

Comparação entre as extrações ultra-som e Soxhlet para determinação de alcanos em sedimentos ambientais

E. S. Emídio & H. S. Dórea

Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão- SE, Brasil

hdorea@ufs.br

(recebido em 6 de junho de 2010; aceito em 28 de setembro de 2010)

Este trabalho tem como objetivo avaliar um procedimento para a extração de 35 compostos da série dos n-alcanos (C₈-C₄₀ e os isoprenóides pristano e fitano) em amostras de sedimento ambiental, comparando a extração por ultra-som com a extração Soxhlet. A linearidade foi de 0,2-50 mg.L⁻¹ e os coeficientes de correlação ficaram acima de 0,993 para todos os compostos com limites de detecção e quantificação de 0,1 a 0,4 mg.L⁻¹ e 0,4 a 1,3 mg.L⁻¹, respectivamente. As médias das recuperações foram de 58,6 % para o ultra-som e 89,3 % para Soxhlet e coeficientes de variação (C.V) de 24,7 % e 39,9 % para ultra-som e Soxhlet, respectivamente. A comparação dos dois métodos de extração foi realizada através do teste F. O valor de F calculado para recuperação foi 2,84 e para C.V foi 2,38 sendo menor que o tabelado (9,28) para 95 % de confiança. As análises das amostras do rio Japarutuba-SE apresentaram valores para o método ultra-som de 0,41 (C₈) a 1,88 mg.kg⁻¹ (C₂₇) e para o método Soxhlet de 0,29 (C₁₁) a 3,64 mg.kg⁻¹ (C₂₉).

Palavras-chave: sedimento, alcanos, Soxhlet, ultra-som.

This study aims to evaluate a procedure for the extraction of 35 compounds in the series of n-alkanes (C₈-C₄₀ and the isoprenoids pristane and phytane) in environmental sediment samples by comparison ultrasound extraction with Soxhlet extraction. The linear range was from 0.2-50 mg.L⁻¹ and the correlation coefficients were above 0.993 for all the compounds with limits of detection and quantification from 0.1 at 0.4 mg L⁻¹ and 0.4 to 1.3 mg.L⁻¹, respectively. The mean recoveries were 58.6 % for ultrasound and 89.3 % for Soxhlet and coefficients of variation (C.V) of 24.7 % and 39.9 % for ultrasound and Soxhlet, respectively. Comparison of two extraction methods was performed using F-test. The calculated F-value for recovery was 2.84 and C.V was 2.38 being less than tabuled F-value (9.28) to 95 % confidence. Analysis of samples of the river Japarutuba-SE from Brazil showed values for the ultrasound method was 0.41 (C₈) to 1.88 mg.kg⁻¹ (C₂₇) and the method of Soxhlet 0.29 (C₁₁) to 3.64 mg. kg⁻¹ (C₂₉).

Keywords: sediment, alkanes, Soxhlet, ultrasound.

1. INTRODUÇÃO

Os sedimentos representam uma parte integrante e essencial dos ecossistemas aquáticos e são derivados do intemperismo e da erosão de rochas, solos e barrancos de rios, sendo susceptíveis ao transporte pelas águas superficiais, não ficando restrito a uma área particular de uma bacia hidrográfica. São considerados como um dos principais componentes de um ambiente aquático, formando uma variedade de habitats. Além disso, os sedimentos possuem grande importância no estudo da contaminação ambiental por serem reconhecidos como reservatórios, transportadores e fontes de contaminantes e nutrientes [1].

Os estudos de hidrocarbonetos em sedimentos têm recebido uma atenção especial, pois esses compostos, devido a sua baixa solubilidade em água, são adsorvidos ao material particulado e posteriormente depositados nos sedimentos [2].

Alguns parâmetros são utilizados na avaliação de fontes de hidrocarbonetos em sedimentos como a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) [3] e de hidrocarbonetos alifáticos, esta pode ser usada na caracterização de derramamentos de petróleo, além de prover informações adicionais sobre fontes de contaminação e do estágio da degradação do petróleo. Os n-alcanos, uma classe de hidrocarbonetos alifáticos saturados de cadeia aberta não ramificada são utilizados para diferenciar fontes biogênicas e petrogênicas [4].

Os métodos baseados na extração por Soxhlet são utilizados como referência quando métodos alternativos têm que ser avaliados. A extração com Soxhlet extrai compostos orgânicos semi-voláteis e não-voláteis de matrizes sólidas e se caracteriza por ser um processo lento, que requer grandes quantidades de solventes e pode degradar termicamente os compostos mais lábeis [5].

O objetivo deste trabalho é estabelecer a determinação de 35 compostos da série dos n-alcanos (C₈-C₄₀ e os isoprenóides pristano e fitano) em sedimento pela comparação das técnicas de extração ultra-som e

Soxhlet, sendo analisados quantitativamente os compostos utilizando a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG com DIC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Acetona (Merck, Darmstadt, Germany), n-hexano (Merck, Darmstadt, Germany), diclorometano (Tedia, USA), sílica gel 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Germany), sulfato de sódio anidro (Mallinckrodt, Baker), lavadora ultra-sônica modelo Unique 1400, evaporador rotativo (Fisatom 802D) e balança analítica (Sartorius BL 2105). Padrão de alta pureza (> 99 %) dos alcanos (C₈-C₄₀, pristano, fitano) adquirido da AccuStandard (New Haven, USA) na concentração de 500 µg.mL⁻¹. Utilizou-se uma solução de 50 µg.mL⁻¹ dos alcanos para a preparação da curva de calibração assim como para a fortificação do sedimento nos testes de validação analítica.

As amostras de sedimento, provenientes do rio Japarutuba situado no estado de Sergipe, foram coletadas em triplicata com Van Veen de aço inox. De cada amostra, 5 cm do topo do sedimento foram removidos e transferidos para um recipiente adequado. Até chegar ao laboratório as amostras foram colocadas em gelo e depois estocadas a 4 °C até serem processadas, a fim de reduzir os efeitos da atividade biológica. As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 60 °C por um período de 24 horas. Após secagem as mesmas foram homogeneizadas utilizando almofariz de porcelana.

A extração por ultra-som dos alcanos foi baseada no método 3550B-USEPA [5] e no artigo de Banjoo e Nelson [6]. Cerca de 10 g do sedimento seco foi pesado e extraído com 50 mL de hexano-acetona (1:1) em banho de ultra-som por 15 minutos e em seguida foi filtrado em funil de Büchner. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Aos extratos combinados foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminar traços de umidade, seguido de nova filtragem. Finalmente, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até um volume aproximado de 2 mL, aferidos ao volume de 1 mL em fluxo de nitrogênio e analisados no cromatógrafo em fase gasosa com detector de ionização de chama.

A extração Soxhlet baseada no método 3540C-USEPA [7], uma sub-amostra de cerca 10 g de sedimento seco foi adicionada no extrator e 100 mL de hexano-acetona (1:1) foi mantido sob refluxo por 4 horas. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até um volume aproximado de 2 mL, aferidos ao volume de 1 mL em fluxo de nitrogênio e analisados no cromatógrafo em fase gasosa com detector de ionização de chama. O *clean-up* baseou-se no método 3630C-USEPA [8] com 2 g de sulfato de sódio anidro, 3,2 g de sílica gel e acima desta, 1 g de sulfato de sódio para preservar a integridade da superfície da sílica. Os extratos (volume de 2 mL) foram aplicados na coluna e eluídos com 50 mL de n-hexano. Após concentração a 2 mL em evaporador rotativo, o volume final foi reduzido a nitrogênio.

As análises foram efetuadas usando um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo 17A (Kioto, Japão), equipado com um injetor com e sem divisão de fluxo (*split/splitless*) e um detector de ionização por chama. O injetor foi mantido a 250 °C com um tempo de *splitless* de 2 minutos. Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna capilar HP-5 (Hewlett Packard, USA) de 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura do filme. A programação de temperatura no forno foi iniciada em 40 °C por 3 min, 10 °C.min⁻¹ até 310 °C por 19 minutos. Os gases de arraste e auxiliar, respectivamente, foram hélio (1,2 mL.min⁻¹) e nitrogênio (33 mL.min⁻¹). Hidrogênio foi utilizado como combustível da chama do detector (40 mL.min⁻¹) e ar sintético como agente oxidante (400 mL.min⁻¹). O volume de injeção foi de 1 µL para solução padrão ou extrato da amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos iniciais deste estudo foram conduzidos no estabelecimento das condições cromatográficas (CG-DIC), através da injeção da solução padrão dos alcanos 25 mg.L⁻¹ em uma programação de temperatura satisfatória para uma adequada resolução dos 35 compostos em um tempo de análise otimizado (figura 1).

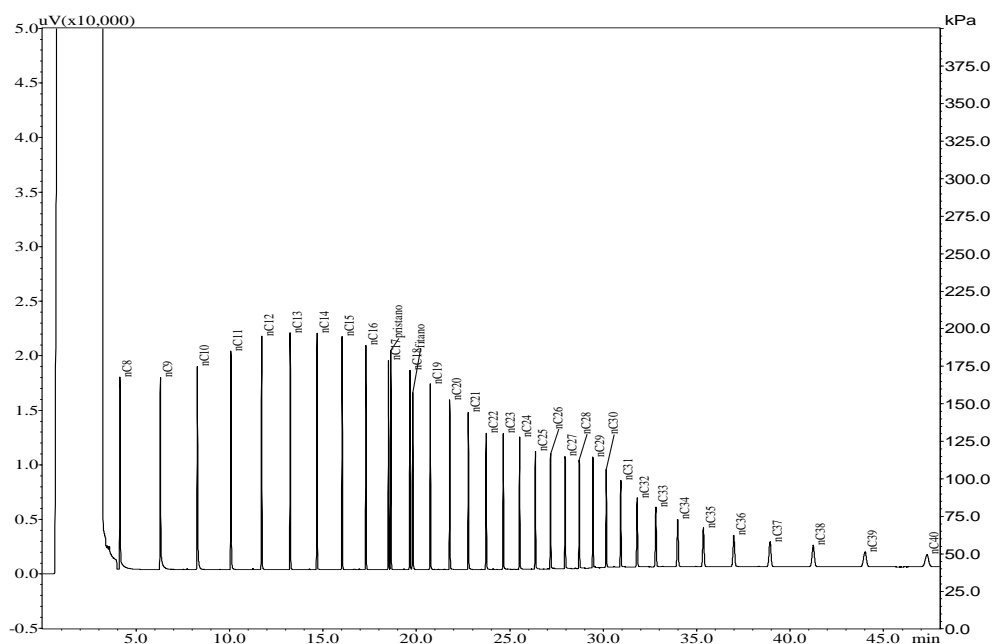


Figura 1: Cromatograma dos alcanos na concentração de 25 mg.L^{-1} por CG-DIC.

A linearidade dos compostos hidrocarbônicos (busca pelo intervalo de concentrações para obter relação linear entre a concentração e a área do pico) foi determinada utilizando dez níveis de concentração (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 5; 10; 25; 50 mg.L^{-1}) por padronização externa com injeção direta da solução no CG-DIC. Do octano (C_8) ao nonadecano (C_{19}) a faixa foi linear de 0,4 a 50 mg.L^{-1} . Do eicosano (C_{20}) ao pentatriacontano (C_{35}) apresentaram uma faixa de 0,8 a 50 mg.L^{-1} . Os demais compostos, com exceção do hexatriacontano (C_{36}), apresentaram a menor faixa linear de trabalho, variando de 1,0 a 50 mg.L^{-1} (tabela 1).

A partir da faixa linear calculou-se a equação de regressão e os coeficientes de correlação da curva de calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados. Todos os compostos apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,993, o que evidencia um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão e indica que o modelo linear pode ser usado na quantificação dos analitos [9].

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados baseados no método dos parâmetros da curva analítica, por ser estatisticamente mais confiável, pois outros métodos, como a relação sinal-ruído, por exemplo, picos maiores aumentam essa relação, resultando em LD e LQ mais baixos [10]. Os valores dos limites de detecção variaram de 0,1 a 0,4 mg.kg^{-1} e 0,4 a 1,3 mg.kg^{-1} para o limite de quantificação para uma massa de 10 g de sedimento (tabela 1). Através dos valores dos limites verifica-se que o composto nonano (C_9) apresenta a melhor sensibilidade que os demais alcanos, dado pelo menor valor do limite de quantificação. Verifica-se também que, em sua maioria, os hidrocarbonetos de menor massa molecular apresentam valores menores dos limites em relação aos de maior massa molecular.

Tabela 1. Resultados da linearidade, coeficientes de correlação (r), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos alcanos.

Compostos	Linearidade (mg.kg^{-1})	r	LD (mg.kg^{-1})	LQ (mg.kg^{-1})
$\text{C}_8 - \text{C}_{19}$	0,4-50	0,999-1,000	0,1	0,4-1,0
$\text{C}_{20} - \text{C}_{35}$	0,8-50	0,993-0,998	0,2	0,8-1,1
$\text{C}_{36} - \text{C}_{40}$	1,0-50	0,997-0,998	0,3-0,4	0,8-1,3

Realizou-se neste estudo a recuperação dos analitos na matriz de um sedimento não contaminado. A recuperação é um dos parâmetros relacionados com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra [11]. Tradicionalmente, métodos baseados na extração Soxhlet têm sido usados como referência para avaliar o desempenho de outros métodos, inclusive ultra-som [12,13]. A partir de 10 g do sedimento foi realizada quatro replicatas mais o branco no nível de concentração de 10 mg.kg^{-1} . No método por ultra-som as recuperações variaram de 15,2 % (C_8) a 90,4 % (C_{21}) com média de 58,6 % e recuperações dentro de 70-120 % para os compostos C_{17} , pristano, C_{18} , fitano, C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{23} , C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{28} , C_{30} (figura 2). Os valores do coeficiente de variação (C.V) oscilaram de 1,5 (C_{11}) a 50,6 % (C_{32}) com média de 24,7 % e valores abaixo de 20 % para os compostos de C_8 a C_{21} (figura 3).

As recuperações dos alcanos para o método de extração Soxhlet variou de 20,9 % (C_8) a 149,9 % (C_{26}) com média de 89,3%, apresentando recuperações dentro de 70-120 % os compostos C_{13} , C_{14} , C_{16} , C_{17} , pristano, C_{18} , fitano, C_{20} , C_{22} , C_{23} , C_{24} , C_{25} , C_{29} , C_{32} , C_{33} , C_{34} , C_{40} . O coeficiente de variação ficou na faixa de 16,7 % (C_{34}) a 63,9 % (C_9) com média de 39,9 % e valores abaixo de 20 % os compostos C_{32} e C_{34} (figura 3).

De acordo com os valores de recuperação a técnica por ultra-som obteve um menor poder extrativo (menor eficiência) em relação ao método por Soxhlet (figura 4), fato relatado em outros trabalhos [14,15].

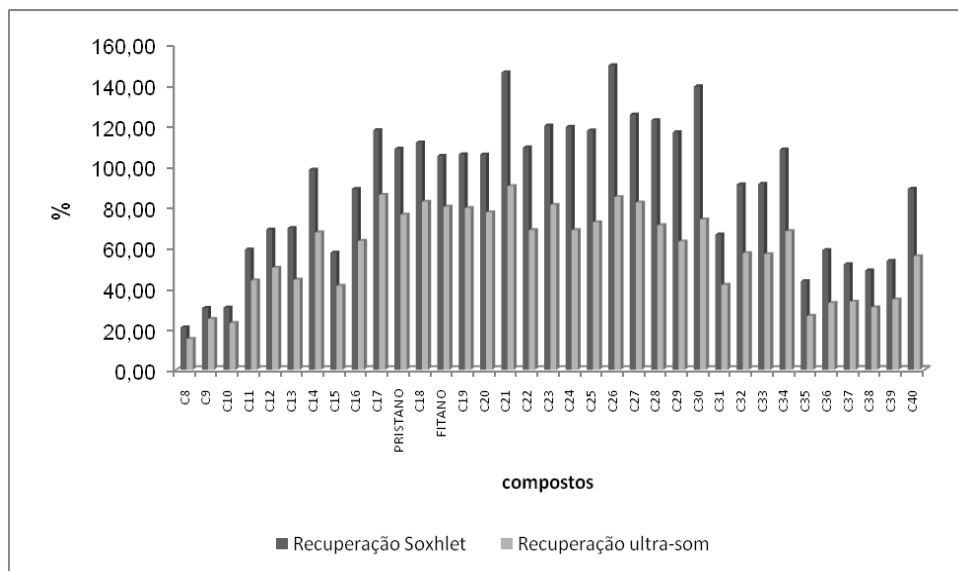


Figura 2: Comparação das recuperações dos alcanos pelos dois métodos de extração.

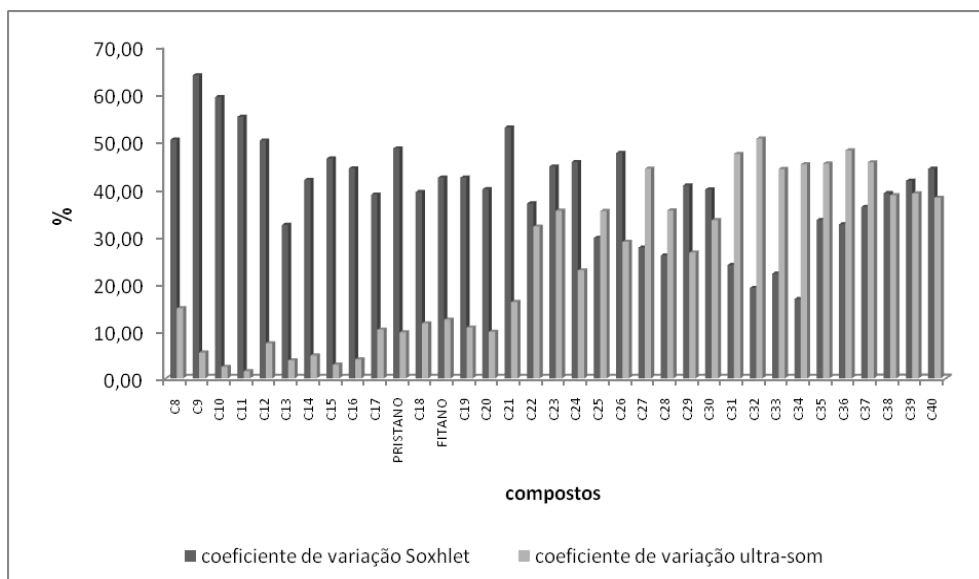


Figura 3: Comparação do coeficiente de variação dos alcanos pelos dois métodos de extração.

As duas técnicas foram comparadas através do teste F, observando os valores de recuperação e coeficiente de variação. A variância da recuperação do método Soxhlet foi maior que a do método ultra-som, ocorrendo o oposto para a variância do coeficiente de variação. Os valores de F para recuperação e C.V foram 2,84 e 2,38, respectivamente. Como o valor de F tabelado é 9,28, observa-se que não existe diferença significativa entre a variância da recuperação (exatidão) e do C.V (precisão) dos dois métodos ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) para 95 % de confiança.

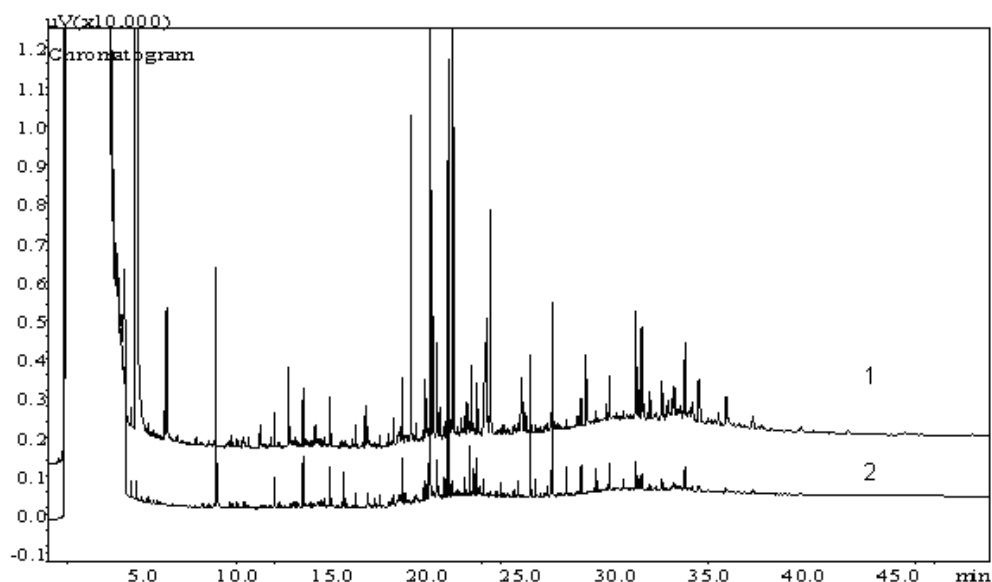


Figura 4. Cromatograma da amostra de sedimento do rio Japararuba-SE por extração Soxhlet (1) e extração ultra-som (2).

A análise das amostras de sedimento do rio Japararuba apresentaram valores para o método ultra-som de 0,41 (C_8) a 1,88 mg.kg^{-1} (C_{27}) e para o método Soxhlet de 0,29 (C_{11}) a 3,64 mg.kg^{-1} (C_{29}). O diagnóstico para identificação da provável fonte (biogênica ou petrogênica) desses alcanos nos sedimentos estuarinos foi realizado através do índice preferencial de carbono (CPI), $2(n-C_{27}+n-C_{29})/(n-C_{26}+2n-C_{28}+n-C_{30})$, a razão entre cadeias ímpares e pares (ímpar/par), a relação entre o pristano e fitano (Pristano/Fitano), a concentração $n-C_{17}$ pela concentração do pristano ($C_{17}/\text{Pristano}$) e a concentração C_{18} pela concentração do fitano (C_{18}/Fitano).

O valor do CPI ficou na faixa de 0,54-1,29 (ultra-som/Soxhlet). Hidrocarbonetos derivados de petróleo apresentam valores de CPI próximos de 1, enquanto sedimentos de dominância biogênica apresentam valores mais altos, entre 3 e 6 [16], o que indica a provável inserção de hidrocarbonetos de fontes petrogênicas das amostras analisadas. A relação ímpar/par teve valores de 0,94 a 1,14 (ultra-som/Soxhlet) visto que, valores próximos a 1 são normalmente atribuídos a hidrocarbonetos de petróleo [2]. A razão pristano/fitano foi menor que 1 (0,41-ultra-som; 0,54-Soxhlet) indicando a presença de fontes petrogênicas na região. O pristano é mais comum entre os hidrocarbonetos biogênicos, enquanto que o fitano raramente é biossintetizado. Os valores muito maiores que 1 indicam presença de compostos de origem biogênica enquanto valores próximos ou inferiores a 1 indicam contaminação por petróleo [17]. As razões $C_{17}/\text{Pristano}$ e C_{18}/Fitano são utilizadas para determinar se os hidrocarbonetos de petróleo presentes no ambiente são recentes. Sedimentos contaminados apresentam valores baixos destas razões (entre 0,3 e 0,6), sugerindo a presença de óleo degradado. As razões de $n-C_{17}/\text{Pri}$ e $n-C_{18}/\text{Fit}$ apresentaram valores superiores a faixa acima citada com 0,92 - $C_{17}/\text{Pristano}$ (ultra-som) a 6,65 - $C_{17}/\text{Pristano}$ (Soxhlet).

Para contribuir na avaliação do presente trabalho, apresentamos a seguir alguns dados da literatura. Azevedo e Gomes (2004) [18] avaliaram hidrocarbonetos alifáticos em sedimentos fluviais (Campos dos Goytacazes-RJ) por ultra-som, obtendo concentrações de 1,2 a 4,3 mg.kg^{-1} com valores de CPI próximos a 1, semelhantes aos níveis de concentrações encontrados em nosso trabalho. Yamada (2006) [19] encontrou

concentrações de 2,8 a 4,8 mg.kg⁻¹ em sedimento fluvial (MG) por extração ultra-som com relações diagnósticas comparáveis aos observados no presente estudo. A extração Soxhlet com determinação de n-alcanos (0,7 a 15,8 mg.kg⁻¹) foi avaliada por Wu, *et al* (2001) [20] em sedimento marinho com valores dos índices (CPI, ímpar/par, Pri/Fit, n-C₁₇/Pri e n-C₁₈/Fit) similares aos referidos do estudo.

4. CONCLUSÕES

A extração por ultra-som demonstrou ser favorável na determinação dos compostos C₁₇, pristano, C₁₈, fitano, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₃, C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₂₈, C₃₀ apresentando recuperações na faixa de 70 a 120 %.

O método proposto por ultra-som na determinação de alcanos em sedimento demonstrou ter eficiência comparável ao método convencional (Soxhlet) na análise de amostras de sedimento do rio Japarutuba, visto através do teste F para os parâmetros de recuperação e coeficiente de variação estudados. Além disso, tem baixo custo, menor tempo de extração e versatilidade, que conferem à técnica por ultra-som uma alternativa na determinação de hidrocarbonetos em amostras ambientais sólidas como solo e sedimento. Uma das vantagens da extração ultra-som é o tempo oito vezes menor que a extração Soxhlet. Para um laboratório de rotina, isso resulta em menor custo e maior rapidez.

Através das relações diagnósticas, foi verificado que os alcanos determinados nas amostras de sedimento do rio Japarutuba derivam de fontes petrogênicas.

1. SEDNET. The opinion of Sednet on environmentally, socially and economically viable sediment management. Disponível em: <http://www.sednet.org/download/SedNet_strategic_paper_2004.pdf> Acesso: 05 de maio. 2008.
2. VOLKMAN, J.K.; HOLDSWORTH, D.G.; NEILL, G.P.; BAVOR JR, H.J. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Science of the Total Environment*. 112:203-219 (1992).
3. BARROS, F.; HATJE, V.; FIGUEIREDO, M.B.; MAGALHAES, W.F.; DOREA, H.S.; EMIDIO, E.S. The structure of the benthic macrofaunal assemblages and sediments characteristics of the Paraguaçu estuarine system, NE, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 78:753-762 (2008).
4. ALMEIDA, F.V. Base técnico-científica para desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimentos referentes a compostos orgânicos persistentes. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2003. 114p.
5. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA 3550B: Ultrasonic Extraction. Disponível em: <<http://www.trincoll.edu/~henderson/textfi~1/416%20notes/3550b.pdf>> Acesso em: 6 de abr. 2008.
6. BANJOO, D.R.; NELSON, P.K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*. 1066:09-18 (2005).
7. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA 3540C: Soxhlet Extraction. Disponível em: <<http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>> Acesso em: 6 de abr. 2008.
8. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA 3630C: Silica Gel Cleanup. Disponível em: <<http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3630c.pdf>> Acesso em: 6 de abr. 2008.
9. CHUI, Q.S.H.; ZUCCHINI, R.R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Química Nova*. 24:374-380 (2001).
10. RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 27:771-780 (2004).
11. BRITO, N.M.; AMARANTE JR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 13:129-146 (2003).
12. HECHLER, U.; FISCHER, J.; PLAGEMANN, S. Comparison of different extraction methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 351:591-592 (1995).
13. LOPEZ-AVILA, V.; YOUNG, R.; TEPLITSKY, N. Microwave-assisted extraction as an alternative to Soxhlet, sonication, and Supercritical fluid extraction. *Journal of AOAC International*. 79:142-156 (1996).
14. LOPEZ-AVILA, V.; YOUNG, R.; BENEDICTO, J.; HO, P.; KIM, R.; BECKERT, W.F. Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy. *Analytical Chemistry*. 67:2096-2102 (1995).
15. STEPHENS JR, D.L.; MCFADDEN, T.; HEATH, O.D.; MAULDIN, R.F. The effect of sonication on the recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal stack ash surfaces. *Chemosphere*. 28:1741-1747 (1994).

16. COLOMBO, J.C.; PELLETIER, E.; BROCHU, C.; KHALIL, M.; CATOGGIO, J.A. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Science & Technology*. 23:888–894 (1989).
17. LOURENCO, R. A. Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos – hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróis e alquenomas. Dissertação de Mestrado, Instituto Oceanográfico, USP, São Paulo, 2003. 101p.
18. GOMES, A.O.; AZEVEDO, D.A. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in tropical recent sediments of Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14:358-368 (2003).
19. YAMADA, T.M. Determinação de fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alifáticos em sedimentos de ambientes aquáticos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UFSCAR, São Carlos, 2006. 101p.
20. WU, Y.; ZHANG, J.; MI, T.; LI, B. Occurrence of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the core sediments of the Yellow Sea. *Marine Chemistry*. 76:01-15 (2001).