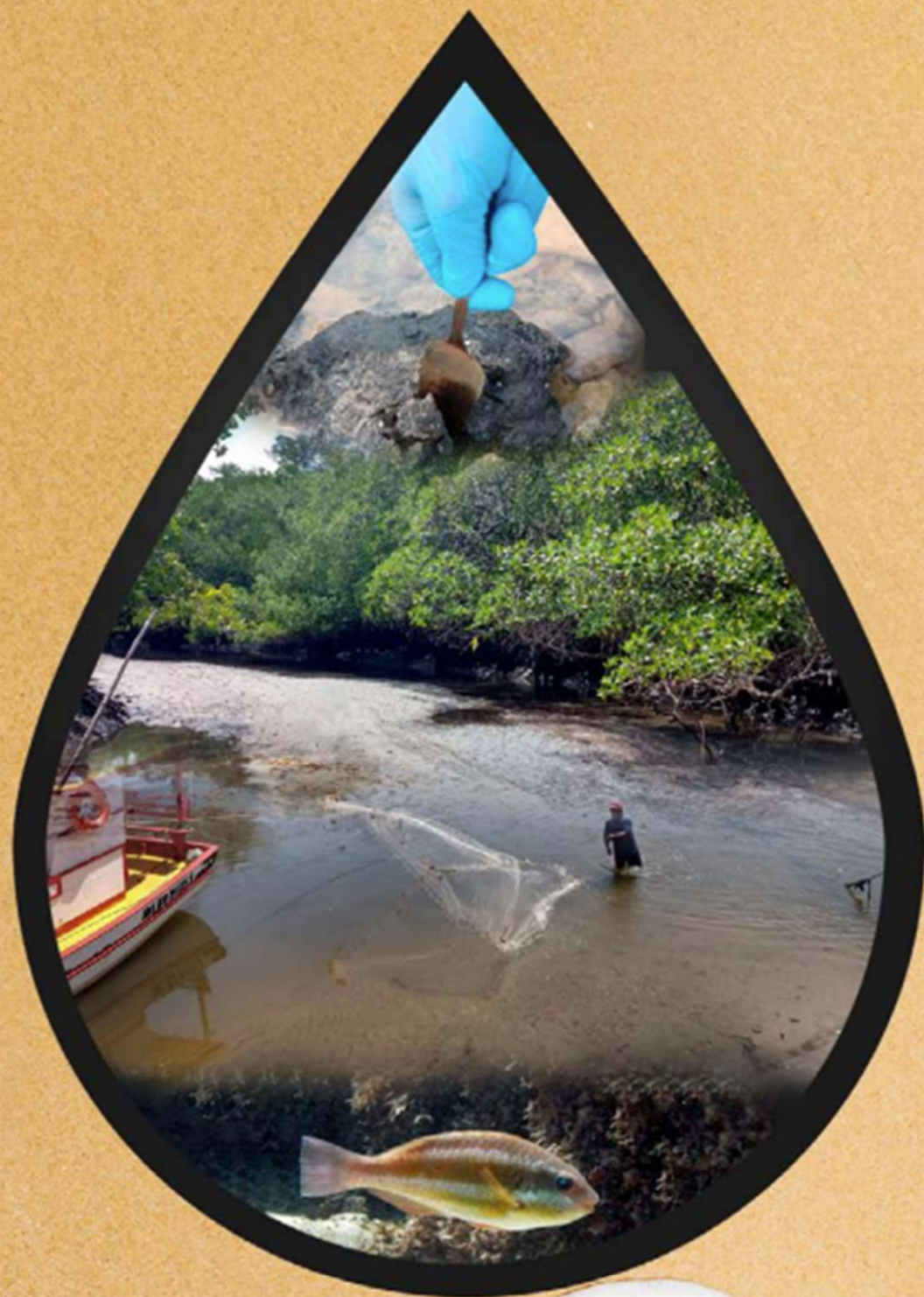


GUIA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO NA BIOTA MARINHA E SEDIMENTOS



Autores: Liana de Figueiredo Mendes¹, Marina Gomes Viana¹, Mauro Sergio Pinheiro Lima¹, Simone Almeida Gavilan², Fúlvio Aurélio de Moraes Freire³, Sergio Maia Queiroz Lima⁴, Carlos Eduardo Rocha Duarte Alencar³, Helenice Vital⁵, Patrícia Pinheiro Beck Eichler⁵, Renato da Silva Carreira⁶, Rivelino Martins Cavalcante⁷, Adrian Pereira da Silva⁸, Clara de Souza Melo⁸, Gabriel Dutra Teixeira⁸, Luanna Tereza Barbosa Andrade⁸, Lucas Paiva⁸, Luís Phelipe Rodrigues da Fonseca Campos e Silva Filho⁸, Salu Coelho⁸, Lígia Moreira da Rocha¹.

1 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Depto. Ecologia, Laboratório do Oceano - LOC.

2 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Depto. de Morfologia, Laboratório de Morfofisiologia de Vertebrados - LABMORVE

3 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN - Laboratório de Biologia, Ecologia e Evolução de Crustáceos - LABEEC

4 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Depto. de Zoologia e Evolução, Laboratório de Sistemática e Evolução - LISE

5 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Depto. de Geologia, Laboratório de Geologia e Geofísica Marinha e Monitoramento Ambiental - GGEMMA.

6 Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Depto. de Química, Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais - LabMAM

7 Universidade Federal do Ceará/UFC - Instituto de Ciências do Mar/LABOMAR, Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos - LACOR

8 Bolsista na Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN.

GUIA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO NA BIOTA MARINHA E SEDIMENTOS



1ª edição

RN Editora

NATAL/RN
2022

ISBN: 978-65-996489-6-0

CAPÍTULO IV

ANÁLISE DE SEDIMENTOS



Análise química de sedimentos

Os sedimentos deverão ser submetidos a procedimento de extração e quantificação baseados nos métodos da USEPA⁶ SW-846

6 <http://www.epa.gov> - SW846 on-line, method 8100 polynuclear aromatic hydrocarbons
<http://www.epa.gov> - SW846 on-line, method 3550C ultrasonic extraction
<http://www.epa.gov> - SW846 on-line, method 3610B alumina cleanup
<http://www.epa.gov> - SW846 on-line, method 3630C silica gel cleanup
<http://www.epa.gov> - SW846 on-line, method 8015D nonhalogenated organics using GC/FID

(<http://www.epa.gov/sw846> on-line): EPA-3540C (extrator *Soxhlet*) EPA-3550C (extração por ultrassom), *clean-up* por sílica gel/alumina (EPA-3630C e EPA-3610B) e quantificação por cromatografia usando CG-EM para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (EPA-8100) e CG-DIC para hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e mistura complexa não resolvida (MCNR) (EPA-8015D). Entretanto, uma otimização do processo foi realizada e adicionado um rígido controle de qualidade analítico para avaliar a eficiência de extração dos analitos investigados por meio de ensaios de recuperação usando adição de padrões *surrogates* (Cavalcante *et al.*, 2008).

Quanto aos reagentes que devem ser utilizados, os solventes hexano e diclorometano (DCM) devem ser de alta pureza para cromatografia. Os padrões utilizados para a construção da curva de calibração serão a partir de uma solução de *n*-alcanos (série homóloga *n*-C₁₀ a *n*-C₃₈, incluindo os alcanos isoprenóides: pristano e fitano) e dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) prioritários da USEPA acrescentado de outros (Tabela 5.2).

Os padrões internos (PI) e *surrogates* (PS) dos HAs (*n*-C₁₆-d₃₄, *n*-C₃₀-d₆₂, *n*-C₂₀-d₄₂) e dos HPAs (p-Terphenyl-d₁₄, 1,4-dichlorobenzene-d₄, naftaleno-d₈, acenafteno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, perileno-d₁₂ e criseno-d₁₂) devem possuir pureza acima de 98 %. A sílica (70-230 mesh) e alumina utilizados devem apresentar alta pureza. Tanto os adsorventes (sílica e alumina) quanto o Na₂SO₄ serão ativados em estufa por 24 h, a 250 °C.

Tabela 5.2. Hidrocarbonetos de petróleo analisados em sedimentos

| HPAs | HAs |
|-------------------------------|---------------------------|
| 1,4-Dichlorobenzene-d4 (PS) | <i>n</i> -C ₁₀ |
| Naphthalene-d8 (PS) | <i>n</i> -C ₁₁ |
| Naphthalene | <i>n</i> -C ₁₂ |
| C1-Methyl Naphthalene | <i>n</i> -C ₁₃ |
| C2-Dimethyl Naphthalene | <i>n</i> -C ₁₄ |
| C3-Trimethyl Naphthalene | <i>n</i> -C ₁₅ |
| C4-Tetramethyl Naphthalene | <i>n</i> -C ₁₆ |
| 2-Methylnaphthalene | <i>n</i> -C ₁₇ |
| 1-Methylnaphthalene | pristane |
| Acenaphthylene | <i>n</i> -C ₁₈ |
| Acenaphthalene-d10 (PS) | phytane |
| Acenaphthene | <i>n</i> -C ₁₈ |
| Fluorene | <i>n</i> -C ₂₀ |
| C1-Methyl Fluorene | <i>n</i> -C ₂₁ |
| C2-Dimethyl Fluorene | <i>n</i> -C ₂₂ |
| C3-Trimethyl Fluorene | <i>n</i> -C ₂₃ |
| Dibenzothiophene | <i>n</i> -C ₂₄ |
| C1-Methyl Dibenzothiophene | <i>n</i> -C ₂₅ |
| C2-Dimethyl Dibenzothiophene | <i>n</i> -C ₂₆ |
| C3-Trimethyl Dibenzothiophene | <i>n</i> -C ₂₇ |
| Phenanthrene-d10 (PS) | <i>n</i> -C ₂₈ |
| Phenanthrene | <i>n</i> -C ₂₈ |
| C1-Methyl Phenanthrene | <i>n</i> -C ₂₉ |
| C2-Dimethyl Phenanthrene | <i>n</i> -C ₃₀ |
| C3-Trimethyl Phenanthrene | <i>n</i> -C ₃₁ |
| C4-Tetramethyl Phenanthrene | <i>n</i> -C ₃₂ |
| Anthracene | <i>n</i> -C ₃₄ |
| C1-Phenanthrene-anthracene | <i>n</i> -C ₃₅ |
| C2-Phenanthrene-anthracene | <i>n</i> -C ₃₆ |
| Fluoranthene | <i>n</i> -C ₃₇ |
| Pyrene | <i>n</i> -C ₃₈ |
| C1-Fluoranthene-pyrene | |
| C2-Fluoranthene-pyrene | |
| p-Terphenyl-d14 (PI) | |
| Benz[a]anthracene | |
| Chrysene-d12 (PS) | |
| Chrysene | |
| C1-Methyl Chrysene | |
| C2-Dimethyl Chrysene | |
| C3-Trimethyl Chrysene | |
| Benzo[k]fluoranthene | |
| Benzo[b]fluoranthene | |
| Benzo[e]pyrene (BeP) | |
| Benzo[a]pyrene | |
| Perylene-d12 (PS) | |
| Perylene (PER) | |
| Indeno[1,2,3-c,d]pyrene | |
| Dibenz[a,h]anthracene | |
| Benzo[g,h,i]perylene | |

Série homóloga dos alcanos:
n-C₁₀ a *n*-C₃₈

• PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Devido à complexidade da matriz ambiental e diferença das propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos de petróleo, a escolha da fase extratora e do sistema de purificação será baseada na constante eluotrópica (ϵ°), índice de polaridade (P°) e propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos estudados.

A partir de 15 g de areia/sedimento (liofilizado e passados em peneiras com abertura de 2 mm, para a retirada do material grosseiro), serão adicionados 50 μ L da mistura de padrão *surrogate* e a extração ocorrerá com auxílio de sonicação ou extrator Soxhlet, conforme métodos da EPA-3540C ou EPA-3550C⁷.

A mistura extratora será selecionada por faixa decrescente de P° , primeiramente 25 mL de DCM, 25 mL de hexano e por fim 25 mL de uma mistura DCM e hexano (1:1 v/v). Os extratos serão recolhidos em tubos de Falcon (vidro) e centrifugados a 2000 rpm por 20 min. O sobrenadante será recolhido em balão de fundo redondo de 150 mL e rotaevaporado até aproximadamente 1 mL, para a etapa de *clean-up*.

• ETAPA DE CLEAN UP

Antes da construção da coluna de *clean-up* (purificação), a sílica gel e a alumina serão ativadas em estufa a 200 °C por 12 h. A coluna de *clean-up* será preparada a partir da solução de 8g de sílica gel, seguida de 2 g de alumina em hexano. Em seguida será colocado 1 cm de Na_2SO_4 , conforme método USEPA (EPA-3630C e EPA-3610B). Lavar a coluna de *clean-up* preparada com 10 mL de hexano, sem deixar que a mesma se esvazie, para evitar caminhos preferenciais.

7 <http://www.epa.gov> - SW846 on-line. method 3550C ultrasonic extraction

Após a adição dos extratos, oriundos da etapa de extração na coluna de *clean-up*, deverá ocorrer a eluição dos hidrocarbonetos. As misturas eluentes serão: 20 mL de hexano para a fração dos HAs, denominado de Fração 1 (F1), e em seguida 30 mL de hexano e DCM (3:2 v/v) para a fração dos HPAs (F2). Os extratos F1 e F2 serão pré-concentrados para 1mL usando fluxo de N₂ e em seguida adicionado 10 µL dos padrões internos respectivos a cada fração, e finalmente estando prontos para serem quantificados por cromatografia gasosa.

• DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para a etapa de determinação: a fração F1, contendo os HAs e MCNR, será usada CG-DIC e a F2, contendo os HPAs, será por meio de CG-EM, conforme condições similares às da Tabela 5.3. Todos os analitos de interesse, bem como seus respectivos PS e PI serão determinados pelo tempo de eluição pré-estabelecido de cada um deles. Em adição a determinação de HPAs, a identidades dos compostos serão confirmadas pelo uso da biblioteca *National Institute of Standards and Technology* ou similares.

Tabela 5.3 - Condições de operação do CG-DIC e CG-EM.

| | CG-DIC | CG-EM |
|-----------------------------|---|------------------|
| Coluna | Fase tipo DB-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) | |
| Fase Móvel (Gás de arraste) | Nitrogênio | Hélio |
| Vazão na coluna | 1,3 mL/min | 1,3 mL/min |
| Temperatura do injetor | 280 °C | 300 °C |
| Detector | DIC | EM |
| Temperatura do detector | 300 °C | 300 °C |
| Temperatura da interface | - | 300 °C |
| Temperatura inicial | 50 °C | 50 °C |
| Volume de injeção | 1 µL | 1 µL |
| Modo de injeção | <i>Splitless</i> | <i>Splitless</i> |
| Modo de detecção (EM) | - | SIM |

Para a etapa de quantificação serão calculados os fatores de resposta relativos (FRR), conforme equação abaixo.

$$\text{FRR} = A_c / A_{pi} \times C_{pi} / C_c$$

Onde:

A_c (área) e C_c (concentração) = do analito de interesse

A_{pi} (área) e C_{pi} (concentração) = do padrão interno usado

• CONTROLE DE QUALIDADE

Todas as etapas realizadas em laboratório serão acompanhadas por procedimentos criteriosos de controle de qualidade. Ensaios de recuperação usando adição de padrões *surrogates*, serão realizados para avaliar a eficiência de extração dos analitos de investigados. A fim de eliminar problemas de contaminação, serão analisados brancos (Br) da etapa de extração (1Br/7 amostras) e também da coluna cromatográfica (1Br/15 injeções).

A limpeza de vidrarias deve ser um dos focos na preparação do material usado em todas as etapas de determinação dos hidrocarbonetos de interesse. Primeiramente, as vidrarias serão deixadas em banho de detergente (*extran* a 20 %v/v) por pelo menos 4 horas, sendo em seguida abundantemente enxaguada em água corrente, água de alta pureza, e então colocada em banho de ácido nítrico (HNO_3 a 5 %v/v) por 4 horas. Em seguida, as vidrarias serão novamente enxaguadas em água corrente, água de alta pureza e deverão ser mantidas em estufa a 450 °C por um período de no mínimo 4 horas.

A quantificação dos hidrocarbonetos será realizada usando uma curva de calibração de 7 pontos pelo método do padrão interno. Baseado na curva de calibração será verificado as principais figuras de mérito analíticas como: linearidade, precisão, limite de detecção e quantificação. A eficiência do método de extração dos

compostos do sedimento será avaliada através do estudo de recuperação de padrões *surrogates*, relacionando-se a quantidade de padrão adicionado no início do procedimento com a quantidade extraída e quantificada ao término do processo (IUPAC, 2002).

- **AVALIAÇÃO AMBIENTAL**

Para fortalecer as evidências de impactos nas áreas avaliadas, serão confirmados se os níveis de HPAs presentes são oriundos de atividades petrogênicas, através do uso de razões de diagnóstico (Tabela 5. 4) (STogiannidis e Laane, 2015; Wang et al., 1999).

A MCNR, a qual é extraída com os HAs, é certamente uma das principais evidências geoquímicas da contaminação por petróleo (Reddy *et al.*, 2000). Nesse sentido, serão usados os níveis da MCNR ($>10 \mu\text{g/g}$), bem como o índice preferencial de carbono (IPC) e índices relativos entre carbonos ímpares e pares para confirmar a contaminação por petróleo, aumentando assim as evidências (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Razões e índices de diagnósticos

| | Razões de diagnósticos | Limites | Indicador |
|-------------|---|----------------------------------|--|
| HAs | Pri /Phy | ≈ 1 | Contaminação por óleo |
| | Pri/n-C ₁₇ | >1 | Óleo cru recente |
| | Phy/n-C ₁₈ | >1 | Óleo cru recente |
| | CPI | >1 <1 | Naturais Contaminação petróleo |
| | MCNR | > 10 µg/g | Contaminação petróleo |
| | HRP (Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo) | | |
| | TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) | | |
| HPAs | LMW/HMW | < 1 > 1 | Pirogênico Petrogênico |
| | Fl/Py | > 1 < 1 | Pirogênico Petrogênico |
| | Phe/Ant | < 10 > 15 | Pirogênico Petrogênico |
| | BaA/Cry | > 0.5 < 0.25 | Combustão Contaminação por petróleo |
| | Índice pirogênico ($\sum_{\text{HPAs 3-6 anéis}} / \sum_{\text{HPAs alquilados}}$) | <0.01 <0.03 <0.05 >0.05 | Produtos refinados leves Produtos refinados pesados Óleos / cru pesados Materiais pirogênicos |

Fonte: Reddy et al. (2000); Stogiannidis; Laane (2015); Wang et al. (1999).