

# CONSÓRCIO LOOP – O2 – LaGEn UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE



## Protocolo LAB N° 002 - 12 REV 02 Análise de Biomarcadores Moleculares Orgânicos

### 1. OBJETIVO

Determinar as concentrações dos biomarcadores moleculares orgânicos, das classes HC alifáticos e aromáticos, alquenonas, esteróis, n-álcoois e ácidos graxos, em sedimentos.

### 2. MATERIAIS & EQUIPAMENTOS

Materiais & Reagentes	Equipamentos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pipetas pasteurs de 150 e 230 mm</li><li>• Pissetas em teflon para solventes</li><li>• Bécheres de 5 mL</li><li>• Balões de 20 e 50 mL</li><li>• Viais de 4 e 8 mL e de 2 mL c/ inserts 300 uL</li><li>• Seringas de vidro de 1 e 5 mL;</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mufla</li><li>• Balança analítica de precisão</li><li>• Banho de ultrassom</li><li>• Centrífuga</li><li>• Roto-evaporador</li><li>• Concentrador com fluxo de N<sub>2</sub></li><li>• Agitador vortex</li><li>• Extrator soxhlet</li></ul>

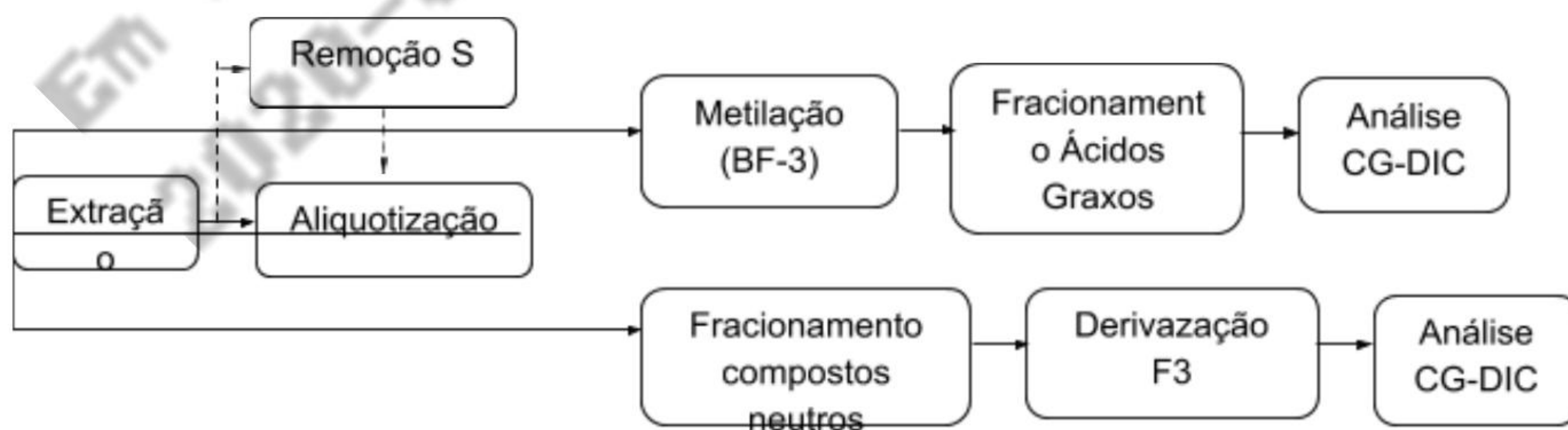
Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 1
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



- Microseringas de vidro de 10 a 500 µL
- Frasco de vidro com tampa esmerilhada 50 mL
- Tubos de ensaio / vial de 20-50 mL com tampa
- Sílica gel 60 Merck (Merck: 109385.1000)
- NaCl (Merck)
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck)
- Copper shot 0,8-2mm, 99,5% (CAS 7440-50-8)
- Ácido Clorídrico 37% fumegante (Merck)
- Água Milli-Q
- BF-3(CH<sub>3</sub>OH)
- BSTFA 1%TMS
- Algodão
- Eter grau HPLC
- Diclorometano grau HPLC
- Hexano grau HPLC
- Tolueno grau HPLC
- Acetato de etila rathburn grau HPLC
- Metanol grau HPLC
- Acetona grau HPLC
- Padrões: C<sub>24</sub>D<sub>50</sub>; Androstanol; nC<sub>36</sub>; p-terfenil-d14 e perileno-d12; C<sub>21</sub>OH; C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>

- Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrometro de massa
- Cromatógrafo em fase gasosa equipado com detector de ionização de chama
- Coluna capilar do tipo 5MS, 60m x 0,32mm x 0,25µm
- Coluna capilar do tipo 5MS, 30m x 0,32mm x 0,25µm

### 3. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 2
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



## 4. PROCEDIMENTOS

### I. Limpeza e descontaminação de materiais (Ver também Protocolo Lab. nº 01-11)

1. As vidrarias usadas devem ser lavadas em banho de Extran 5% por pelo menos 4 horas. Utilize, quando necessário, escovas de limpeza para a remoção de resíduos.
2. Rinse com água de torneira até eliminar qualquer resíduo do detergente; ou por no mínimo 5 vezes.
3. Rinse com água destilada por 3 vezes (no mínimo).
4. Seque toda a vidraria (não volumétrica) em estufa sob temperatura de 100-105 °C.
5. Colocar toda a vidraria (não volumétrica) limpa na mufla a 450 °C por 5 h.
6. A vidraria volumétrica (balões e pipetas volumétricos, provetas e seringas) deve ser limpa com solução sulfocrômica por pelo menos 24 horas e lavá-los cuidadosamente com água da torneira, água destilada por 5 vezes e água ultrapura (Milli-Q) por 3 vezes. Secar em temperatura ambiente e depois proceder à descontaminação com solventes orgânicos.
7. Os acessórios de teflon e de metais devem ser lavados e descontaminados como no item 6 mas sem a etapa da sulfocrômica.
8. As seringas devem ser somente descontaminadas com solventes: 10 vezes com diclorometano e 10 vezes ou n-hexano ou tolueno.
9. O papel alumínio que será colocado em contato com as amostras deve ser previamente muflado.

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 3
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



10. O algodão utilizado deve ser descontaminado com diclorometano por refluxo em soxhlet por 24 horas e seco em temperatura ambiente dentro da capela.

## II. Preparo da sílica

1. Colocar uma quantidade de sílica gel 60 em um cartucho de Soxhlet e fazer a lavagem da sílica com diclorometano durante 12 horas. Para uma massa de 100 g utilizar 400 mL de diclorometano.
2. Após 12 horas, retirar o cartucho contendo a sílica do Soxhlet e colocá-lo em um bécher, coberto com uma folha de alumínio limpo de modo que o solvente evapore. Manter a sílica descontaminada e seca em estufa limpa a 100-105 °C.
3. Ativar uma quantidade da sílica descontaminada em estufa ventilada a 225 °C durante 12 horas.
4. Retirar a sílica da estufa, colocá-la em dessecador, esperar esfriar e determinar a massa da sílica. Tampar o frasco bem.
5. Desativar a sílica adicionando 5% de água Milli-Q. A quantidade de água Milli-Q deve ser adicionada em pequenas quantidades (cerca de 10 gotas), distribuídos por toda a superfície da sílica. Agitar vigorosamente a sílica por cerca de 3 minutos para homogeneizar. Esta operação deve ser repetida até que a quantidade total de água seja adicionada.
6. No dia seguinte, a sílica deve ser novamente agitada de tempos em tempos, e deixada em repouso por 2 a 3 dias antes do uso.

OBS: A sílica desativada só pode ser utilizada por até uma semana. Após este período deve-se refazer o processo de ativação e desativação

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 4
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



### III. Extração

7. Pesar aproximadamente 4 g de sedimento em tubos de ensaio de 20 a 50 mL no caso da extração de sedimentos ou vials de 8 a 15 mL, ambos com tampa de boa vedação, e anotar a massa. Usar tubos que caibam na centrífuga.
8. Adicionar os padrões surrogates sobre as amostras. A massa exata de padrão adicionado deve ser decidida e anotada para cada amostra baseado na quantidade de compostos presentes, determinados em teste. Para os sedimentos de CF do PR-1 utilizou-se aproximadamente 1500 ng de  $C_{24}D_{50}$  como surrogate dos HC alifáticos e aproximadamente 2500 ng de androstanol como surrogate dos esteróis e n-álcoois.  
OBS: A 18-pentatriacontanona não se comportou como bom surrogate das alquenonas, para esta classe de compostos só adiciona o  $C_{36}$  como PI.
9. Preparar uma mistura de diclorometano ( $CH_2Cl_2$ ) e metanol ( $CH_3OH$ ) na proporção 3 ( $CH_2Cl_2$ ) :1 ( $CH_3OH$ ) em volumes suficiente para as extrações e rinsagens a serem feitas. Estocar a solução em frasco com tampa esmerilhada. Preparar a solução no mesmo dia do uso.
10. Adicionar 12 mL da solução  $CH_2Cl_2:CH_3OH$  3:1 sobre as amostras.
11. Levar os tubos ao banho de ultrassom por 15 minutos.
12. Centrifugar os tubos a 3000 rpm durante 8 minutos.
13. Transferir o solvente para um balão com uma pipeta Pasteur tomando o cuidado para não retirar sedimento no caso de sedimentos.
14. Repetir o processo da extração (passos 10 a 13) três vezes.
15. Evaporar o solvente em roto-evaporador a 35 °C no máximo, sob vácuo fraco, não deixando o extrato borbulhar, ou sob fluxo de  $N_2$  se o extrato for de filtro e estiver em vials de 8 mL.

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 5
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



16. No caso dos balões, transferir o extrato para vials de 8 mL com ajuda de pipetas de Pasteur e rinsar os balões 3 vezes com a solução  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  3:1 utilizada na extração.

IV. Remoção de Enxofre (amostras de Sedimentos ricas em S)

17. Amostras de sedimento podem conter muito enxofre e o pico desse composto pode coeluir com outros analitos na análise cromatográfica. Para a remoção do S deve adicionar ao extrato da amostra um pouco de cobre e deixar repousar sob refrigeração *overnight*.
18. Transferir o extrato sem cobre para outro vial, rinsando o cobre 3 vezes com a solução de extração ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  3:1).

*Preparação de Cu ativado:*

Deixar o Cu de molho alguns minutos em solução de HCl 0,1N, agitando-o de vez em quando. Drenar o ácido e lavar o Cu com água Milli-Q 5 vezes, acetona 3 vezes e diclorometano 3 vezes.

OBS: O Cu ativado só pode ser utilizado por até 3 dias, após isso deve-se ativá-lo novamente.

V. Aliquotização

19. Secar o extrato sob fluxo de  $\text{N}_2$  fraco.
20. Adicionar 5 mL da solução de extração ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  3:1) com seringa volumétrica.
21. Separar 1 mL com seringa volumétrica em outro vial de 8 mL, destinado à análise de ácidos graxos. Os 4 mL restante são destinados à análise dos demais compostos

VI. Metilação dos Ácidos graxos

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 6
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



22. Secar o extrato destinado aos ácidos graxos (1 mL) sob fluxo de  $N_2$  fraco.
23. Adicionar 250  $\mu$ L de hexano e 500  $\mu$ L de BF-3 e misturar em vortex.
24. Deixar 1 minuto cada amostra sob fluxo de Argônio.
25. Aquecer a 80° C por 1 hora.
26. Deixar esfriar a temperatura ambiente.
27. Adicionar 2 mL da solução hipersalina ( $NaCl$  400  $mg.L^{-1}$ ) e 2 mL da solução de éter:hexano 1:1 e misturar em vórtex
28. Aguardar alguns minutos para as fases separarem.
29. Recuperar a fase SUPERIOR, que contém os compostos orgânicos em um vial limpo de 8mL.
30. Repetir o processo de extração por 3 vezes (passos 27 a 29), mas adicionando somente a solução orgânica (éter:hexano 1:1), NÃO mais a solução hipersalina.
31. Adicionar ao extrato recuperado (orgânico) 2 mL de água Milli-Q fresca e misturar em vórtex para remoção do resíduo de sal.
32. Recuperar a fase INFERIOR (aquosa) e descartá-la.
33. Repetir este processo de remoção do sal 3 vezes (passos 31 e 32).
34. Adicionar ao extrato orgânico  $Na_2SO_4$  ou  $Mg_2SO_4$  muflado e sob temperatura ambiente para remoção do resíduo de água. Deixar repousar sob refrigeração overnight.
35. Transferir o extrato sem sulfato para outro vial limpo de 8 mL, rinsando com a solução éter:hexano 1:1.

#### VII. Metilação dos Ácidos graxos

36. Etiquetar os vials de recolhimento das frações.
37. Colocar um pedaço de algodão descontaminado em uma pipeta Pasteur muflada de forma a reter a sílica, sem arrochá-la muito na ponta.

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 7
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



38. Preencher a pipeta em um suporte com muda e posicionar o vial de recuperação das frações em baixo da pipeta.
39. Pesar uma quantidade de 420 mg de sílica desativada.
40. Suspende a sílica em hexano com a ajuda de uma pipeta Pasteur.
41. Preencher a coluna com a suspensão, dando umas batidas para que a sílica se acomode melhor na coluna. Com uma pipeta de Pasteur, lavar as paredes da coluna com hexano.

OBS: A coluna não deve secar durante o manuseio.

#### VIII. Fracionamento dos compostos neutros

42. Preparar as soluções com os solventes e eluir da seguinte forma:  
Fração 1A: 250  $\mu$ L de hexano + 250  $\mu$ L de hexano + 2 ml de hexano (eluente 1A, HC alifáticos);  
Fração 1B: 2 mL de tolueno / hexano (15:85%) (eluente 1B, HC aromáticos + alifáticos);  
Fração 2: 2 mL de acetato de etila / hexano (5:95%) (eluente 2, alquenonas);  
Fração 3: 4 mL de acetato de etila / hexano (20:80%) (eluente 3, esteróis e n-álcoois);  
Fração 4: 5 mL de diclorometano / metanol (50:50%) (eluente 4, esteróis e dioois).
43. Secar os extratos destinados às análises dos compostos neutros sob fluxo de  $N_2$  fraco. Solubilizar a amostra com 250  $\mu$ L de hexano e secar novamente o extrato.

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 8
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



44. Solubilizar a amostra seca com 250  $\mu$ L de hexano e depositá-la na coluna de sílica preparada previamente.

OBS: A amostra deve ser depositada integralmente no menor volume possível.

45. Recuperar as frações da seguinte forma:

F1A e F1B juntas no mesmo vial de 4 mL;

F2 em um vial de 4 mL;

F3 e F4 juntas no mesmo vial de 8mL.

*Cuidados gerais para manter a reprodutibilidade das separações:*

As misturas de solvente utilizadas para eluição devem ser preparadas no dia do uso e devem ser mantidas em frascos tampados.

A recuperação deve ser feita com o máximo volume possível do eluente, mas sem deixar a coluna secar.

Primeiro deve-se colocar o próximo eluente e imediatamente em seguida trocar o vial de recuperação.

#### IX. Fracionamento dos compostos ácidos

46. Preparar as soluções eluentes da mesma forma que para a coluna dos compostos neutros, mas somente até a fração 3:

47. Secar os extratos destinados às análises dos compostos neutros sob fluxo de N<sub>2</sub> fraco. Solubilizar a amostra com 250  $\mu$ L de hexano e secar novamente o extrato.

48. Solubilizar a amostra seca com 250  $\mu$ L de hexano e depositá-la na coluna de sílica preparada previamente.

OBS: A amostra deve ser depositada integralmente no menor volume possível.

49. Recuperar as frações da seguinte forma:

F1A e F1B juntas no mesmo vial de 4 mL - Guardar;

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 9
---	-----------------------	--------------------------	--	-----------



F2 e F3 juntas no mesmo vial de 8mL (ácidos graxos, esteróis, n-álcoois e dioois).

*Cuidados gerais para manter a reprodutibilidade das separações:*

As misturas de solvente utilizadas para eluição devem ser preparadas no dia do uso e devem ser mantidas em frascos tampados.

A recuperação deve ser feita com o máximo volume possível do eluente, mas sem deixar a coluna secar.

Primeiro deve-se colocar o próximo eluente e imediatamente em seguida trocar o vial de recuperação

## X. Determinação analítica

### **X.1. Hidrocarbonetos Alifáticos**

50. Antes da injeção, os extratos da fração 1 devem ser levados sob fluxo de nitrogênio até a secura e posteriormente reeluídos em 50 µL de hexano.
51. A identificação dos n-alcanos deve ser realizada por meio da injeção de padrões certificados para verificação do tempo de retenção de cada composto. Compara-se o tempo de retenção dos compostos do padrão com os picos obtidos nas amostras. Os tempos de retenção coincidentes devem ser considerados como sendo os mesmos compostos. O ideal é se injetar algumas amostras o CG-EM para a confirmação dos compostos.
52. A quantificação dos n-alcanos é baseada na resposta relativa à área do padrão C<sub>24</sub>D<sub>50</sub> (alcano tetracosano deuterado).
53. As condições cromatográficas e rampa de temperatura do forno são descritas na tabela abaixo:

<b>EQUIPAMENTO: GC HP6890 Plus (LOCEAN)</b>			
Método: DB5_HNA_CF_90.M			
<b>PARÂMETROS DO FORNO</b>			
	°C/min	°C	Manter (min)

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 10
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



Inicial		50	0
Rampa 1	30	120	0
Rampa 2	5	320	50
Pós-corrida		50	0
Tempo de corrida: 92,33 minutos			
Equilibration Time : 3 min.			
<b>PARÂMETROS DO INJETOR</b>			
Tipo : <i>ONCOLUMN</i>			
Heater: ON			
Pressão: 16.261 psi			
Mode : Track Oven			
<b>PARÂMETROS DO DETECTOR: FID</b>			
Aquecedor: 340 °C			
Fluxo H <sub>2</sub> : 35 mL/min			
Fluxo de Ar: 380 mL/min			
Fluxo de Complementação: MARCADO			
Make up Flow: 10 mL/min			
Desvio ignição: 1 pA			
<b>PARÂMETROS DA COLUNA</b>			
Descrição: DB-5MS 60m			
Diâmetro interno: 0,32 mm			
Espessura do filme: 0,25 µm			
Temp. Máxima: 325°C			

\*Gases utilizados: Hidrogênio zero como gás carreador, Hélio UP como *make up* e Ar sintético zero para queima da chama.

#### **54. Injetar 2 µL**

#### **X.2. Alquenonas**

55. Antes da injeção, os extratos da fração 2 devem ser levados sob fluxo de nitrogênio até a secura e posteriormente reeluídos com 50 µL de tolueno e 50 µL do padrão interno (PI) n-C<sub>36</sub> (alcano hexatriacontano).

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 11
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



56. A identificação das alquenonas deve ser feita injetando algumas amostras no CG-EM para a confirmação dos compostos. No CG-DIC, as alquenonas C<sub>37</sub> devem aparecer após um tempo de retenção de cerca de 60 minutos.
57. A quantificação das alquenonas é baseada na resposta relativa à área do PI nC<sub>36</sub>.
58. As condições cromatográficas e rampa de temperatura do forno são descritas na tabela abaixo:

<b>EQUIPAMENTO: GC HP6890 Plus (LOCEAN)</b>			
Método: DB5_ALKENONES_FC_150.M			
<b>PARÂMETROS DO FORNO</b>			
	°C/min	°C	Manter (min)
Inicial		50	0
Rampa 1	30	140	0
Rampa 2	20	280	0
Rampa 3	0,5	320	60
Pós-corrida		50	0
Equilibration Time : 3 min.			
Tempo de corrida: 150 minutos			
<b>PARÂMETROS DO INJETOR</b>			
Tipo : <i>ONCOLUMN</i>			
Heater: ON			
Pressão: 16.261 psi			
Mode : Track Oven			
<b>PARÂMETROS DO DETECTOR: FID</b>			
Aquecedor: 340 °C			
Fluxo H <sub>2</sub> : 35 mL/min			
Fluxo de Ar: 380 mL/min			
Fluxo de Complementação: MARCADO			
Make up Flow: 10 mL/min			
Desvio ignição: 1 pA			
<b>PARÂMETROS DA COLUNA</b>			
Descrição: DB-5MS 60m			
Diâmetro interno: 0,32 mm			
Espessura do filme: 0,25 µm			

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 12
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



Temp. Máxima: 325°C

\*Gases utilizados: Hidrogênio zero como gás carreador, Hélio UP como make up e Ar sintético zero para queima da chama.

59. Injetar 2 µL;
60. Integrar os picos de alquenonas e quantificá-los;
61. Calcular o índice UK'37 segundo Prahl & Wakeham (1987):

$$U'_{37} = \frac{[C_{37:2}]}{[C_{37:2}] + [C_{37:3}]}$$

62. Aplicar as calibrações de Prahl & Wakeham (1998):

$$UK'37 = 0,39T + 0,34$$

Ou testar outras da literatura

### X.3. Esteróis e n-Álcoois

63. Antes da injeção, os extratos da fração 3 devem ser levados sob fluxo de nitrogênio até a secura e derivatizados em 50 µL de piridina e 50 µL de BSTFA-TMCS à 80°C por 1 hora. Posteriormente, as frações devem ser secas sob fluxo de nitrogênio novamente e reeluídas em 200 µL de diclorometano.
64. A identificação dos esteróis deve ser realizada por meio da injeção de padrões certificados para verificação do tempo de retenção de cada composto. O ideal é se injetar algumas amostras o CG-EM para a confirmação dos compostos.
65. A quantificação dos esteróis é baseada na resposta relativa à área do padrão androstanol. A quantificação dos álcoois é baseada na resposta relativa à área do padrão C<sub>21</sub>OH (álcool 1-eneicosanol).

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 13
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



66. As condições cromatográficas e rampa de temperatura do forno são descritas na tabela abaixo:

<b>EQUIPAMENTO: GC HP6890N (LOCEAN)</b>			
Método: ROH_100S.M			
<b>PARÂMETROS DO FORNO</b>			
	°C/min	°C	Manter (min)
Inicial		50	1
Rampa 1	30	100	0
Rampa 2	15	150	50
Rampa 3	3	300	45
Pós-corrida		50	0
Tempo de corrida: 101 minutos			
Equilibration Time : 1 min.			
<b>PARÂMETROS DO INJETOR</b>			
Tipo : <i>ONCOLUMN</i>			
Heater: ON			
Pressão: 11.603 psi			
Mode : Track Oven			
<b>PARÂMETROS DO DETECTOR: FID</b>			
Aquecedor: 320 °C			
Fluxo H <sub>2</sub> : 35 mL/min			
Fluxo de Ar: 380 mL/min			
Fluxo de Complementação: NÃO MARCADO			
Make up Flow: 15 mL/min			
Desvio iguição: 1 pA			
<b>PARÂMETROS DA COLUNA</b>			
Descrição: HP-5MS 30m			
Diâmetro interno: 0,32 mm			
Espessura do filme: 0,25 µm			
Temp. Máxima: 325°C			

\*Gases utilizados: Hidrogênio zero como gás carreador, Hélio UP como make up e Ar sintético zero para queima da chama

**67. Injetar 2 µL.**

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 14
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



#### X.4. Ácidos graxos

68. Antes da injeção, os extratos da fração 2+3 metilada devem ser levados sob fluxo de nitrogênio até a secura e reeluídos em 50 µL de n-hexane.
69. A identificação dos ácidos graxos deve ser realizada por meio da injeção de padrões certificados (FAME 37 Mix) para verificação do tempo de retenção de cada composto. O ideal é se injetar algumas amostras o CG-EM para a confirmação dos compostos.
70. A quantificação dos ácidos graxos é baseada na resposta relativa à área do padrão C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> (ácido tricosanoico).
71. As condições cromatográficas e rampa de temperatura do forno são descritas na tabela abaixo:

<b>EQUIPAMENTO: GC HP6890N (LOCEAN)</b>			
Método: FAMELENTE.M			
<b>PARÂMETROS DO FORNO</b>			
	°C/min	°C	Manter (min)
Inicial		50	1
Rampa 1	30	100	0
Rampa 2	2	310	35
Pós-corrida		50	1
Tempo de corrida: 141 ?67 minutos			
Equilibration Time : 1 min.			
<b>PARÂMETROS DO INJETOR</b>			
Tipo : <i>ONCOLUMN</i>			
Heater: ON			
Pressão: 11.386 psi			
Mode : Track Oven			
<b>PARÂMETROS DO DETECTOR: FID</b>			
Aquecedor: 320 °C			
Fluxo H <sub>2</sub> : 35 mL/min			
Fluxo de Ar: 380 mL/min			
Fluxo de Complementação: NÃO MARCADO			
Make up Flow: 15 mL/min			

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 15
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



Desvio iguição: 1 pA
<b>PARÂMETROS DA COLUNA</b>
Descrição: HP-5MS 30m
Diâmetro interno: 0,32 mm
Espessura do filme: 0,25 µm
Temp. Máxima: 325°C

\*Gases utilizados: Hidrogênio zero como gás carreador, Hélio UP como *make up* e Ar sintético zero para queima da chama.

72. **Injetar 2 µL.**

## 5. TROUBLESHOOTING (SOLUÇÃO DE PROBLEMAS)

- Hidrocarbonetos Aromáticos:

Esta classe de compostos está contida na fração 1 da coluna. Deve ser determinada em CG-EM através de monitoramento de íons (SIM). Este método ainda deve ser testado e aprimorado.

Nas amostras de sedimento de CF do PR-1 esta classe não foi determinada. Nas amostras de armadilhas de sedimentação do PR-1 foi adicionado aproximadamente 60 ng da mistura de padrões deuterados p-terfenil-d14 e perileno-d12 como surrogate para esta classe ser ser quantificada.

- Alquenonas:

Quando a concentração das alquenonas, especialmente da C37:3 é muito baixa, com um sinal ruído menor que 20 mA, não é possível obter um valor de SST confiável (Grimalt et al, 2001). Neste caso é

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 16
---	-----------------------	--------------------------	--	------------



necessário se concentrar mais os extratos, aumentar a massa / volume de extração ou até juntar amostras.

- Ácidos graxos:

O método de análise desta classe de compostos ainda está sendo aprimorado.

- Nas amostras de sedimento de CF do PR-1 esta classe não foi determinada. Nas amostras de armadilhas de sedimentação do PR-1 foi adicionado entre 2500 e 5000 ng do padrão C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> como surrogate para esta classe ser quantificada.

## 6. REFERÊNCIAS

Boulobassi, I.; Guehenneux, G.; Rullkötter, J. (1998). Biological Marker significance of Organic Matter Origin in Sapropels from the Mediterranean Ridge, Site 969. Proceedings of the Ocean Drilling Program. Scientific Results, vol. 160.

Grimalt, J.O.; Calvo, E.; Pelejero, C. (2001). Sea surface paleotemperature errors in UK'37 estimation due to alkenone measurements near the limit of detection. Paleoceanography, v.16, n.2, pp.226-232.

Prahl, F.G. & S.G. Wakeham (1987) Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for paleotemperature assessment. Nature, 330: 367-369.

Prahl, F.G., L.A. Muehlhausen, et al. (1988) Further evaluation of long-chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. Geochimica et Cosmochimica Acta, 52: 2303-2310.

Elaborado por: Regina Carvalho / Lívia Gebara	e-mail do elaborador:	Revisor: Lívia Gebara	Última Revisão: 13/03/2013 n° da REV 02	Página: 17
---	-----------------------	--------------------------	--	------------