Artigo

Avaliação do Método Analítico Aplicado a Biomarcadores Geoquímicos em Estudo Paleoambiental da Barreira Costeira Associada à Lagoa da Conceição (Florianópolis/SC)

Ferreira, V. R.*; Madureira, L. A. S.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (6), 1978-1997. Data de publicação na Web: 14 de novembro de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

Evaluation of the Analytical Method Applied to Geochemical Biomarkers in a Paleoenvironmental Study of Coastal Barrier Associated to Conceição Lagoon (Florianópolis / SC)

Abstract: Geochemical biomarkers play an important role in studies of palaeoenvironment reconstruction based on historical variation of sedimentary records. However, a great number of steps are usually involved for their analytical determination including extraction, clean up, derivatization (esterification and silanization) and individual calibration curves for accurate results. Thus, prior to the extraction an optimization procedure may be required to verify possible losses through the analytical method. In the present work distinct reaction times during the esterification step, NaCl concentration to separate the aqueous and organic phases and extracting solvents were assessed. The best working conditions achieved were reaction time of 8 hours, NaCl solution 20 % (m/v) and hexane. For the biomarkers analytical parameters sensitivity, linearity (R^2), LOD and LOQ were obtained with external calibration curves and checked against those obtained with spiked sediment. The results showed no significant differences for the analytical parameters. Due to the lack of certificate material, the precision and accuracy were studied by recovery tests. Solutions containing mix of aliphatic hydrocarbons, alcohols, carboxylic acids, sterols and ketones were added to sediment samples and submitted to all the steps of the process. This mix was left in contact with sediment samples for 1 hour, 24 hours and 7 days, in 3 concentration levels. The recovery were all within the acceptable range 70-120% and RSD < 10%. The analytical method was applied to samples taken from two single sediment cores (stations T3 and T4 with 525 cm and 364 cm depth, respectively) collected at the Mozambique-Barra da Lagoa (Florianópolis - Santa Catarina) beach. A preliminary assessment of the hydrocarbon distribution indicated a mixed source of organic matter through the T3 profile while the T4 core was dominated by terrestrial hydrocarbons with predominance of C_3 plants.

Keywords: Optimization; geochemical biomarkers; paleoenvironmental study; Conceição Lagoon.

Resumo

Os biomarcadores geoquímicos são de grande importância em estudos de reconstrução de paleoambientes. Devido ao grande número de etapas envolvidas na sua determinação, tais como extração com solvente, fracionamento, derivatização (esterificação e silanização) e quantificação, é preciso garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. Desta forma, antes das extrações dos biomarcadores nos perfis sedimentares deve-se fazer uma otimização de forma a identificar possíveis perdas envolvidas e avaliar o método analítico que será utilizado. No presente trabalho foram avaliadas a etapa de esterificação (tempos de reação e forma de extração). As melhores condições de trabalho foram com tempo de reação de 8 horas, solução de NaCl a 20% (m/v) e hexano. A sensibilidade analítica, linearidade (R^2), LOD e LOQ obtidos por meio de curvas de calibração externa para os biomarcadores não foram significativamente diferentes dos resultados obtidos por adição dos padrões em sedimento. A precisão e exatidão do método foram avaliadas por meio de ensaios de recuperação. Os biomarcadores adicionados ao sedimento foram mantidos em contato por 1h, 24h e 7 dias, em três níveis de concentração. Os resultados de recuperação encontraram-se todos dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-120%, com desvios padrão inferiores a 10%. O método analítico foi aplicado às amostras de dois perfis sedimentares denominados de T₃ (525 cm) e T₄ (364 cm) coletados no sistema praial Moçambique-Barra da Lagoa (Florianópolis – Santa Catarina). Com base nos resultados para hidrocarbonetos alifáticos, uma avaliação preliminar permitiu inferir sobre a presença e a origem de matéria orgânica para os perfis estudados.

Palavras-chave: Otimização; biomarcadores geoquímicos; estudo paleoambiental; Lagoa da Conceição.

* Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, CFM, Campus Universitário Trindade, C.P 476, CEP 88040-900 Florianópolis-SC, Brasil.

vanribferreira@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20160134](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160134)

Avaliação do Método Analítico Aplicado a Biomarcadores Geoquímicos em Estudo Paleoambiental da Barreira Costeira Associada à Lagoa da Conceição (Florianópolis/SC)

Vânia Ribeiro Ferreira,* Luiz Augusto dos Santos Madureira

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, CFM, Campus
Universitário Trindade, C.P 476, CEP 88040-900 Florianópolis-SC, Brasil.

* vanribferreira@gmail.com

Recebido em 18 de abril de 2016. Aceito para publicação em 11 de novembro de 2016

1. Introdução

2. Material e métodos

- 2.1.** Amostragem
- 2.2.** Derivatização dos biomarcadores
- 2.3.** Curvas de calibração por padronização interna
- 2.4.** Ensaios de adição de recuperação
- 2.5.** Extração dos biomarcadores nos sedimentos
- 2.6.** Fracionamento e pré-concentração
- 2.7.** Análise por CG-MS

3. Resultados e discussão

- 3.1.** Esterificação dos ácidos graxos
- 3.2.** Curvas de calibração por padronização interna
- 3.3.** Exatidão e precisão
- 3.4.** Aplicação dos métodos aos perfis sedimentares

4. Conclusão

1. Introdução

Biomarcadores geoquímicos são de grande importância em estudos de reconstrução de paleoambientes e tem sido amplamente utilizados em diversos trabalhos.¹⁻⁵ Embora represente uma pequena fração da matéria orgânica (MO), os biomarcadores são considerados robustos

devido à especificidade de sua biossíntese e resistência à biodegradação.^{6,7} Eles podem ser utilizados na caracterização da fonte e distribuição de MO, além fornecer informações a respeito de mudanças em paleoambientes marinho e continental.⁸⁻¹¹

A determinação de biomarcadores em amostras de perfis sedimentares envolve uma série de etapas, entre elas a extração com solvente, *cleanup*, fracionamento dos

compostos, derivatização e concentração dos analitos para posterior análise cromatográfica. Em função do grande número de etapas envolvidas, é preciso garantir que as concentrações determinadas sejam representativas do sedimento, de forma a não comprometer os dados das análises. Desta forma, antes das extrações dos compostos presentes nos sedimentos é necessário avaliar cada etapa do processo a fim de minimizar as possíveis perdas de analitos e então poder proceder com a validação do método.

A validação do método consiste em “documentar a qualidade de um procedimento analítico, por meio do estabelecimento dos requisitos adequados para avaliar o desempenho do método, tais como exatidão, precisão, limites de detecção, entre outros e através da avaliação dos valores encontrados”.¹²⁻¹⁴ Também pode ser definida como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um uso específico pretendido foi atendido”.¹⁵ Segundo o “*Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis*” da IUPAC, quando um laboratório já tem um método desenvolvido antes de aplicá-lo é necessário validá-lo de forma a assegurar sua viabilidade antes do exercício dispendioso de um grande número de ensaios, e fornecer provas de sua confiabilidade quando dados de ensaios interlaboratoriais não estão disponíveis ou não é possível a participação em tal ensaio. Este tipo de validação é denominado validação interna.¹⁵

No presente estudo, devido à inexistência de materiais de referência contendo os biomarcadores, foram feitos estudos de adição e recuperação de diversos compostos comumente utilizados em estudos de reconstrução de paleoambientes tais como os hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, ácidos carboxílicos, esteróis e cetonas. Nos ensaios buscou-se avaliar algumas das possíveis fontes de erro tais como o efeito de matriz e erros aleatórios (repetibilidade) conforme descrito no guia da IUPAC. Além disso, foram avaliadas as melhores condições de trabalho

para a reação de esterificação dos ácidos carboxílicos com o objetivo de reduzir o tempo de reação e as possíveis perdas nesta etapa. Após a validação do método, este foi utilizado para extrair amostras de dois perfis sedimentares coletados no sistema praial Moçambique-Barra da Lagoa (Florianópolis – Santa Catarina).

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

O sistema praial Moçambique-Barra da Lagoa, localizado na cidade de Florianópolis – SC, estende-se desde a Ponta das Aranhas, (latitude 27°2'31"N) até o Canal da Barra (latitude de 27°35'43"S). As amostras foram coletadas em tubos de alumínio de 6 metros de comprimento e 7 cm de diâmetro, utilizando um equipamento do tipo *vibracore*. Após a coleta, os testemunhos sedimentares T₃ (525 cm) e T₄ (384 cm) foram mantidos refrigerados até o fracionamento. Os testemunhos foram seccionados a cada 5 cm e em seguida as amostras foram secas em estufa (60°C), peneiradas (250 µm de abertura) e estocadas em recipientes de vidro (previamente descontaminados com solvente e calcinados) até a extração.

2.2. Derivatização dos biomarcadores

Soluções padrões de álcoois (docosanol, octacosanol, hexadecanol e octadecanol) e esteróis (colesterol, β-Sitoesterol, stigmasterol e colestanol) na concentração de 250 ng mL⁻¹ foram silanizadas com o objetivo de converter os compostos em derivados de trimetilsilil éteres. As soluções padrões foram secas sob fluxo de nitrogênio e em seguida adicionou-se 50 µL do reagente BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). A mistura foi deixada em estufa a 60°C por 1 hora, e ao término da reação evaporou-se o excesso de

reagente silanizante sob fluxo de nitrogênio. Em seguida as soluções foram avolumadas com 1 mL *n*-hexano, para posterior análises por cromatografia a gás espectrometria de massas (GC-MS).

Soluções padrões de ácidos graxos (palmitico, esteárico, mirístico, docosanóico, araquídico e octacosanóico) na concentração de 250 ng mL⁻¹ foram esterificadas com o objetivo de converter os compostos em ésteres metílicos. Para isso, 50 µL de BF₃ (14% v/v) em metanol foram adicionados aos frascos contendo os padrões de ácidos sendo deixados em estufa a 60 °C. Os tempos de reação testados foram de 6 e 12 horas. Após o término da reação, adicionou-se 300 µL de água MiliQ. Outros dois testes foram feitos, com a adição de solução de NaCl, nas concentrações de 1) 10% (m/v) e 2) 20% (m/v). Após a separação das fases, adicionou-se solvente, sendo testados diferente volume de hexano e diclorometano.

A fase orgânica foi extraída três vezes, separada e seca em coluna contendo sulfato de sódio anidro (previamente seco a 200 °C durante 12 horas). Ao final o volume coletado foi reduzido sob fluxo de nitrogênio até 1 mL para posterior análise cromatográfica.

2.3. Curvas de calibração por padronização interna

As concentrações utilizadas foram de 10, 25, 50, 100, 150, 250, 350 e 500 ng mL⁻¹ para os padrões de hidrocarbonetos alifáticos (C₁₂ a C₃₀), álcoois, esteróis e ácidos graxos e 90 ng mL⁻¹ para os seus respectivos padrões internos C_{16d}, heneicosanol, 5α-colestano e ácido tridecanóico.

Duas curvas foram preparadas com concentrações crescentes dos padrões. Uma delas com solução de hexano e a outra adicionando quantidades crescentes de padrões em amostras de sedimentos (previamente extraídas e analisadas de modo a garantir que os biomarcadores estivessem

ausentes). Após a adição, os padrões foram deixados em contato por 1 hora com o sedimento e depois extraídos, derivatizados e injetados no GC-MS.

2.4. Ensaios de adição e recuperação dos biomarcadores

Amostras de 5 g sedimento (previamente extraídas), foram colocadas em tubos Falcon de 50 mL e em seguida enriquecidas com solução padrão contendo uma mistura dos biomarcadores nas concentrações de 250 ng mL⁻¹. Em seguida os tubos foram colocados em um agitador rotativo para não voláteis (Tecnal – Brasil) por 15 min para homegeinização dos padrões com o sedimento e em seguida foram deixados em contato pelo tempo de 1 h, 24 horas e 7 dias (neste caso, a cada 24 horas, era feita a homogeneização dos sedimentos. Os sedimentos foram posteriormente extraídos, derivatizados e analisados por GC-MS.

Um segundo ensaio foi realizado, adicionando-se os padrões com concentrações de 25, 250 e 500 ng mL⁻¹ e deixando em contato com amostras de sedimentos por 1 hora. Os biomarcadores foram extraídos após o término do tempo de contato.

Três ciclos de extração (sólido/líquido) de 30 min foram realizados em ultrassom (25 kHz), utilizando no primeiro ciclo 20 mL de CH₃OH:CH₂Cl₂ (1:1) e nos demais 20 mL de CH₂Cl₂. O sistema líquido/sólido foi misturado com o auxílio de um agitador do tipo vortex. A cada etapa da extração os tubos foram centrifugados (15 min), com o intuito de separar as fases sólida e líquida, e o sobrenadante foi transferido para um balão. Ao final da extração, quando necessário, o extrato final foi passado por uma coluna contendo sulfato de sódio para reter um pouco de sedimento que não havia decantado totalmente.

O volume do extrato final foi reduzido em um rotaevaporador (temperatura do banho

de 50°C) depois transferido para um frasco de 2 mL, sendo o balão lavado três vezes com $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1) para garantir a transferência quantitativa dos compostos. Em seguida, o solvente do extrato foi totalmente seco sob um leve fluxo de N_2 , submetido às etapas de esterificação e silanização, e ao final dissolvido em 1 mL de hexano, sendo feita adição dos padrões internos e em seguida análise por GC-MS.

2.5. Extração dos compostos biomarcadores nos sedimentos

A metodologia otimizada foi aplicada na extração de biomarcadores dos perfis sedimentares coletados (T_3 e T_4).

Previamente à extração adicionou-se cobre ativado ao sedimento para remoção de enxofre molecular, que pode interferir na análise cromatográfica. Para a ativação do cobre (1 g) foram utilizados 5,0 mL de solução de HCl a $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ e, após agitação (30 s) e centrifugação (5 min), o cobre foi lavado sequencialmente com metanol, mistura de diclorometano:metanol(1:1) e por último com diclorometano. Em seguida, uma massa de 5 g do sedimento seco e peneirado foi adicionada ao tubo contendo o cobre ativado e feita a homogeneização no *vortex*. Antes da extração o padrão interno d-C_{24} foi adicionado e a extração foi realizada conforme descrito no item 2.4.

A esterificação foi feita com adição de 40 μL de BF_3 (14% v/v) em metanol ao frasco contendo o extrato seco, sendo a reação feita em estufa a 60 °C por 6 h. Após o fim do tempo da reação, adicionou-se 300 μL solução aquosa de NaCl a 20 % (m/v) e 500 μL de hexano para extração dos compostos

orgânicos. Essa mistura foi transferida para uma coluna contendo sulfato de sódio anidro (previamente seco a 200 °C durante 12 horas), sendo o frasco lavado 3 vezes com 500 μL de hexano. Em seguida, o extrato foi totalmente seco e silanizado. O procedimento de silanização foi o mesmo descrito anteriormente no preparo dos padrões de álcoois e esteróis. Após o término da reação de silanização, o extrato foi seco, e depois adicionou-se 100 μL de hexano. Antes da injeção no GC-MS foram adicionados os respectivos padrões internos.

2.6. Fracionamento e pré-concentração dos extratos

Em função do baixo teor de carbono orgânico encontrado nas análises de COT, previamente realizadas nas amostras, esperava-se uma baixa concentração dos biomarcadores. Desta forma, optou-se então por não separar os biomarcadores em diferentes frações após o término da extração, como é comumente feito, e sim injetar o extrato total. Além disso, na etapa de concentração, o extrato final foi seco e recuperado com 100 μL hexano antes da injeção ao invés de 1 mL.

2.7. Análise por GC-MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um GC-MS com injetor automático. Os parâmetros cromatográficos, previamente otimizados em outros trabalhos do laboratório, estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Parâmetros operacionais usados para a determinação dos teores de biomarcadores

Equipamento	GC-MS - PolarisQ, acoplado a um autoamostrador AS 3000 (Thermo Finnigan)
Injeção	Volume: 1µL; Modo: <i>splitless</i>
Coluna	DB5-MS (Agilent) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm*
Gás de Arraste	He 1,2 mL min ⁻¹ (vazão constante)
Temperaturas	Forno: 60 °C (2 min); rampa 1: 10°C min ⁻¹ até 150 °C; rampa 2: 3 °C min ⁻¹ até 300°C (5,0 min) Injetor: 280 °C; Linha de transferência: 250°C Fonte de íons: 200°C
Modo de monitoramento	Full scan (<i>m/z</i> : 40-600)
Energia da fonte de ionização	70 eV

*comprimento x diâmetro interno x espessura do filme da fase estacionária (5% fenil / 95% dimetil siloxano)

3. Resultados e discussão

3.1. Esterificação dos ácidos graxos

A reação de esterificação para a conversão de ácidos graxos em ésteres

metílicos foi catalisada por um ácido de Lewis (BF₃)

Os resultados obtidos para os ácidos C₁₆, C₁₈ e C₂₈ submetidos aos tempos de reação de 6 h e 8 h para as diversas condições de esterificação testadas encontram-se descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Média dos valores das áreas integradas e dos desvios padrões relativos para os ésteres metílicos C₁₆, C₁₈ e C₂₈ (n=3) por GC-MS para o tempo de reação de 6 h

			C ₁₆		C ₁₈		C ₂₈	
Solvente	% NaCl	Extração*	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)
DCM	0	Lavagem 1	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	-
	10	Lavagem 2	70184	3,99	48951	3,35	33954	2,56
DCM	10	Lavagem 3	76104	1,19	55942	1,58	45318	1,69
	20	Lavagem 2	76584	2,91	53498	3,11	41697	3,01
		Lavagem 3	85013	1,36	63147	1,69	47698	1,56
	10	Lavagem 2	82698	4,01	67845	3,59	33587	4,15
		Lavagem 3	89569	1,28	63587	2,01	45984	2,56
Hexano		Lavagem 2	127691	3,39	88749	3,01	69854	3,56
	20	Lavagem 3	208569	2,01	178594	1,56	178544	2,99

* Lavagem 1: adição de 1000 µL de H₂O e extração com solvente: 1,0 mL ; Lavagem 2: adição de 1000 µL de solução de NaCl e extração com solvente: 1mL + 500 µL; Lavagem 3: adição de 300 µL de solução de NaCl e extração com solvente: 3 x 500 µL.

Tabela 3. Média dos valores das áreas integradas e dos desvios padrões relativos para os ésteres metílicos C₁₆, C₁₈ e C₂₈ (n=3) por GC-MS para o tempo de reação de 8 h

Éster metílico			C ₁₆		C ₁₈		C ₂₈	
Solvente	% NaCl	Extração*	Área Média	RSD (%)	Área média	RSD (%)	Área média	RSD (%)
DCM	0	Lavagem 1	nd **	-	nd **	-	nd **	-
		Lavagem 2	71976	4,12	51849	3,54	31082	2,98
DCM	10	Lavagem 3	75719	1,54	61297	1,99	42598	1,56
		Lavagem 2	77966	2,66	59153	2,98	35981	2,10
	20	Lavagem 3	89160	1,23	65487	0,95	47598	0,99
		Lavagem 2	81202	3,13	69874	4,01	39548	2,56
Hexano	10	Lavagem 3	88181	1,27	61987	1,18	45698	1,25
		Lavagem 2	137878	5,52	98714	4,56	79451	3,28
	20	Lavagem 3	243461	1,60	195631	1,12	149597	1,65
		Lavagem 2						

* Lavagem 1: adição de 1000 µL de H₂O e extração com solvente: 1,0 mL ; Lavagem 2: adição de 1000 µL de solução de NaCl a 20% e extração com solvente: 1 mL + 500 µL; Lavagem 3: adição de 300 µL de solução de NaCl a 20 % e extração com solvente: 3 x 500 µL.

Conforme pode-se observar na tabela 2, no teste realizado adicionando-se apenas água miliQ, seguida de extração com diclorometano, os ácidos não foram detectados. Dessa forma, como a utilização da água pura não resultou na extração, foram realizados outros dois testes com uma solução contendo NaCl: 1) 10 % e 2) 20 % (m/v). Essa adição teve a função de provocar o efeito conhecido com *salting out*, que reduziu a solubilidade dos ésteres metílicos, na água e consequentemente melhorou a extração para a fase orgânica. Pode-se observar um pequeno incremento nos

valores de área média com o aumento da concentração da solução salina. Para realizar a extração dos ácidos da fase aquosa para a fase orgânica, pode-se observar que o procedimento de lavagem 3 forneceu valores maiores de área em relação ao procedimento 2. No procedimento 3 foram feitas mais extrações utilizando pequenas porções de solvente, e essa melhora na eficiência pode ser explicada pela **lei de distribuição**, onde o equilíbrio resultante da distribuição dos ésteres metílicos entre a água e a fase orgânica apresenta uma constante de distribuição K, dada por (equação 1):

$$K = (\alpha \text{ éster metílico})_{\text{org}} / (\alpha \text{ éster metílico})_{\text{aq}}$$

Equação 1

A partir desta constante é possível chegar à equação 2 e mostrar que para um sistema simples a concentração dos ésteres metílicos

[EMet] que permanece na fase aquosa após i extrações com um solvente orgânico é dado por:

$$[\text{EMet}]_i = (V_{\text{aq}} / V_{\text{org}} K + V_{\text{aq}})^i \times [\text{EMet}]_0$$

Equação 2

Desta forma, foi mais eficiente empregar pequenas porções do solvente para uma

amostra do que extrair com uma única porção de volume maior.

Em relação aos testes utilizando hexano, os valores de área obtidos com uma maior concentração de sal e utilizando o procedimento de lavagem 2 foram maiores, principalmente para a solução de NaCl a 20 % (m/v). Essa melhora com a utilização do hexano pode ser explicada com base na diminuição da solubilidade em água (13 mg L^{-1} (15°C)), do que quando foi utilizado o diclorometano (13 g L^{-1} (20°C)). O fato de o diclorometano ser mais solúvel em água, possivelmente fez com ele fosse adsorvido junto com a água na coluna de sulfato, desta forma a extração dos ésteres metílicos foi prejudicada. As mesmas considerações podem ser feitas para os testes com tempo de extração de 8 horas.

Em relação ao tempo de reação, com a realização do teste t, em um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados para os tempos de 6 h e 8 h não diferem, desta forma o tempo escolhido para reação de esterificação foi de 6 h.

Desta as melhores condições de trabalho encontradas foram com 6 horas de extração, utilizando solução de NaCl 20% e hexano com solvente extrator da fase orgânica.

3.2. Curvas de calibração por padronização interna

3.2.1 Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada para medir a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas.^{12-14,16} Na prática, a sensibilidade foi avaliada pelo coeficiente angular das curvas de calibração preparadas com solvente e fazendo adição de padrão na matriz. Abaixo seguem as inclinações da reta para alguns dos biomarcadores estudados.

Figura 1. Comparação entre as inclinações das curvas com solvente e com a matriz para os hidrocarbonetos alifáticos C₂₂ e C₃₀

Figura 2. Comparação entre as inclinações das curvas com solvente e com a matriz para os ésteres metílicos C_{14} e C_{28}

As inclinações das retas da curva com solvente e matriz foram bem similares para todos os biomarcadores, mostrando que não houve efeito significativo da matriz e por isso quantificação pode ser feita com curva preparada pela adição de padrões em solventes.

3.2.2 Linearidade, Limites de Detecção e Quantificação

Através da linearidade foi verificada a capacidade do método analítico de estabelecer uma relação direta, entre o valor de área do sinal cromatográfico e a concentração, sendo a linearidade verificada por meio do coeficiente de correlação (R).

O LOD foi calculado com base na equação abaixo, onde s é a estimativa do desvio padrão do branco, e S é o coeficiente angular da reta.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Os valores de LOQ com base na equação da reta foram calculados com base na formula a seguir. Os valores de R, LOD e LOQ, obtidos para as curvas dos biomarcadores na faixa de trabalho de 10 a 500 ng mL⁻¹ (Tabela 4).

Para todos os biomarcadores, os valores estão dentro do recomendado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO (0,90)¹⁷ sendo satisfatórios para as determinações desejadas.

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Tabela 4. Valores de R, LOD e LOQ obtidos para os biomarcadores com base nos parâmetros da curva

Compostos	R *	LOD (ng mL ⁻¹)*	LOQ (ng mL ⁻¹)*
Tetradecano (C ₁₄)	0,997	0,57	1,73
Hexadecano (C ₁₆)	0,998	0,55	1,67
Octadecano (C ₁₈)	0,998	0,58	1,77
Nonadecano (C ₁₉)	0,996	0,52	1,58
Eicosano (C ₂₀)	0,997	0,64	1,94
Docosano (C ₂₂)	0,991	0,90	2,73
Tetracosano (C ₂₄)	0,996	0,62	1,89
Hexacosano (C ₂₆)	0,997	0,41	1,24
Octacosano (C ₂₈)	0,994	0,25	0,76
Triacotano (C ₃₀)	0,995	0,42	1,27
Colesterol	0,989	0,38	0,84
β-Sitoesterol	0,958	0,25	0,76
Stigmasterol	0,957	0,57	1,74
5αcoletan-3- β-ol	0,998	0,56	1,70
1-docosanol	0,978	0,29	0,88
1-octacosanol	0,987	0,37	1,07
1-hexadecanol	0,998	0,32	0,95
1-octadecanol	0,967	0,41	1,32
Octadecanona	0,987	0,49	1,75
Ácido Tetradecanóico (C ₁₄)	0,998	0,18	0,54
Ácido Hexadecanóico (C ₁₆)	0,995	0,17	0,53
Ácido Octadecanóico (C ₁₈)	0,990	0,25	0,76
Ácido Eicosanóico (C ₂₀)	0,993	0,24	0,74
Ácido Docosanóico (C ₂₂)	0,991	0,83	2,50
Ácido Octacosanóico (C ₂₈)	0,993	0,30	0,92

* os valores referem-se a curva utilizando solvente. Para a curva utilizando a matriz os valores foram similares e encontram nos anexos

Em relação aos valores de LOD e LOQ encontrados pelo método com base nos parâmetros da curva, estes demonstram a boa sensibilidade do método. Entretanto em termos práticos, optou-se por considerar como valor de LOQ o menor ponto da curva (10 ng mL⁻¹), pois na prática foi o menor valor que se conseguiu quantificar pela curva de calibração utilizada. Como o valor de LOD deve ser 3,3 vezes menor que o LOQ, utilizou-se essa relação para estabelecer o LOD do método de 3,03 ng mL⁻¹.

3.3. Exatidão e Precisão

Dentre os métodos propostos na literatura para estudo da exatidão, estão os baseados no uso de material de referência certificado (CRM), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos^{13,18-20}. Na ausência de materiais de recuperação certificados, o ensaio de recuperação é o mais utilizado para validação de processos analíticos, e neste trabalho em função da indisponibilidade de material de referência contendo os biomarcadores, este foi o método adotado.

3.3.1 Ensaios de adição e recuperação dos biomarcadores

O procedimento de fortificação realizado *in vitro* pode não reproduzir a amostra em que o analito está quimicamente ligado aos constituintes da matriz. Assim sendo, na adição do analito à amostra devem-se considerar alguns fatores, tais como: tipo de matriz, concentração de padrão adicionado e tempo de fortificação.²⁰

Em relação ao efeito de matriz já foi previamente observado que com a curva por adição não houve efeito da matriz, pois a sensibilidade da curva foi similar quando comparada com a curva com solvente.

O procedimento de preparo do sedimento foi baseado no trabalho descrito por Liu e colaboradores (2007).²¹ Este preparo consistiu em extrair exaustivamente uma amostra de sedimento de forma a garantir que nenhum biomarcador estivesse presente antes da adição do padrão. Segundo os autores, após a descontaminação parte da matéria orgânica, que é responsável pela interação com os analitos é extraída, porém ácidos húmicos e fúlvicos permanecem e ainda podem promover a interação com os

analitos adicionados neste material. Embora esses ácidos também possam ser alterados durante a extração, o que fará com que a interação do biomarcador com a matriz não seja mesma do que matriz sem ser extraída, também pode ocorrer entre os compostos presentes na matriz descontaminada e os analitos adicionados interações como ligações de hidrogênio, íon-dipolo e Van der Waal's. Por isso, espera-se que de alguma forma, ocorra à interação dos compostos adicionados com o sedimento extraído.²¹ Com o objetivo de verificar a influência do tempo de contato entre os analitos e a matriz foram realizados 3 experimentos utilizando diferentes tempo de contato antes de realizar a extração dos compostos. Além disso, os ensaios de adição e recuperação têm como objetivo avaliar as possíveis perdas de analitos ao longo do processo, uma vez que este envolve um grande número de etapas, tais como agitação, centrifugação, e concentração sob fluxo de nitrogênio.

Os resultados de recuperação para o tempos de interação de 1 h, 24h e 7 dias, com os respectivos desvios padrões obtidos para os hidrocarbonetos alifáticos encontram-se apresentados na figura 3.

Figura 3. Valores de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos (n=3), para o ensaio de adição e recuperação dos hidrocarbonetos alifáticos (250 ng mL⁻¹) após tempo de contato de 1 h, 24h e 7 dias

De maneira geral é possível observar que para os três tempos de interação, os resultados de recuperação são bem semelhantes e encontram-se entre 70-110%, sendo considerados satisfatórios. Os intervalos de recuperação aceitáveis descrito na literatura para a determinação de compostos orgânicos traço, em geral, devem estar na faixa de 70-120%.^{13,20,22} Em relação às diferenças de recuperação na classe de hidrocarbonetos estudados cabe explicar que no gráfico estes estão organizados em ordem crescente de massa molar, o que confere uma diminuição da volatilidade da esquerda (C_{14}) para a direita (C_{30}). De maneira geral, observam-se melhores resultados de recuperação para os compostos de cadeia carbônica entre (C_{16} - C_{24}) em relação ao composto C_{14} . A adsorção dos ácidos aos sedimentos pode ser influenciada pelo tamanho da cadeia, ou seja, ácidos menores podem ser adsorver mais e serem recuperados em menor quantidade. Outro fator que pode ter influenciado na menor recuperação foi a perda por volatilidade, sendo este fato mais provável, do que a maior adsorção de C_{14} , como pode ser observado pelos valores de recuperação para

os três tempos, não vou diferença significativas na recuperação, indicando que no tempo de contato estudado não houve adsorção significativa. A partir do composto C_{26} até o C_{30} a recuperações diminuem, possivelmente em função de problemas de interação dos compostos com a coluna cromatográfica em função do sangramento, que interfere na recuperação dos compostos.

Para os ácidos carboxílicos, os ensaios de adição e recuperação, além de avaliar as possíveis perdas de analitos ao longo do processo de extração e pré-concentração das amostras, teve como objetivo, verificar se a reação de esterificação foi eficiente para todos os ácidos adicionados. Além disso, permitiu também avaliar se estes foram quantitativamente removidos na etapa de separação da fase aquosa da fase orgânica que ocorre após o término da reação de esterificação.

Os resultados de recuperação para o tempos de interação de 1 h, 24 h e 7 dias, com os respectivos desvios padrões obtidos para os ácidos carboxílicos encontram-se apresentados na figura 4.

Figura 4. Valores de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos ($n=3$), para o ensaio de adição e recuperação de ácidos carboxílicos (250 ng mL^{-1}) após tempo de contato de 1 hora, 24h e 7 dias

Os esteróis e os álcoois passaram por processo de derivatização com BSTFA, e foram determinados na forma de trimetilsililésteres, e embora não tenha sido feita nenhuma otimização nesta etapa, uma vez que esse processo já é de uso rotineiro

no laboratório, os ensaios de adição e recuperação serviram para demonstrar que os compostos foram convertidos na sua forma silanizada de maneira satisfatória, conforme podemos observar na figura abaixo.

Figura 5. Valores de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos ($n=3$), para o ensaio de adição e recuperação dos esteróis, álcoois e cetona (250 ng mL^{-1}) após tempo de contato de 1 hora, 24h e 7 dias

Em relação aos tempos de contato, foi aplicado o teste t para comparação entre médias, e os valores de recuperação, considerando um nível de confiança de 95%, não diferem estatisticamente. Desta forma, foi escolhido o tempo de contato de 1 hora.

Em relação aos níveis de concentração, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de

interesse. Isso foi feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de trabalho^{13,22}.

Os resultados de recuperação para as concentrações de 25, 100 e 500 ng mL^{-1} para os hidrocarbonetos alifáticos (Figura 6), ácidos graxos (Figura 7), esteróis, octadecanona e álcoois (Figura 8) estão apresentados abaixo.

Figura 6. Porcentuais de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos (n=3), para o ensaio de adição e recuperação de hidrocarbonetos alifáticos

Figura 7. Porcentuais de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos (n=3), para o ensaio de adição e recuperação dos ácidos graxos

Figura 8. Percentuais de recuperação (%) com respectivos valores de desvio padrão relativos ($n=3$), para o ensaio de adição e recuperação dos esteróis, octadecanona e álcoois

De uma maneira geral para os ácidos graxos observa-se uma menor recuperação para a concentração de 25 ng mL⁻¹. Essa menor recuperação, também foi acompanhada por maiores valores nos desvios, mostrando que a dispersão dos resultados aumentou com a diminuição da concentração. Para os demais biomarcadores não foram observadas diferenças significativas nos valores de desvios e recuperação para as três faixas de concentração.

Para todos os compostos a faixa de recuperação ficou dentro do limite aceitável. Com isso a avaliação do método analítico foi

concluída e este aplicado a extração do biomarcadores geoquímicos.

3.4. Aplicação do método aos perfis sedimentares

3.4.1. Hidrocarbonetos Alifáticos e Ácidos graxos

As porcentagens relativas de hidrocarbonetos individuais extraídos do perfil T₄ estão apresentadas na figura 9.

Figura 9. Porcentagens relativas de hidrocarbonetos alifáticos ao longo do perfil (cm) sedimentar T₄ (amostras com * foram feitas em triplicata)

Em função da pouca quantidade amostra, não foram feitas extrações em triplicata para todos os pontos, apenas para alguns. Essas avaliações serviram para verificar a precisão do método de extração. Em relação ao perfil T₃, nas amostras coletadas os valores de desvio padrão relativo (%) das concentrações dos hidrocarbonetos alifáticos encontrados nas profundidades de 10-15 cm; 110-115 cm; 210-215 cm; 340-345 cm e 450-455 cm variaram de 1,89 a 3,51 %; 1,21 a 4,11 %; 2,19 a 5,89 %; 2,16 a 5,10 %; 1,20 a 3,81 % respectivamente. Todos estes valores encontram-se abaixo dos valores de desvio padrão relativo recomendado em análise de traços, onde valores de até 20% são aceitos.¹⁷

Em relação ao perfil T₄, os valores de desvio para as profundidades 0-5 cm; 106-111 cm; 203-208 cm; 295-300 cm; 369-343 cm ficaram na faixa de 2,49 a 3,98 %; 2,09 a

5,08 %; 2,37 a 6,12%; 3,18 a 7,01% e 1,78 a 6,01 % respectivamente, sendo todos considerados satisfatórios. Desta forma, para ambos os perfis estudados, obteve-se uma boa reprodutibilidade nas extrações.

Em relação ao padrão C_{20d} adicionado ao início da extração, para avaliar sua eficiência e as perdas ao longo do processo, os valores de recuperação obtidos para as profundidades do perfil T₃ e T₄ variam de 68,9 a 95% e 74,6 a 91,0 %. Estes valores encontram-se dentro da faixa aceitável estabelecida entre 70 e 120%.^{13,20,22} Os valores de desvio padrão relativo para o C_{20d} também se encontram todos abaixo do valor de 20% recomendado pelo INMETRO.¹⁷

As porcentagens relativas de ácidos graxos extraídos do perfil T₄ estão apresentadas na figura 10 a seguir.

Figura 10. Porcentagens relativas dos ácidos graxos ao longo do perfil (cm) sedimentar T₄ (amostras com * foram feitas em triplicata)

Em relação ao perfil T₃, nas amostras analisadas os valores de desvio padrão relativo (%) das concentrações dos ácidos graxos encontrados nas profundidades de 10-15 cm; 110-115 cm; 210-215 cm; 340-345 cm e 450-455 cm variaram de 1,58 a 5,80 %; 2,14 a 5,45 %; 4,85 a 7,21 %; 5,87 a 8,20 %; 2,98 a 5,10 % respectivamente. Todos estes valores encontram-se abaixo dos valores de desvio padrão relativo recomendado em análise de traços, onde valores de até 20% são aceitos.¹⁷

Em relação a perfil T₄, os valores de desvio para as profundidades 0-5 cm; 106-111 cm; 203-208 cm; 295-300 cm; 369-343 cm ficaram na faixa de 2,87 a 6,11 %; 4,01 a 5,41 %; 2,98 a 5,10%; 4,01 a 7,01% e 3,05 a 5,98 % respectivamente, sendo todos considerados satisfatórios.

Em relação ao padrão C_{20d} adicionado ao início da extração os valores de recuperação são os mesmo já apresentados nos resultados dos hidrocarbonetos alifáticos uma vez que os compostos foram extraídos no mesmo procedimento.

3.4.2. Considerações preliminares em relação aos biomarcadores encontrados no estudo de reconstrução paleoambiental

Dentre as diversas aplicações dos resultados hidrocarbonetos estes podem utilizados para verificar a presença de MO de origem terrestre, caracterizados por hidrocarbonetos alifáticos com massa molar mais alta, com uma distribuição na faixa de n C₂₇ a C₃₃, ou de origem marinha, onde predominam comprimento de cadeia médio entre n-C₂₃ a n-C₂₇.^{1-5, 23-26}

O perfil T₄ (Figura 9) apresentou uma predominância de cadeias mais longas, atribuídas a origem terrestre. Em relação a MO de origem terrestre, foi possível diferenciar plantas do tipo C₃ (gramíneas) onde predominam cadeias C₃₁ e C₃₃ e plantas do tipo C₄, onde prevalecem cadeias C₂₇ ou C₂₉.²⁷⁻³⁰ Segue abaixo (Figura 11) as porcentagens relativas de C₂₇ ou C₂₉ e C₃₁ e C₃₃ para o perfil T₄.

Figura 11. Porcentagens relativas hidrocarbonetos alifáticos C₂₇ ou C₂₉ e C₃₁ e C₃₃ ao longo do perfil (cm) sedimentar T₄ (amostras com * n=3)

Pode-se verificar uma maior contribuição dos hidrocarbonetos de cadeias C₃₁ e C₃₃, atribuído a plantas do tipo C₃. As mesmas avaliações podem ser aplicadas aos resultados do perfil T₃ para inferir sobre a origem de MO presente.

Os resultados dos ácidos também podem ser associados a diferentes fontes, que incluem bactérias, microalgas, plantas superiores e fauna marinha, cada uma com perfis diferentes de ácidos.^{7,30} Devido a sua maior susceptibilidade a degradação, cerca de 10 vezes³¹, por exemplo, em relação aos hidrocarbonetos alifáticos, alguns ácidos graxos servem mais como indicadores do nível de reciclagem da matéria orgânica, do que da atribuição da sua fonte de origem. Apesar disso, dentro do contexto de reconstruções paleoambientais, desempenham um papel importante fornecendo uma medida relativa da confiabilidade das informações da fonte de outros biomarcadores.^{32,33}

Essas avaliações são preliminares, e os valores de concentração de hidrocarbonetos alifáticos e ácidos graxos, serão utilizados em conjuntos com outros dados de ácidos insaturados, esteróis, alcoóis, além da razão isotópica, razão C/N e datação para inferir sobre informações referentes a tipo de

plantas, organismos e clima na região estudada.

4. Conclusão

Com o presente trabalho foi possível concluir que as condições de trabalho empregadas foram satisfatórias para determinar a concentração dos biomarcadores nos perfis sedimentares estudados. Na etapa de esterificação, foi obtida uma boa recuperação dos compostos orgânicos sem o uso de um solvente clorado, e em menor tempo (6 horas). Além disso, foi possível substituir a reação que era utilizada no laboratório e que envolvia cloreto de acetila, metanol e tolueno, que é bastante exotérmica e requer uma série de cuidados, pela reação com BF₃ metanol, que é mais prática. A opção por trabalhar com o extrato total ao invés de fracionamento, também tornou o trabalho mais rápido, e evitou possíveis perdas dos biomarcadores. Os bons resultados dos ensaios de adição e recuperação mostraram que as condições empregadas na extração, pré-concentração, silanização e esterificação dos compostos, são satisfatória para a determinação dos

compostos. Desta forma, foi possível concluir que a avaliação do método proporcionou obter resultados com níveis elevados de confiabilidade analítica para utilização na determinação dos biomarcadores para a reconstrução paleoambiental.

Com relação às informações obtidas com os resultados dos biomarcadores, foi possível realizar considerações preliminares acerca da origem da MO. Entretanto, um estudo mais aprofundado com base nos demais biomarcadores e demais parâmetros como razão isotópica, razão C/N, contagem de foraminíferos, dados sedimentológicos e datação será realizado para se obter conclusões mais completas sobre a região estudada.

Agradecimentos

A Prof^a Dr^a Carla Bonetti do Laboratório de Oceanografia Costeira por fornecer as amostras, à CAPES pela bolsa de Doutorado, ao INCT-TMCOcean e CNPq processo 304209/2013-9 pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ¹ Bouloubassi, I.; Lipiatou, E.; Saliot, A.; Tolosa, I.; Bayona, J. M.; Albaig, J. Carbon sources and cycle in the western Mediterranean-the use of molecular markers to determine the origin of organic matter. *Deep-Sea Research II* **1997**, *44*, 781. [CrossRef]
- ² Castaneda, I. S.; Schouten, S. A review of molecular organic proxies for examining modern and ancient lacustrine environments. *Quaternary Science* **2011**, *30*, 2581. [CrossRef]
- ³ Zech, M.; Simon, R.; Buggle, B.; Loscher, M.; Zoller, L. Reconstruction of the late Quaternary paleoenvironments of the Nussloch loess paleosol sequence, Germany, using n-alkane biomarkers. *Quaternary Research* **2012**, *78*, 226. [CrossRef]
- ⁴ Kaiser, J.; Ruggieri, N.; Hefter, J.; Siegel, H.; Mollenhauer, G.; Arz, H. W.; Lamy, F. Lipid biomarkers in surface sediments from the Gulf of Genoa, Ligurian sea (NW Mediterranean sea) and their potential for the reconstruction of palaeo-environments. *Deep-Sea Research I* **2014**, *89*, 68. [CrossRef]
- ⁵ Magill, R. C.; Denis, E. H.; Freeman, K. H. Rapid sequential separation of sedimentary lipid biomarkers via selective accelerated solvent extraction. *Organic Geochemistry* **2015**, *88*, 29. [CrossRef]
- ⁶ Volkman, J. K.; Barrett, S. M.; Dunstan, G. A.; Jeffrey, S. W. C₃₀/C₃₂ alkyl diols and unsaturated alcohols in microalgae of the class Eustigmatophyceae. *Organic Geochemistry* **1992**, *18*, 131. [CrossRef]
- ⁷ Volkman, J. K.; Barrett, S. M.; Blackburn, S. I.; Mansour, M. P.; Sikes, E. L.; Gelin, F. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry* **1998**, *29*, 1163. [CrossRef]
- ⁸ Meyers, P. A. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry* **1997**, *27*, 213. [CrossRef]
- ⁹ Eglinton, T. I.; Eglinton, G. Molecular proxies for paleoclimatology. *Earth and Planetary Science Letters* **2008**, *275*, 1. [CrossRef]
- ¹⁰ Taroza, R.; Frena, M.; Madureira, L. A. S. J. Geochemical Markers as a Tool to Assess Sedimentary Organic Matter Sources of the Laguna Estuarine System, South Brazil: Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 2308. [CrossRef]
- ¹¹ Bataglion, G. A.; Puhl, P. R.; Rau, M.; Damatto, S. R.; Madureira, L. A. S. Avaliação de Compostos Lipídicos em Ambiente Anóxico da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista. Virtual de Química*. **2012**, *4*, 474. [CrossRef]
- ¹² Taylor, J. K.; Oppermann, H. V.; Oppermann. *Handbook for the Quality Assurance of Metrological Measurements*, Lewis Publ, 1988.

- ¹³ López, M. I.; Callao, M. P.; Ruisanchez, I. A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach *Analytica Chimica Acta* **2015**, 891, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Lanças, F.; *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, Editora Rima: São Paulo, 9-28, 2004.
- ¹⁵ International standard, ISO/IEC. 17025-General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, **2005**. [[Link](#)]
- ¹⁶ Brito, N. M.; Amarante, J. O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. P. Validação de Métodos Analíticos: estratégia e discussão. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, 13, 129. [[Link](#)]
- ¹⁷ INMETRO, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, revisão 1, 2003. [[Link](#)]
- ¹⁸ Gonzáles, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* **1999**, 48, 729. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Brito, N. M.; Amarante, J. O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M.L. P. Avaliação da Exatidão e da Precisão de Métodos de Análise de Resíduos de Pesticidas Mediante Ensaios de Recuperação *Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2002**, 12, 155. [[Link](#)]
- ²⁰ Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. F.; Melo, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27, 771. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Liu W. H.; Ding B.; Ruan X. M.; Xu H. T.; Yang J.; Liu S. M. Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1163, 304. [[CrossRef](#)]
- ²² U.S. EPA – Environmental Protection Agency – Method 8000 Determinative chromatographic separations, **1996**. [[Link](#)]
- ²³ Madureira, L. A. S.; van Krevel, S. A.; Eglinton, G.; Conte, M. H. Ganssen, G.; van Hinte, J. E.; Ottens, J. J. Late Quaternary high resolution biomarker and other sedimentary climate proxies in a North East Atlantic core. *Late Paleoceanography* **1997**, 12, 255. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Ishiwatari, R.; Yamada, K; Matsumoto, K.; Houtatsu, M.; Naraoka, H. Organic molecular and carbon isotopic records of the Japan Sea over the past 30 kyr. *Organic Geochemistry* **1999**, 30, 367. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Saliot, A.; Parrish, C.; Sadouni, N.; Bouloubassi, I.; Fillaux, J.; Cauwet, G. Transport and fate of Danube Delta terrestrial organic matter in the Northwest Black Sea mixing zone. *Marine Chemistry* **2002**, 79, 243. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Jaffe, R.; Ahmed I.; Rushdi, P. M.; Medeiros, B. R. T. Simoneit. Natural product biomarkers as indicators of sources and transport of sedimentary organic matter in a subtropical river. *Chemosphere* **2006**, 64, 1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Schwark, L.; Zink, K.; Lechtenbeck, J. Reconstruction of postglacial to early Holocene vegetation history in terrestrial Central Europe via cuticular lipid biomarkers and pollen records from lake sediments. *Geology* **2002**, 30, 463. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Zhang, Z.; Zhao, M.; Eglinton, G.; Lu, H.; Huang, C. Leaf wax lipids as paleovegetational and paleoenvironmental proxies for the Chinese Loess Plateau over the last 170 kyr. *Quaternary Science Reviews* **2006**, 20, 575. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Zech, M.; Buggle, B.; Leiber, K.; Marković, S.; Glaser, B.; Hambach, H.; Huwe, B.; Stevens, T.; Sumegi, P.; Wiesenber, G.; Zoller. Reconstructing Quaternary vegetation history in the Carpathian Basin, SE Europe, using n-alkane biomarkers as molecular fossils *Quaternary Science Journal* **2002**, 58, 148. [[CrossRef](#)]