Novel unsaturated straight chain C37- C39 methyl and ethyl ketones in marine sediments and a coccolithophore *Emiliana Huxlei*. Advances in Organic Geochemistry. 1979. Ed: A.G. Douglas & Maxwell, J.R. 219-227. Pergamon Press.
- Volkman, J.K. 1986. Review of sterol markers fat marine and terrigenous matter. Organic Geochemistry. 9:83-99.
- Volkman, J.K.; G.D. Holdsworth; G.P. Neil & H.J.Jr Bavor, 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. Sci. total Environ., 112: 203-219.
- Wada, E., 1986. ^{15}N and ^{13}C abundances in marine environments with emphasis on biogeochemical structure of food web. In: Working Meeting on Isotopes in nature. Proceedings. Leipzig. p. 639-646.
- Wade, T.I.; Y.A. Cantillo, 1994. Use of standards and reference materials in the measurement of chlorinated hydrocarbons residues. Chemistry Workbook. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 77, Silver Spring, Maryland, 59p.
- Weber, R. R.; M.C. Bicego, 1987. Distribuição e origem dos hidrocarbonetos parafínicos desedimentos de superfície da costa do Estado de São Paulo entre Ubatuba e Cananéia. In: Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Síntese dos conhecimentos 1987, Cananéia. São Paulo: ACIESP, 1987. v.2. p.307-336.
- Westerhausen, L.; J. Poynter; G. Eglington; H. Erlenkeuser; M. Sarthein, 1993. Marine and terrigenous origin of organic matter in modern sediments of the equatorial East Atlantic: the $\delta^{13}\text{C}$ and molecular record. Deep Sea research I. 40: 1087-1121.
- Youngblood, W.W. & M. Blumer, 1973. Alkanes and alkenes in marine benthic algae. Mar. Biol. 21: 163-172.
- Zanardi, E.; M.C. Bicego; R.R. Weber; L.B. Miranda, 1999 Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil *Mar. Poll. Bull.* 38(4):262-268