



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FRANCISCO FERREIRA MORASSUTTI

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS APLICADOS À COLETA DO CORAL INVASOR *Tubastraea coccinea*
DA RESERVA BIOLÓGICA MARINHA DO ARVOREDO**

Florianópolis
2025

FRANCISCO FERREIRA MORASSUTTI

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS APLICADOS À COLETA DO CORAL INVASOR *Tubastraea coccinea*
DA RESERVA BIOLÓGICA MARINHA DO ARVOREDO**

Relatório apresentado ao Departamento de
Química da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Orientador: Dr. Luciano Vitali

Coorientador: Dr. Marcelo Schuler Crivellaro

Florianópolis
2025

Francisco Ferreira Morassutti

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE
AMOSTRAS APLICADOS À COLETA DO CORAL INVASOR *Tubastraea coccinea*
DA RESERVA BIOLÓGICA MARINHA DO ARVOREDO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso Bacharelado em Química

Florianópolis, 10 de Julho de 2025



Documento assinado digitalmente
Miguel Soriano Balparda Caro
Data: 11/07/2025 08:15:23-0300
CPF: ***.282.530-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do curso

Banca examinadora



Documento assinado digitalmente
LUCIANO VITALI
Data: 11/07/2025 08:32:44-0300
CPF: ***.529.060-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Luciano Vitali.
Orientador



Documento assinado digitalmente
MARCELO SCHULER CRIVELLARO
Data: 11/07/2025 08:31:07-0300
CPF: ***.950.710-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Marcelo Schuler Crivellaro.
Coorientador



Documento assinado digitalmente
TATIANE DE ANDRADE MARANHÃO
Data: 11/07/2025 14:04:05-0300
CPF: ***.638.324-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof.^a Dr.^a Tatiane de Andrade Maranhão
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Daniel Lázaro Gallindo Borges
Data: 11/07/2025 12:09:59-0300
CPF: ***.794.969-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025

Dedico este trabalho a Fábio Negrão,
visitar novamente o Coral Vivo mudou
minha perspectiva de carreira, a
comunidade científica sente sua falta.

Agradecimentos

Agradeço aos meus parentes, Nicholas, Nena e Helen, que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho e me deram apoio, financeiro e moral para seguir em frente com este projeto.

À minha namorada, Caroline, que esteve ao meu lado desde o meu primeiro dia na universidade e que assistiu meu encantamento ao reencontrar o mundo dos corais, assim como meu desespero quando eu era confrontado com subseqüentes eventos de branqueamentos ocorrendo na costa brasileira.

A meus amigos, Vinícius, Fernanda, Gustavo, Lincoln, Christopher, Johnatan, Chantal, Steffany, Sabrina, Victor e Kevin, por ouvirem minhas incessantes palestras sobre o coral-sol, espero que hoje sejamos uma comunidade grande o suficiente para organizar campanhas de manejo na REBIO Arvoredo juntos.

À Bárbara Segal, por abrir o espaço de seu laboratório e me ajudar a encontrar um projeto de TCC em química dentro do trabalho do PACS Arvoredo. Sou muito orgulhoso de poder trabalhar em seu laboratório.

Aos técnicos da Central de Análises do Departamento de Química, nominalmente a Laís, Amanda, Paulo e Glauber, cada um contribuiu com a execução deste trabalho de forma imprescindível.

À equipe do LabAR, que me apoiou e viu este trabalho se desenvolver até onde chegou. Não posso agradecer o suficiente aos pesquisadores deste laboratório, que são capazes de conter a invasão de coral-sol na REBIO Arvoredo dentro e fora da água.

Aos meus orientadores, Luciano Vitali e Marcelo Crivellaro, que forneceram perspectiva, experiência, amostras e um laboratório para que este projeto se tornasse possível.

Ao LAMEB, pelo fornecimento de equipamento essencial para o projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que mesmo em contínuo processo de sucateamento, fornece formação, estrutura e liberdade para que projetos como este possam florescer. O espaço da universidade pública é fundamental para o desenvolvimento de ciência brasileira.

Por que no rio tem pato comendo lama?
(Chico Science e Nação Zumbi – Rios
Pontes e Overdrives, 1994)

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1: Colônia de Tubastraea coccinea na REBIO Arvoredo.....</u>	<u>3</u>
<u>Figura 2: Mapa com estados do Brasil com relatos de invasão do coral-sol coloridos em laranja.....</u>	<u>4</u>
<u>Figura 3: Limites da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo tracejado em verde.....</u>	<u>5</u>
<u>Figura 4: Estruturas dos 4 principais ácidos graxos identificados nas investigações do PACS.....</u>	<u>7</u>
<u>Figura 5: Rearraanjo de McLafferty no fracionamento por impacto de elétrons.....</u>	<u>16</u>
<u>Figura 6: Cromatograma das análises de FAMES. Eixo x: tempo de retenção (min); eixo y: intensidade relativa do sinal.....</u>	<u>19</u>
<u>Figura 7: Relatório AGREEp rep de química analítica verde para a coleta de amostras: (A) NL; (B) GS; (C) Metanol.....</u>	<u>22</u>
<u>Figura 8: Relatório AGREEp rep de química analítica verde para o preparo de amostras, da extração à análise.....</u>	<u>23</u>

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1: Avaliação da combinação de métodos de coleta e arquivamento de amostras de corais.....</u>	<u>8</u>
<u>Tabela 2: Valores de razão massa/carga (m/z) e tempo de retenção (TR) dos analitos majoritários.....</u>	<u>18</u>
<u>Tabela 3: Média das razões das áreas dos picos dos analitos e do padrão interno (A_{FAME} / A_{PI}).....</u>	<u>20</u>
<u>Tabela 4: Tabela de ANOVA para a comparação dos três métodos de coleta.....</u>	<u>21</u>

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ANOVA: *Analysis Of Variance* (Análise de Variância);

REBIO Arvoredo: Reserva Biológica Marinha do Arvoredo;

LabCroMS: Laboratório de cromatografia e Espectrometria de Massas

T. coccinea: *Tubastraea coccinea*;

FAME: *Fatty Acid Methyl Esther* (éster metílico de ácido graxo);

DPA: Ácido docosapentaenóico

EPA: Ácido (5,8,11,14,17 – Z) eicosapentaenóico;

ARA: Ácido araquidônico;

GC-MS: *gas chromatography coupled with mass spectrometer* (cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas);

m/z: relação massa/carga;

HPLC: *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance);

NL: amostras preservadas com nitrogênio líquido;

GS: amostras preservadas com gelo seco;

MeOH: amostras preservadas com metanol.

RESUMO

1 Recifes brasileiros estão sendo invadidos pelo coral exótico *Tubastraea coccinea*
2 conhecido por coral-sol. Estes corais ocupam a superfície dos recifes e impedem que
3 espécies nativas tenham acesso ao substrato onde se fixam, causando graves danos
4 à biodiversidade marinha local. Para estudar a invasão, grupos de pesquisadores de
5 ciências do mar utilizaram métodos para avaliar padrões deste animal, dentre elas a
6 determinação de ácidos graxos. Nessa metodologia analítica, se utiliza metanol para
7 armazenar as amostras logo após a coleta e manter suas propriedades químicas até
8 as determinações no laboratório. Visando uma metodologia que contribua com a
9 Química Verde, este trabalho teve como propósito avaliar alternativas para
10 armazenamento das amostras com uso de nitrogênio líquido e gelo seco. Os métodos
11 alternativos foram comparados com armazenamento em metanol, o qual é empregado
12 atualmente pelo grupo de pesquisa da invasão na Reserva Biológica Marinha do
13 Arvoredo. As amostras foram secas por meio de liofilização, as frações lipídicas
14 extraídas e derivatizadas em ésteres metílicos de ácidos graxos antes das
15 determinações por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. As
16 razões de áreas de pico médias dos analitos majoritários, nos corais, foram
17 comparadas por meio de ANOVA. Os métodos também foram avaliados em seu valor
18 verde por meio da ferramenta de química analítica verde AGREEprep®. Os resultados
19 obtidos demonstraram que o método de coleta em gelo seco apresentou um melhor
20 ganho dos critérios de química analítica verde, apesar de ser instável nos resultados
21 avaliados estatisticamente, consequência atribuída ao excesso de etapas entre a
22 coleta e a análise.

23 **Palavras-chave:** química verde, ácidos graxos, coral-sol, Ilha do Arvoredo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1	CORAL-SOL.....	3
2.2	LIPÍDIOS.....	6
2.3	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	7
2.4	AVALIAÇÃO DE CARÁTER VERDE.....	9
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	OBJETIVO GERAL.....	11
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4	METODOLOGIA.....	12
4.1	MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES.....	12
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	12
4.3	SOFTWARES.....	13
4.4	COLETA E PREPARO DE AMOSTRA.....	13
4.4.1	Amostragem e coleta da amostra.....	13
4.4.2	Acondicionamento das amostras.....	13
4.4.3	Congelamento, fragmentação e liofilização das amostras.....	14
4.4.4	Extração da fração lipídica.....	14
4.4.5	Esterificação da fração lipídica da amostra.....	15
4.5	PARÂMETROS GC-MS.....	16
4.6	TRATAMENTO DE DADOS.....	16
4.7	QUÍMICA ANALÍTICA VERDE.....	17
4.8	TRATAMENTO DE RESÍDUOS E SEGURANÇA NO LABORATÓRIO.....	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
5.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	18
5.2	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	20
5.3	CRITÉRIO VERDE.....	22
6	CONCLUSÃO.....	24

1 1 INTRODUÇÃO

2 No Brasil, o gênero de corais comumente chamado coral-sol está invadindo os
3 ambientes recifais da costa, expulsando espécies nativas ao ocupar recifes, costões,
4 cavernas, rochas e naufrágios. Na Reserva Marinha Biológica do Arvoredo (REBIO
5 Arvoredo) se encontra a invasão mais austral da espécie *Tubastraea coccinea* na
6 costa oeste do oceano Atlântico.

7 Para lidar com os múltiplos aspectos estudados desta invasão biológica na
8 REBIO Marinha do Arvoredo, foi criado o Projeto de Ação de Prevenção e Controle do
9 coral-sol na REBIO Arvoredo e Entorno (PACS Arvoredo), um projeto multidisciplinar
10 que tem como objetivo final o controle e a erradicação do coral-sol na REBIO. Dentro
11 da frente de pesquisa deste projeto são conduzidas determinações do conteúdo de
12 ácidos graxos dos corais. Compreender o conteúdo de lipídios dos corais é uma forma
13 de se acompanhar o estado de saúde destes animais e tomar as medidas adequadas
14 de controle da invasão com auxílio dos dados obtidos.

15 As coletas das amostras de corais são realizadas na REBIO Arvoredo. Para
16 que a determinação seja realizada por cromatografia gasosa acoplada a
17 espectrômetro de massas (GC-MS), na Central de Análises do Departamento de
18 Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), é necessário armazenar
19 as amostras de corais de forma a não degradar o seu conteúdo, mantendo os
20 resultados mais fiéis ao estado dos corais quando coletados na REBIO Arvoredo. O
21 Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LabCroMS) submerge os
22 corais em metanol como forma de conservar as amostras no transporte para a
23 universidade, portanto, um frasco de solvente é transportado e aberto na embarcação
24 para o acondicionamento dos corais.

25 Metanol é um solvente com potencial de intoxicação e causa danos
26 irreversíveis a saúde, como cegueira. Para além do fator de risco a segurança, o seu
27 uso como conservante das amostras é único, portanto, todo o volume utilizado para
28 esta etapa necessita de descarte e tratamento posterior adequado. Alternativamente,
29 metodologias de preservação por resfriamento rápido, como a acondicionamento em
30 nitrogênio líquido ou gelo seco não produzem vapores tóxicos ou resíduos e não
31 apresentam o risco de perda dos analitos no material usado como meio de

1 preservação. Associado ao uso destas metodologias, a preservação de longo prazo
2 das amostras pode ser melhorada por uso de *ultrafreezers* e liofilização das amostras,
3 automatizando estas etapas. Os fatores de toxicidade, uso único de substâncias e
4 automatização de processos, podem ser avaliados pelo critério de química analítica
5 verde a partir do uso de ferramentas que calculam o valor verde de procedimentos
6 analíticos.

7 A perspectiva do presente trabalho é reproduzir metodologias de coleta e
8 preservação de corais e compará-las, com auxílio de ANOVA, a partir dos resultados
9 da determinação de ácidos graxos majoritários das amostras e pelo uso de
10 calculadora do valor verde dos métodos.

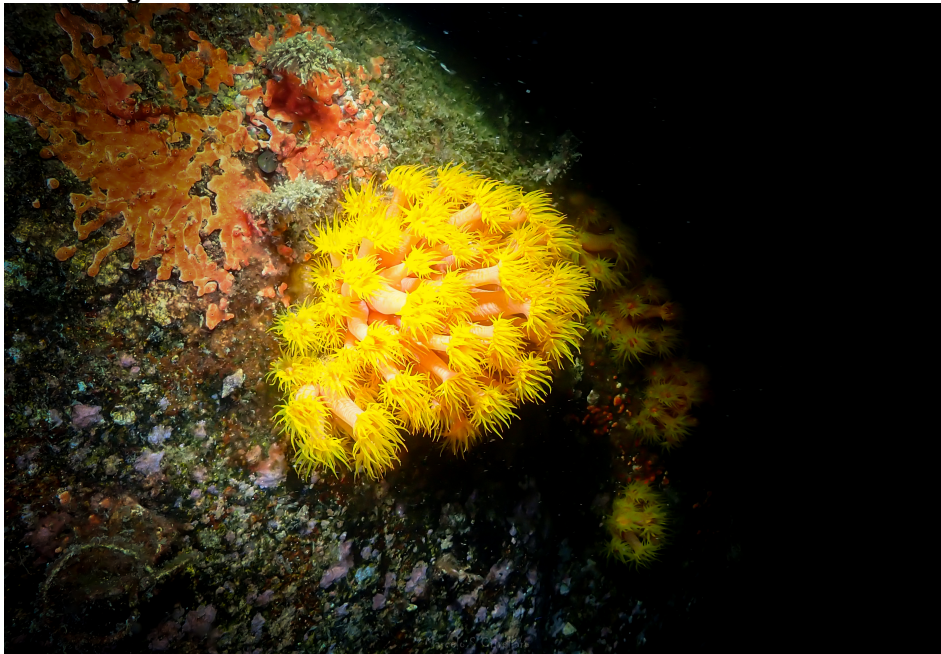
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CORAL-SOL

Corais são animais cnidários capazes de construir recifes, grandes estruturas, calcárias ou rochosas, que abrigam uma vasta biodiversidade, servindo como fonte de abrigo e alimentação para vidas marinhas em variadas fases da vida. Neste filo, se encontram os corais pétreos, subclasse *Hexacorallia*, estes corais são capazes de construir esqueletos calcários contribuindo à construção de recifes.

Coral-sol é o nome popular dado aos corais do gênero *Tubastraea* (Figura 1). Estes corais não fazem fotossíntese por meio da simbiose com zooxantelas (azooxantelados), eles são nativos dos oceanos Índico e Pacífico, vivendo em águas rasas em recifes de corais e costões rochosos. As espécies *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* são as que representam a maior parcela das invasões deste gênero no oeste do Oceano Atlântico. Os riscos da invasão, apresentados por estas espécies são elevados, consequentes da redução de biodiversidade em recifes invadidos e, portanto, causando danos ambientais, econômicos e sociais às populações dependentes do mar ^{1,2}.

Figura 1: Colônia de *Tubastraea coccinea* na REBIO Arvoredo.



Fonte: Marcelo S. Crivellaro.

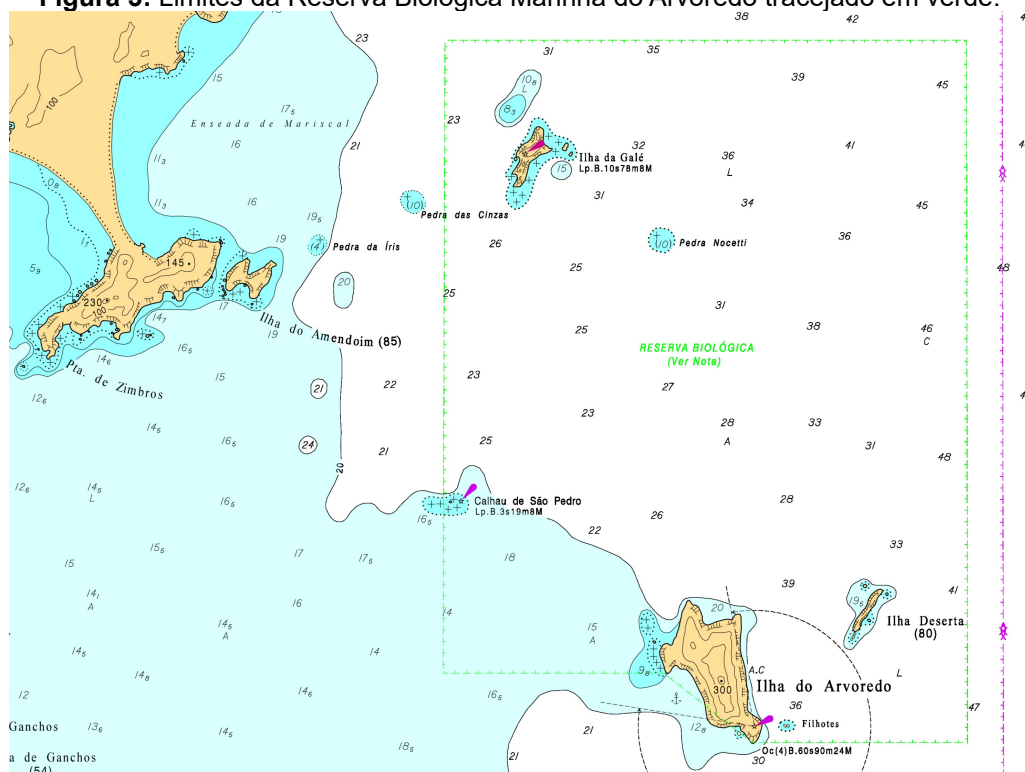
A map of Brazil with its state boundaries outlined. The states of Rio de Janeiro, São Paulo, and Minas Gerais are highlighted in orange. The remaining states are shown in light gray.

8 Castro e Pires (2001)⁴ relataram que o coral-sol já estava presente em águas
9 brasileiras desde a década de 1980, inicialmente fixando-se em plataformas
10 petroleiras e, posteriormente, alocando-se em costões rochosos ao sul do Rio de
11 Janeiro. As primeiras regiões invadidas foram as de fluxo mais intenso de
12 embarcações, como a baía da Ilha Grande e a Bacia de Campos, ambas no RJ.
13 Atualmente a invasão do coral-sol se estende desde o petroleiro naufragado SS

A REBIO Arvoredo (Figura 3) foi invadida exclusivamente pelo *T. coccinea*, com primeiro registro em 2012 por Mantelatto (2012)⁷. Até o ano de 2025, não há relatos de novas invasões ao sul da REBIO que, portanto, é a invasão mais austral da costa Oeste do Atlântico.

O *Tubastraea coccinea* é um coral escleractíneo com características de um organismo *r*-estrategista, portanto, a maior parte de sua dedicação energética é para a recuperação de perturbações, crescimento e maturação aceleradas e reprodução assexuada e sexuada. O sucesso da invasão do coral-sol está atribuído a esta estratégia de sobrevivência. O objetivo de se estudar o conteúdo lipídico destes corais é a busca por marcadores de sua estratégia de sobrevivência, principalmente àqueles associados a padrões reprodutivos ^{2,5,8}.

Figura 3: Limites da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo tracejado em verde.



Fonte: Adaptada de Centro de Hidrografia da Marinha, 2023

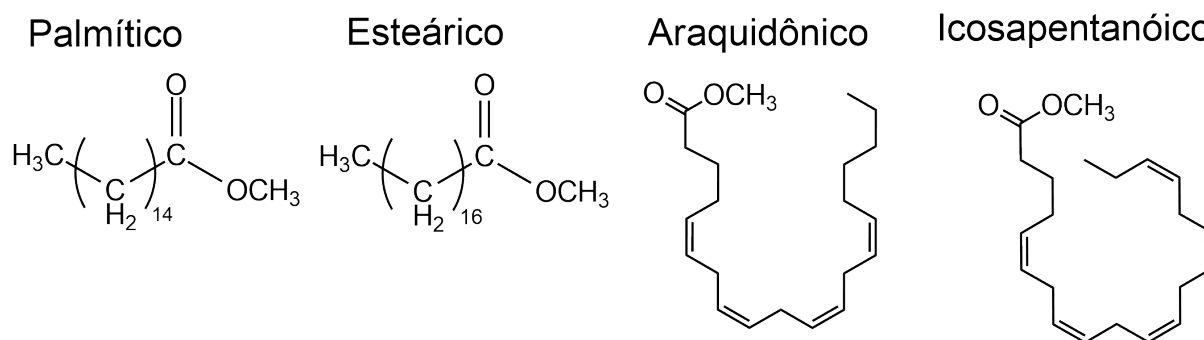
2.2 LIPÍDIOS

Os lipídios são a principal forma de armazenamento de energia dos corais⁹. Desde a década de 1990, pesquisadores monitoram o conteúdo lipídico de corais, observando padrões reprodutivos, ou fatores abióticos como temperatura e exposição a luz associadamente. Entretanto, estes fatores não afetam o *T. coccinea* da mesma forma que os corais observados por Ward (1995)¹⁰, Figueiredo *et al.* (2012)¹¹ e Viladrich *et al.* (2016)¹². Isso se deve aos corais do gênero *Tubastraea* terem a obtenção de nutrientes estritamente externa (heterotróficos), em razão de não possuírem simbiose com organismos fotossintetizadores em seu tecido (azooxantelados), e esta condição se reflete no seu perfil lipídico^{2,13}.

Desde o início do ano de 2023 o PACS Arvoredo têm empregado uma metodologia adaptada de Viladrich *et al.* (2016)¹² para analisar o conteúdo lipídico de corais retirados da REBIO Arvoredo. As amostras são analisadas por GC-MS, observando a presença de 49 ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*), produtos de reações de esterificação.

Latyshev *et al.* (1991)¹³ analisaram FAMES de *T. coccinea* da ilha de Aldabra nas Ilhas Seychelle. Os resultados deste trabalho apontaram a predominância de éster metílico de ácido oleico (18:1 Δ^9). Outros FAMES relevantes nos resultados deste trabalho são os de ácidos palmitoleico (16:0), esteárico (18:0), icosapentanóico (EPA) (20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$), docosapentanóico (DPA) (22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$), araquidônico (ARA) (20:4 $\Delta^{7,10,13,16}$) e docosatetraenóico (22:4 $\Delta^{9,12,15,18}$)^{13,14}. Os resultados obtidos pelo trabalho do PACS Arvoredo até o momento investigaram todos os FAMES mencionados, porém DPA e ácido docosatetraenóico foram identificados apenas qualitativamente. Figueiredo (2014)¹⁵ realizou um procedimento semelhante às práticas mais recentes de análise lipídica de corais, a janela de FAMES observada, com o objetivo de comparar os valores entre espécies de corais, é menor do que a do PACS Arvoredo, mas reforça os resultados de Latyshev *et al.* (1991), com a presença majoritária de FAMES de DPA, docosatetraenóico, ARA e EPA, cujas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4: Estruturas dos 4 principais ácidos graxos identificados nas investigações do PACS.



Fonte: autoral.

1 FAMES insaturados que apresentam tipicamente três ou mais insaturações e
 2 cadeias de 20 ou mais carbonos, são marcadores de uma dieta baseada em cadeias
 3 tróficas com fitoplânctons, porque animais não sintetizam estes compostos
 4 internamente, já os ácidos graxos saturados são obtidos por transformações de
 5 cadeias insaturadas e são usados para armazenamento de energia na forma de
 6 lipossomos (vesículas formadas por uma bicamada de lipídios) ¹⁵.

7 2.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

8 Em análises químicas de amostras biológicas é crucial a preservação das
 9 amostras para obter resultados mais fiéis ao estado da amostra no momento que foi
 10 coletada. Quando expostos a perturbações e estresse continuado, o conteúdo lipídico
 11 do coral-sol pode se tornar instável por processos oxidativos e enzimáticos no
 12 organismo do coral. Considerando esta situação, após o procedimento de retirada das
 13 colônias de corais do mar, pesquisadores devem se preocupar com a preservação das
 14 amostras, evitando degradação e perda dos lipídios destas colônias ^{9,16,17}.

15 A metodologia empregada pelo PACS Arvoredo é a submersão dos corais em
 16 metanol ^{16,17}, com a amostra sendo mantida no solvente em temperatura ambiente até
 17 o retorno ao laboratório de análise da universidade, onde a amostra é entregue ao
 18 corpo técnico da Central de Análises do Departamento de Química.

19 Segundo Vega Thurber *et al.* (2022) ¹⁶, as formas de manuseio dos corais são
 20 separadas em duas categorias, asséptica e não-asséptica. A separação se dá na
 21 possibilidade de contaminação e degradação que podem ocorrer na amostra. O uso
 22 de metanol a temperatura ambiente, é considerado um método não-asséptico, já que o

álcool também é utilizado como fase extratora em práticas similares, podendo promover perdas do analito, e por manter a amostra a temperatura ambiente ou reduzida em geladeira^{12,15-19}. Comparativamente, a preservação com uso de nitrogênio líquido a curto prazo, associado com uso de *ultrafreezer* como técnica de longo prazo é considerado um método asséptico e uma forma adequada de se preservar as amostras¹⁶. Outro método asséptico é o uso de gelo seco para a preservação de curto prazo de amostras de corais. A avaliação dos métodos de preservação e arquivamento de amostras de corais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Avaliação da combinação de métodos de coleta e arquivamento de amostras de corais.

Análise de lipídios totais e de classes de lipídios												
Método de preservação após coleta do coral	Metanol				Gelo seco (-78 °C)				Nitrogênio líquido (-196 °C)			
Método de arquivamento do coral	C	Rf	Ta	E	C	Rf	Ta	E	C	Rf	Ta	E
Avaliação do método	N	N	N	N	O	N	N	?	O	N	N	?
Legendas dos métodos de arquivamento: C: Congelado em <i>freezer</i> ou <i>ultrafreezer</i> Rf: Resfriado em geladeira Ta: Temperatura ambiente E: Estufa a temperaturas acima de 60 °C					Legendas das avaliações dos métodos: N: método inadequado; ?: Não há literatura propondo o método; O: Método ótimo de preservação e arquivamento;							

Fonte: baseada na Figura 2 de VEGA THURBER et al. 2022.

Após a etapa de coleta das amostras de colônias de coral, trabalhos de análise lipídica destes animais empregam algum método de secagem das amostras, dentre elas o uso de fluxo de ar, ou nitrogênio, aquecimento em estufa ou liofilização. O uso de liofilização é considerado o método mais apropriado para a secagem de corais para a determinação de FAMES, já que é um método mais eficiente para a eliminação de água na amostra, prolongando o tempo de preservação da amostra ao eliminar o meio de ocorrência de degradação e perda dos analitos¹⁰⁻²⁰.

O uso de metanol para arrefecer os corais pode interferir na quantificação de lipídios polares, considerando que os protocolos de extração de lipídios mais comuns na literatura empregam fase extratora de metanol e diclorometano^{10-14,16-19}.

Como última etapa antes da análise, os lipídios extraídos podem ser derivatizados em FAMES, assim melhorando a volatilidade dos compostos, sua estabilidade em altas temperaturas e o melhor rendimento de ionização para a análise do espectrômetro de massas. Este procedimento costuma se tratar de uma esterificação de Fischer, ou uma transesterificação de triglicerídeos presentes no tecido do coral^{9,12,21}. Para a análise de lipídios do tecido de corais, métodos cromatográficos são os mais usuais, podendo ser cromatografia líquida de alta performance (HPLC), ou cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), a técnica mais frequentemente empregada nas pesquisas referenciadas neste trabalho^{9,11-13,15-19}. Com isso, o emprego do GC-MS pode ser considerado adequado para análise de lipídios, a partir de sua capacidade de detecção simultânea de vários analitos em matrizes complexas^{9,22}.

2.4 AVALIAÇÃO DE CARÁTER VERDE

Com o objetivo de criar uma ferramenta métrica para práticas de química verde, Wojnowski *et al.* (2022)²³ desenvolveram o software AGREEprep®, nele é possível decompor as etapas do experimento, avaliando o impacto sustentável da prática, atrelando diferentes magnitudes a cada parte do procedimento.

O programa contém 10 diferentes critérios para avaliar o caráter verde da metodologia analítica a ser empregada, sendo eles:

- Local de preparo da amostra, propondo a redução do transporte e necessidade de meios de preservação;
- Redução do consumo solventes e reagentes problemáticos, reduzindo efeitos de toxicidade e perigo, como é o caso do uso de ácidos e bases para derivatizações;
- Emprego de materiais sustentáveis, reutilizáveis e renováveis, propõe o uso de materiais que possam ser reutilizados após o emprego de procedimentos de regeneração e fabricados com métodos sustentáveis;
- Minimização da produção de resíduos, tais como solventes para extrações, reagentes para processos de derivatização e massas de amostra contaminadas por substâncias tóxicas;

- 1 • Minimização de quantidade de amostra, consequentemente reduzindo o
- 2 consumo de materiais em etapas de preparo de amostra e capacitando o
- 3 procedimento a ser automatizado;
- 4 • Maximizar a produção de amostras em função do tempo de preparo, de forma
- 5 a reduzir o consumo de energia e exposição a materiais problemáticos,
- 6 processos automatizados são favorecidos por este método;
- 7 • Integrar etapas de preparo de amostra e promover automação do
- 8 procedimento, portanto, reduzindo o efeito de perda de material consequente de
- 9 procedimentos com muitas etapas e melhorando a reprodutibilidade;
- 10 • Minimizar o consumo de energia por amostra, favorecendo preparos
- 11 simultâneos
- 12 • Uso de opções verdes de análise, dando preferência para métodos com baixo
- 13 consumo de energia, operação simplificada e que possam ser levados ao local
- 14 de coleta;
- 15 • Redução da exposição de riscos ao analista baseada na quantidade de
- 16 pictogramas a que os materiais utilizados no procedimento somam ²³.

17 Metanol é um álcool, de fórmula H_3COH , historicamente utilizado em

18 processos de preservação, porém este solvente tem o potencial de causar inflamação

19 do estômago e do pâncreas, assim como cegueira permanente. Doses acima de 100

20 mg/kg de metanol são consideradas potencialmente danosas. Relatos de intoxicações

21 por metanol frequentemente ocorrem simultaneamente sobre algumas populações,

22 por inalação e por absorção cutânea ^{24, 25}.

23 A redução do manuseio e exposição da tripulação embarcada e dos analistas

24 ao metanol, representa um avanço na metodologia de trabalho usada para o estudo de

25 FAMEs, reduzindo o risco de intoxicação e de incêndios causados por vapores do

26 solvente. O uso de materiais como nitrogênio líquido e gelo seco, deve ser uma

27 prioridade de trabalhos semelhantes, prezando pela segurança dos operadores

28 envolvidos, redução de tratamentos destes materiais e melhora na qualidade do

29 preparo de amostra consequente ^{16,24,25}.

1 **3 OBJETIVOS**

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar o emprego de nitrogênio líquido e gelo seco como métodos alternativos
4 de acondicionamento de amostras de *Tubastraea coccinea* da Reserva Biológica
5 Marinha do Arvoredo visando a determinação de FAMES por GC-MS.

6 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7 • Coletar amostras de coral-sol *Tubastraea coccinea* da Reserva Biológica
- 8 Marinha do Arvoredo empregando o acondicionamento com nitrogênio líquido e
- 9 gelo seco para preservação das amostras;
- 10 • Realizar o preparo das amostras incluindo moagem, liofilização e extração da
- 11 fração lipídica do coral sol *Tubastraea coccinea*;
- 12 • Realizar a saponificação e a esterificação da fração lipídica do coral sol
- 13 *Tubastraea coccinea* para obter o extrato esterificado;
- 14 • Analisar os extratos esterificados via GC-MS e avaliar a razão das áreas dos 8
- 15 ésteres de ácidos graxos com as áreas do padrão interno tridecanoato de metila;
- 16 • Comparar estatisticamente os resultados de razão das áreas dos 8 ésteres de
- 17 ácidos graxos obtidos pelas diferentes formas de acondicionamento em relação ao
- 18 emprego de metanol;
- 19 • Avaliar o caráter verde das metodologias empregando nitrogênio líquido e gelo
- 20 seco para preservação das amostras e comparar com o método que utiliza metanol.

1 **4 METODOLOGIA**

2 4.1 MATERIAIS, SOLUÇÕES E REAGENTES

3 Para a coleta de corais, foram utilizados 3 kg de gelo seco, adquiridos no dia
4 anterior à coleta com a empresa CARBO ICE® (São José, SC, Brasil) e 1,5 L de
5 nitrogênio líquido obtido na Central de Análises do Departamento de Química da
6 UFSC, também no dia anterior.

7 Os solventes utilizados foram de grau analítico (P.A.). O presente trabalho
8 empregou diclorometano Synth (Diadema, SP, Brasil) e metanol (MeOH) Fmaia (Belo
9 Horizonte, MG, Brasil), solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) Neon
10 (Suzano, SP, Brasil) ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) previamente preparada e solução esterificante de
11 metanol e ácido sulfúrico concentrado (Sumaré, SP, Brasil) 20:1 (v:v). Para a injeção
12 no GC-MS, os produtos da reação foram solubilizados em hexano (Merck – Barueri,
13 SP, Brasil) padrão cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para as
14 determinações por GC-MS, foi usado como padrão interno (PI) tridecanoato de metila
15 em hexano grau HPLC 500 mg L^{-1} (Sigma).

16 O gelo seco foi mantido em uma caixa de isopor de 1,5 L. As amostras
17 coletadas para este método foram mantidas em sacos culinários de silicone da
18 companhia Daiso Industries Co. Ltd. (Florianópolis, SC, Brasil).

19 O nitrogênio líquido foi mantido em copo térmico de 1,5 L da marca MODUS®.
20 O material dos copos é aço 304, uma liga austenítica de aço inoxidável. Para evitar a
21 evaporação extensiva do nitrogênio, uma tampa de isopor foi moldada a partir de
22 esferas sólidas do material, compradas em papelaria. A caixa de isopor com gelo seco
23 e os copos térmicos foram mantidos dentro de uma caixa térmica plástica (*cooler*).

24 As etapas de preparo de amostras utilizaram béqueres, almofariz, pistilo,
25 frascos de conserva, funil de Buchner, funil de placa porosa, kitassato, balões de fundo
26 redondo e frascos com tampa plástica. Na injeção no GC-MS foram usados frascos e
27 tampas com septo.

28 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

29 O nitrogênio líquido fornecido pela Central de Análises é adquirido com a
30 liquefatora StirLIN-1 Economy – Stirling Cryogenics (Eindhoven, Holanda). O trabalho

1 utilizou *ultrafreezers* a -80 °C, disponibilizados pelo Laboratório Multiusuário de
2 Estudos em Biologia (LAMEB), balança analítica, liofilizador Terroni® (São Carlos – SP)
3 modelo Enterprise II foi empregado para a secagem das amostras. Também foram
4 empregados banho ultrassônico, chapa de aquecimento e agitação, barra de agitação
5 e micropipetas. As análises por GC-MS foram realizadas pelo LabCroMS com
6 Cromatógrafo gasoso SHIMADZU, GC-230 Nexis acoplado a detector de massas
7 GCMS-QP2020 NX.

8 4.3 SOFTWARES

9 O *software* de planilhas LibreOffice Calc® foi utilizado para a obtenção de
10 médias e desvios padrões, assim como para comparar estatisticamente as médias por
11 meio de análise de variância (ANOVA). O programa AGREEprep® foi utilizado para
12 gerar relatórios do caráter verde de cada método empregado.

13 4.4 COLETA E PREPARO DE AMOSTRA

14 4.4.1 Amostragem e coleta da amostra

15 As colônias de *T. coccinea*, para as três amostragens, foram retiradas no
16 Rancho Norte, Ilha do Arvoredo (27° 16' S, 48° 22' O) no mesmo secto de
17 profundidade, homogeneizando a influência dos fatores abióticos nos corais. As
18 colônias coletadas foram trazidas à embarcação em redes, avaliadas visualmente,
19 buscando as mais integras, com menor quantidade de substrato (rochas e moluscos
20 que se fixam embaixo das colônias) e em fase reprodutiva (adulta). A amostragem por
21 método de armazenagem foi de 200 g de colônias, pesada na embarcação, entretanto,
22 essa massa é uma estimativa, devido à instabilidade da embarcação.

23 4.4.2 Acondicionamento das amostras

24 As amostras foram separadas em três porções e armazenadas em metanol
25 (MeOH), nitrogênio líquido (NL) e gelo seco (GS), respectivamente.

26 Para o uso de nitrogênio líquido, as colônias de coral foram inseridas dentro de
27 um copo térmico seco. Após a transferência completa da amostra, o nitrogênio líquido
28 contido num segundo copo térmico foi vertido sobre as colônias, congelando-as
29 instantaneamente. O copo foi tampado e mantido na caixa térmica plástica.

1 A amostra mantida em gelo seco foi inicialmente transferida para um saco de
2 silicone e este foi selado e alocado no centro de uma caixa de isopor com gelo seco,
3 de forma a cobri-la completamente. A caixa foi fechada e mantida dentro do *cooler*.

4 **4.4.3 Congelamento, fragmentação e liofilização das amostras**

5 As amostras congeladas em nitrogênio líquido e gelo seco foram removidas
6 de seus recipientes e transferidas para um *ultrafreezer* sob temperatura controlada de
7 -80 °C.

8 Após 48 h de congelamento, as colônias foram descongeladas e
9 fragmentadas com martelo e espátula de metal com auxílio de pinça. Os fragmentos
10 gerados foram limpos de impurezas, como pequenas rochas e moluscos que se fixam
11 no interior do esqueleto do coral-sol. O material fragmentado em tamanhos menores
12 foi triturado empregando almofariz e pistilo. Após ser moído, formando uma pasta, foi
13 submetido a secagem por liofilização.

14 Na liofilização, cada amostra foi dividida em quatro béqueres. As massas
15 foram espalhadas pelas paredes das vidrarias de modo a aumentar a área de contato
16 e otimizar a secagem. As amostras foram mantidas por 1 h a -45 °C sob pressão
17 abaixo de 900 µmHg. O tempo para o equipamento atingir essas condições foi de 6 h. A
18 massa das frações secas foram reagrupadas em frascos de vidro fechados. Os
19 frascos foram armazenados em *freezers* à -22 °C até o momento da extração lipídica.

20 **4.4.4 Extração da fração lipídica**

21 Com o objetivo de não introduzir mais variáveis no processo, para além do
22 método de acondicionamento, a extração e esterificação de lipídios foram conduzidas
23 da mesma forma que o LabCroMS as executa com as amostras em metanol.

24 A amostra acondicionada em metanol foi extraída, derivatizada e analisada
25 pelos técnicos na Central de Análises da UFSC.

26 Para realizar os ensaios de extração lipídica das amostras, 62,0 g de cada
27 porção de amostra (LN e GS) foi transferida para frascos de vidro. Foi adicionado 60
28 mL de diclorometano e 35 mL de metanol. O frasco de extração foi mantido em banho
29 ultrassônico por 30 min e, depois, em repouso ao abrigo da luz por 65 h. A solução de
30 extrato foi coletada por filtração a vácuo. O sólido retido no funil foi lavado desligando o

1 vácuo, adicionando 50 mL de diclorometano, misturando o solvente no sólido e
2 religando novamente o vácuo, o processo se repetiu 3 vezes. O sólido foi transferido
3 para o frasco de extração, junto a 35 mL de diclorometano, o frasco foi mantido em
4 banho ultrassônico por 30 min e mantido em repouso, ao abrigo da luz por 24 h. O
5 mesmo processo de filtração foi repetido para a segunda extração. As soluções
6 coletadas em kitassato foram transferidas a balões de fundo redondo e os solventes
7 evaporados com rotoevaporador.

8 Os extratos brutos foram transferidos como soluções de 50 mg mL⁻¹ em
9 diclorometano e armazenados em frascos de vidro com tampa rosqueável, estes
10 foram armazenados em freezer à -22 °C até o momento das análises.

11 **4.4.5 Esterificação da fração lipídica da amostra.**

12 A esterificação dos extratos foi feita em triplicata para cada método de coleta
13 (NL e GS). A extração foi feita com 150 mg do extrato em frasco de vidro fechado,
14 contendo uma barra magnética de agitação. Aos frascos foram adicionados 2,0 mL de
15 solução metanólica de NaOH (0,5 mol L⁻¹) e, depois de mantidos em agitação branda
16 por 5 minutos, foram adicionados 2,5 mL da solução esterificante de ácido sulfúrico. As
17 triplicatas ficaram com os frascos tampados em sistema de refluxo e agitação sob
18 aquecimento em banho de areia à 60 °C, por 30 min. Os frascos foram transferidos
19 para banho de gelo por 1 min para alcançar temperatura ambiente. Após retirados do
20 banho, foram adicionados 2,0 mL da solução de NaCl saturada, concluindo a etapa
21 reacional. A solução estoque de FAMES, foi preparada adicionando 2,5 mL de hexano
22 ao frasco reacional e submetendo o frasco à vigorosa agitação por 30 s. A fase
23 orgânica sobrenadante foi coletada com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A secagem
24 da fase orgânica foi feita passando a solução coletada por uma segunda pipeta de
25 Pasteur recheada com sulfato de sódio e filtrando a solução com filtro PVDF 22µm. A
26 solução foi filtrada diretamente para um tubo eppendorf. Foram diluídos 20 µL de cada
27 triplicata de solução estoque de FAMES em 980 µL de PI tridecanoato de metila. Esta
28 diluição permitiu a identificação dos FAMES majoritários do coral-sol.

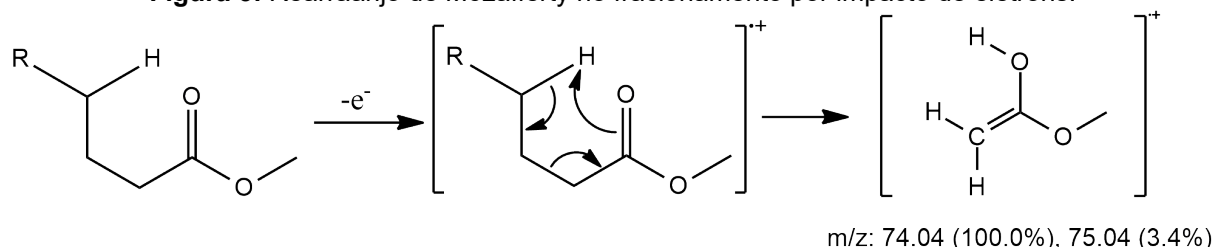
1 4.5 PARÂMETROS GC-MS

2 As análises por GC-MS foram realizadas pelo LabCroMS com Cromatógrafo
3 gasoso SHIMADZU, GC-230 Nexis acoplado a detector de massas GCMS-QP2020
4 NX. A análise da coleta em metanol utilizou coluna SH-RTX-5MS (29,8 m, 0,25 mmID),
5 já as amostras NL e GS usaram coluna DB-5MS (30 m, 0,25 mmID), ambas as colunas
6 tinham composição 5% fenil, 95% PDMS.

7 As injeções foram realizadas seguindo as condições experimentais: hélio
8 como gás de arraste, vazão de 0,62 mL min⁻¹ na coluna, velocidade linear de 30 cm s⁻¹;
9 temperatura do injetor de 300 °C e volume de injeção de 1 µL. A eluição foi realizada
10 pelo seguinte gradiente de temperaturas: 100 °C a 180 °C com taxa de aquecimento
11 de 15 °C/min, mantido a 180 °C por 15 min, aquecido de 180 °C a 200 °C com taxa de
12 2°C/min, mantido a 200 °C por 10 min, aquecido de 200 °C a 250 °C com taxa de 5
13 °C/min e de 250 °C a 300 °C com taxa de 25°C/min e mantido a 300 °C por 2 min.

14 O espectrômetro de massas monitorou íons de razão massa/carga (m/z) 50 a
15 500. Os FAMES foram identificados por MS a partir de razões massa/carga (m/z)
16 associados a rearranjos de McLafferty (Figura 5) na carbonila de ésteres metílicos ²⁶.

Figura 5: Rearraanjo de McLafferty no fracionamento por impacto de elétrons.



Fonte: autoral.

17 O *software* GCMSsolution® foi utilizado para o controle e a aquisição dos
18 dados da análise por CG-MS.

19 4.6 TRATAMENTO DE DADOS

20 Os FAMES mirístico; palmítico; elaídico; esteárico; ARA; EPA; 7,10,13,16 (Z) –
21 docosatetraenóico e DPA, foram identificados por MS e as respectivas áreas dos picos
22 foram racionadas pela área do PI de cada análise.

23 As médias das razões de áreas dos FAMES majoritários pelo padrão interno
24 foram comparadas entre si por ANOVA de um fator, com nível de confiança de 95%

1 ($\alpha=0,05$). Os três métodos de acondicionamento empregados, assim como o método
2 de secagem consequente (fluxo de nitrogênio ou liofilização), foram avaliados como
3 um único fator para ANOVA.

4 4.7 QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

5 A avaliação do critério de química analítica verde foi aplicada para o
6 procedimento isolado do acondicionamento da amostra, descontando o emprego de
7 reagentes para extração e derivatização e o transporte. Uma segunda avaliação,
8 única, foi realizada para o procedimento de extração, derivatização e análise de
9 FAMES. As avaliações foram feitas por meio do software AGREEprep®.

10 4.8 TRATAMENTO DE RESÍDUOS E SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

11 O manuseio de materiais criogênicos pode causar queimaduras severas,
12 portanto, o manuseio destas substâncias foi reduzido ao mínimo, o autor utilizou luvas
13 emborrachadas, assim como guarda pó com mangas compridas, calças e sapato
14 fechado durante o manuseio destes materiais. Todas as etapas de preparo de
15 amostras foram realizadas em capela com exaustão. Os resíduos orgânicos foram
16 armazenados para o recolhimento da equipe de coleta de resíduos da UFSC. O
17 mesmo protocolo se aplicou a luvas, ponteiros de micropipeta. Considerando o risco
18 de recipientes vedados, com nitrogênio líquido, pressurizarem internamente o autor
19 desenvolveu as metodologias observando a anulação deste fator de risco, preparando
20 uma tampa de material leve e isolante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Os ésteres de ácidos graxos serão usados como marcadores para avaliar as diferentes metodologias de acondicionamento. Para essa determinação foi usado um método por GC-MS. Com isso, foram determinados os valores de razão massa/carga e tempo de retenção de cada analito alvo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. O cromatograma típico da separação dos analitos por CG-MS está apreentado na Figura 6.

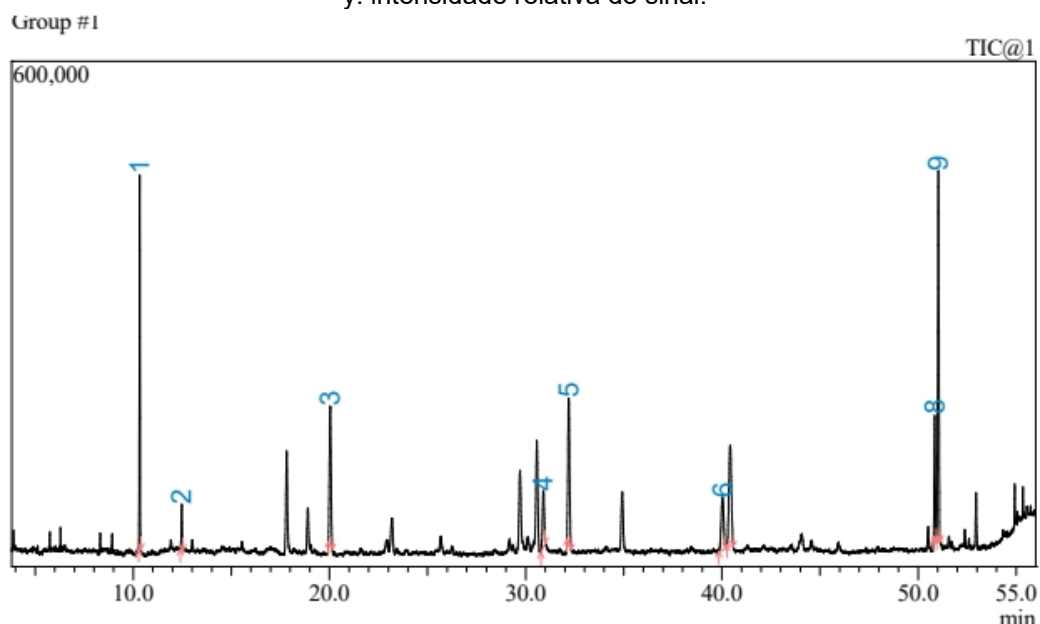
Tabela 2: Valores de razão massa/carga (m/z) e tempo de retenção (TR) dos analitos majoritários.

FAME de	Razão massa/carga (m/z)	TR / min
1 – Tridecanóico - (PI)	74, 87, 228	10,327
2 - Mirístico	74, 87, 211, 242	12,470
3 - Palmítico	74, 87, 227, 239, 270	20,038
4 - Elaídico	55, 69, 222, 264	30,910
5 - Esteárico	74, 87, 255, 267, 298	32,203
6 - Araquidônico	79, 91, 105, 119, 133, 150	40,040
7 - (5,8,11,14,17 -Z)-icosapentaenoico	79, 91 105, 119, 133	40,427
8 - (7,10,13,16 -Z)-docosatetraenoico	79, 105, 119, 133, 150	50,851
9 - Docosapentaenoico	79, 105, 119, 133, 150	51,033

Fonte: elaborado pelo autor.

As razões massa/carga apresentadas demonstram um padrão na fragmentação de FAMES. Em FAMES saturados, o íon de um rearranjo de McLafferty $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ apresenta a $m/z = 74$. O valor de $m/z = 87$ representa um grupo de íons $[(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3]^+$, em que para o valor especificado $n = 2$. Em contraste, o pico base para a identificação de FAMES poli-insaturados é $m/z = 79$, pertencente à série de íons $[\text{C}_n\text{H}_{2n-5}]^+$, o aumento de insaturações nos FAMES pode ser identificado pelo aumento do sinal $m/z = 91$, referente ao íon $[\text{C}_n\text{H}_{2n-7}]^+$ ²⁶.

Figura 6: Cromatograma das análises de FAMES. Eixo x: tempo de retenção (min); eixo y: intensidade relativa do sinal.



Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	m/z	Area	Height	Conc.	Conc.	S/N	R.Index
1	Éster metílico de ácido tridecanoico	10.329	TIC	1065345	447778	24.160	ppm	78.38	0
2	Éster metílico de ácido mirístico	12.469	TIC	174116	54388	0.000	ppm	14.55	0
3	Éster metílico de ácido palmítico	20.040	TIC	1103315	176539	0.000	ppm	30.90	0
4	Éster metílico de ácido eláidico	30.900	TIC	506209	73254	0.000	ppm	12.82	0
5	Éster metílico de ácido esteárico	32.189	TIC	1184643	183631	0.000	ppm	32.14	0
6	Éster metílico de ácido araquidônico	40.034	TIC	575278	62814	0.000	ppm	10.99	0
7	Éster metílico de ácido 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-α	40.419	TIC	1131966	122490	0.000	ppm	21.44	0
8	Éster metílico de ácido 7Z,10Z,13Z,16Z-doci	50.851	TIC	694825	160923	0.000	ppm	28.17	0
9	Éster metílico de ácido docosapentaenoico	51.035	TIC	2062669	449937	0.000	ppm	78.76	0

Fonte: Cromatograma e análise elaborados pela técnica Laís S. Matos, LabCroMS.

1 A avaliação da viabilidade dos acondicionamentos alternativos foi realizada
 2 através da comparação das razões de área dos sinais dos FAMES pela área do padrão
 3 interno tridecanoico. Essa abordagem foi necessária devido os as medidas por GC-MS
 4 terem sido feitas em momentos diferentes ao longo do desenvolvimento do trabalho. O
 5 padrão interno corrige eventuais oscilações dos sinais dos analitos medidos em dias
 6 diferentes, assim como permite a comparação de dados em condições
 7 cromatográficas diferentes. Para isso uma concentração fixa de padrão interno foi
 8 usada em todas as amostras analisadas. Os resultados de razão de área de analito
 9 pela área do padrão interno estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3. As amostras
 10 coletadas em nitrogênio líquido, gelo seco e metanol estão abreviadas
 11 respectivamente como NL, GS e MeOH.

Os FAMES majoritários detectados, principalmente (5,8,11,14,17 - Z) icosapentaenoico; (7,10,13,16 - Z) docosatetraenoico e docosapentaenoico, são biomarcadores de uma dieta preferencial a fitoplânctons, sua presença como FAMES majoritários confirmam o padrão trófico destas espécies nos mares brasileiros ¹⁵. Os métodos empregados não interferiram imediatamente na detecção dos analitos, o equipamento detectou a presença de hidroxiácidos e alcóois na matriz analisada, FAMES com este perfil podem ser resultantes do próprio lipidoma do coral, a depender de seu processo metabólico, assim como pode ser consequência de processos oxidativos ocorridos durante o preparo de amostras em que o procedimento é conduzido a temperatura ambiente.

5.2 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As médias das razões das áreas, apresentadas na Tabela 2, foram comparadas para um teste de hipóteses, sendo a hipótese nula (H_0) de que as médias das concentrações eram iguais entre si e a hipótese alternativa (H_A) de que as médias apresentam diferença entre si, para avaliar simultaneamente as três médias, o teste mais adequado seria ANOVA de um fator, com nível de confiança de 95%, os valores individuais foram comparados entre si. Os resultados para os cálculos de ANOVA estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Média das razões das áreas dos picos dos analitos e do padrão interno (A_{FAME} / A_{PI}).

ANALITO	A_{FAME} / A_{PI}		
	NL	GS	MeOH
2	0,140 ± 0,040	0,149 ± 0,015	0,146 ± 0,011
3	1,223 ± 0,271	0,930 ± 0,108	1,119 ± 0,069
4	0,180 ± 0,046	0,407 ± 0,059	0,478 ± 0,016
5	0,887 ± 0,262	0,977 ± 0,117	1,885 ± 0,169
6	0,262 ± 0,067	0,453 ± 0,075	1,033 ± 0,132
7	0,423 ± 0,121	0,782 ± 0,321	1,498 ± 0,065
8	0,323 ± 0,107	0,543 ± 0,099	1,026 ± 0,091
9	0,734 ± 0,250	1,618 ± 0,276	2,463 ± 0,163

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4: Tabela de ANOVA para a comparação dos três métodos de coleta.

FAME de	Entre grupos			Dentro dos grupos			Valor-p
	SS	df	MS	SS	df	MS	
2	6,96E-05	2	3,48E-05	3,33E-03	7	4,75E-04	9,30E-01
3	1,30E-01	2	6,68E-02	1,80E-01	7	2,63E-02	1,48E-01
4	1,60E-01	2	7,93E-02	1,00E-02	7	1,71E-03	9,09E-05
5	4,00E-02	2	1,85E-02	2,20E-01	7	3,10E-02	5,76E-01
6	1,15E+00	2	5,76E-01	7,00E-02	7	1,03E-02	5,03E-05
7	2,12E+00	2	1,06E+00	2,50E-01	7	3,54E-02	3,73E-04
8	9,20E-01	2	4,58E-01	7,00E-02	7	9,64E-03	8,48E-05
9	5,14E+00	2	2,57E+00	3,60E-01	7	5,09E-02	6,91E-05

Fonte: cálculos e tabela elaborados pelo autor.

Os resultados das comparações das três médias apontam que não houve diferença significativa entre os resultados de FAMEs saturados, mas que houve diferença entre os FAMEs insaturados. O tratamento por ANOVA indica que para FAMEs saturados o método de coleta não interfere nos resultados, enquanto o oposto se aplica aos insaturados. Entretanto os procedimentos de extração e derivatização exigem muitas etapas e são passíveis de erros devido a falta de automação do procedimento e, portanto, podem contribuir para as variações observadas nos resultados. Como o efeito das etapas seguintes não foi avaliado, a hipótese aceita é de que os procedimentos aplicados não são suficientes para a determinação de FAMEs insaturados sem diferença significativa do procedimento com metanol.

Outro ponto a ser debatido são os altos valores de desvio padrão dos resultados, esta variação de resultados entre as triplicatas pode ser consequência do preparo de amostras, que exige uma quantidade de etapas muito extensa assim como consequência do método de análise por GC-MS, o uso deste método implica a necessidade de derivatização das amostras para que os analitos sejam voláteis e possam ser detectados pelo equipamento.

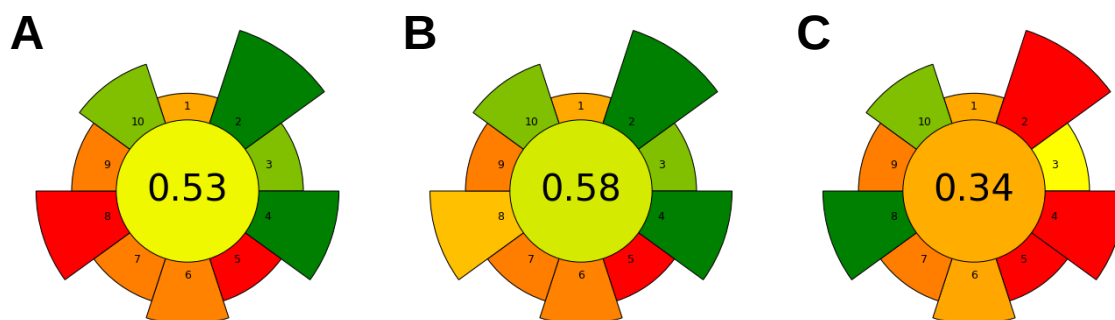
A comparação por ANOVA possivelmente aceitou as médias de FAMEs saturados por consequência dos desvios padrões altos. Para melhorar os resultados e para que a comparação aceite, ou rejeite, as comparações com maior confiança, deveriam ter sido produzidas mais replicatas, para que desta forma, testes de

1 eliminação de erros grosseiros como o Teste de Grubbs, pudessem ser aplicados aos
2 resultados sem que houvesse perda de relevância estatística dos resultados.

3 5.3 CRITÉRIO VERDE

4 As avaliações dos métodos de coleta isolados e do procedimento completo
5 estão apresentadas nas Figuras 7 e 8. Para a avaliação da coleta isolada, os valores
6 de solventes e reagentes empregados na extração e derivatização foram eliminados,
7 assim como o transporte da amostra. Outros dados como o método de análise e
8 quantidade de amostras preparadas por hora foram mantidos sem alterações.

Figura 7: Relatório AGREEprep de química analítica verde para a coleta de amostras: **(A)** NL; **(B)** GS; **(C)** Metanol.



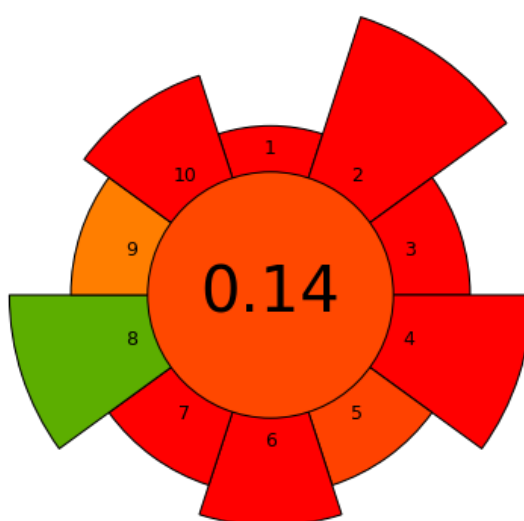
Fonte: Elaborada pelo autor com auxílio do programa AGREEprep.

9 Observando os resultados, afirma-se que há um ganho notável do valor verde
10 das coletas ao usar nitrogênio líquido e gelo seco, mas ainda são métodos que, no
11 saldo total dos resultados, são pouco verdes. Muito da perda do valor verde dos
12 preparos de amostra se deu pelo consumo de solventes e reagentes ter inviabilizado
13 toda a economia de solvente prévia, assim como o consumo de energia previsto para
14 as máquinas utilizadas na produção de nitrogênio líquido e gelo seco.

15 O AGREEprep se demonstrou uma ferramenta com algumas limitações
16 devido à subjetividade da interpretação dos critérios ou do acesso total a estes
17 valores. Considerando que o preparo de amostras é uma prática que envolve a
18 produção de replicatas, muitos dos valores a serem inseridos no *software* ficam sob a
19 interpretação do autor se deveriam ser divididos igualmente entre as replicatas, ou se
20 deve-se usar o valor absoluto como é o caso, por exemplo, do consumo de energia do
21 preparo de amostra em Wh. Para a melhoria do valor verde e a segurança dos

analistas o mais apropriado seria eliminar o uso de solventes clorados e de metanol, optando pela redução do consumo de solventes por meio de métodos de extração como os propostos por Charriez et al. (2021)²⁸, que utilizaram uma fração 3:1(v:v) de butanol para metanol, ou de Liu et al. (2022)²⁹, com o uso de um extrator de Soxhlet e éter de petróleo e Reyes-Garcés e Gionfriddo (2019)³⁰, em que foi estudado o uso de microextração em fase sólida para análise lipídica.

Figura 8: Relatório AGREEprep de química analítica verde para o preparo de amostras, da extração à análise.



Fonte: Elaborada pelo autor com auxílio do programa AGREEprep.

A partir dos resultados expostos, é compreendido que o melhor curso de ação para a análise de lipídios do coral-sol, seria a revisão completa do método, procurando se adequar melhor aos critérios da química analítica verde e aos padrões de segurança ao analista, o uso de solventes organoclorados e metanol é excessivo e o uso de derivatização causam decréscimos acentuados dos critérios avaliados. Para além do consumo excessivo, o uso de solventes orgânicos dificilmente produziria valores verdes, portanto, em futuras revisões é aconselhável o uso de fases extratoras com menor impacto ambiental.

1 **6 CONCLUSÃO**

2 Este trabalho demonstrou que, estatisticamente, os métodos de coleta e
3 preservação, incluindo a liofilização, não foram suficientes para justificar o seu
4 emprego. Estes métodos podem ser melhorados, reduzindo etapas, massa de
5 amostras, adaptando métodos de preparo de amostra menos complexos e
6 observando resultados mais diretamente consequentes dos métodos de coleta.

7 A secagem por liofilização estava incluída como parte da avaliação e não foi
8 considerada estatisticamente adequada para os resultados produzidos de ésteres
9 metílicos de ácidos graxos insaturados. Entretanto o fator de segurança do analista foi
10 melhorado nesta etapa ao evitar que a moagem da amostra fosse feita com a
11 presença de metanol.

12 A extração produziu quantidades satisfatórias de extrato bruto, entretanto é
13 perceptível que o valor verde deste método é baixo, principalmente pelo alto consumo
14 de solventes e reagentes perigosos, pela massa de amostra necessária e consumo de
15 tempo para o preparo completo das amostras. Metodologias propostas na literatura
16 mais eficientes já foram elaboradas, reduzindo tempo de extração e volume gasto de
17 solventes, assim como o uso de solventes que possam ser usados no processo de
18 extração e derivatização em sequência, melhorando a integração de etapas e
19 reduzindo o número total de passos de preparo de amostras.

20 A metodologia de identificação de FAMES por GC-MS foi satisfatória,
21 produzindo dados suficientes para as comparações por ANOVA.

22 O uso do programa de química analítica verde se demonstrou uma alternativa
23 mais interessante para o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras,
24 de forma que não limita este processo a alterações univariadas que demandam
25 tempo, consumo de solventes e reagentes e saídas de campo para a coleta.

REFERÊNCIAS

- [1] Sobre o coral-sol. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/biodiversidade/especies-exoticas-invasoras/sobre-o-coral-sol>.
- [2] CREED, Joel C. *et al.* The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 283 – 305, 30 set. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-016-1279-y>
- [3] CAIRNS, Stephen D.. A revision of the shallow-water azooxanthellate Scleractinia of the western Atlantic. **Publications Foundation for Scientific Research in the Caribbean Region**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 1 – 240, jan. 2000.
- [4] CASTRO, Clovis B.; PIRES, Débora O.. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. **Bulletin Of Marine Science**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 357 – 371, set. 2001.
- [5] CAPEL, K. C. C. *et al.* Multiple introductions and secondary dispersion of *Tubastraea* spp. in the Southwestern Atlantic. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1 – 11, 27 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50442-3>.
- [6] SOARES, Marcelo de Oliveira; DAVIS, Marcus; CARNEIRO, Pedro Bastos de Macêdo. Northward range expansion of the invasive coral (*Tubastraea tagusensis*) in the southwestern Atlantic, **Marine Biodiversity**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 1651 – 1654, 20 dec. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12526-016-0623-x>.
- [7] MANTELATTO, Marcelo Checoli. **Distribuição e abundância do coral invasor *Tubastraea* spp.** 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Evolução, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- [8] SALES-SANTOS, Victor G. *et al.* Records of the invasive sun coral *Tubastraea* and migration offshore-onshore in an estuarine zone of northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 1-7, 2024. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2024-1642>.
- [9] LAWSON, C. A.; CAMP, E.; DAVY, S. K.; FERRIER-PAGÈS, C.. Informing Coral Reef Conservation Through Metabolomic Approaches. In: VAN OPPEN, Madeleine J. H.; LASTRA, Manuel Aranda (ed.). **Coral Reef Conservation and Restoration in the Omics Age**. [S.I.]: Springer Cham, 2022. Cap. 12. p. 179-202. (Coral Reefs of the World). https://doi.org/10.1007/978-3-031-07055-6_12.

- [10] WARD, S.. Two patterns of energy allocation for growth, reproduction and lipid storage in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. **Coral Reefs**, v.14, p. 87 – 89, 14 out. 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00303428>.
- [11] FIGUEIREDO, J. *et al.* Ontogenetic change in the lipid and fatty acid composition of scleractinian coral larvae. **Coral Reefs**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 613-619, 25 jan. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-012-0874-3>.
- [12] VILADRICH, Núria *et al.* Variation in lipid and free fatty acid content during spawning in two temperate octocorals with different reproductive strategies: surface versus internal brooder. **Coral Reefs**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 1033 – 1045, 5 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-016-1440-1>.
- [13] LATYSHEV, N. A.; NAUMENKO, N. V.; SVETASHEV, V. I.; LATYPOV, Y. Ya.. Fatty acids of reef-building corals. **Marine Ecology Progress Series**, Vladivostok, URSS, v. 76, p. 295 – 301, out. 1991.
- [14] IMBS, Andrey B.; DEMBITSKY, Valery M.. Coral lipids. **Marine Drugs**, Vladivostok, Rússia, v. 21, n. 10, p. 1 – 80, 15 out. 2023. <https://doi.org/10.3390/md21100539>.
- [15] FIGUEIREDO, Cátia Alexandra Alves. **3D chemotaxonomy of corals using fatty acid biomarkers: latitude, longitude and depth**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia Marinha, Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2014.
- [16] VEGA THURBER, Rebecca *et al.* Unified methods in collecting, preserving, and archiving coral bleaching and restoration specimens to increase sample utility and interdisciplinary collaboration. **Peerj**, [S.L.], v. 10, n. 14176, p. 1-32, 2 nov. 2022. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.14176>.
- [17] MUSHTAQ, Mian Yahya; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert; WILSON, Erica G.. Extraction for Metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 291-306, 13 fev. 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2505>.
- [18] OLIVEIRA, Juliana *et al.* Spatio-temporal variability of secondary metabolites in the invasive coral *Tubastraea coccinea*. **Aquatic Invasions**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 476 – 493, ago. 2022. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2022.17.4.02>.
- [19] LAGES, Bruno G. *et al.* Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia). **Brazilian Journal Of Oceanography**, Búzios, RJ, v. 58, n. Especial, p. 47 – 56, maio 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-87592010000800007>.

[20] MRÓZ, Marika *et al.* The Impact of Different Drying Methods on the Metabolomic and Lipidomic Profiles of *Arthrospira platensis*. **Molecules**, [S.L.], v. 29, n. 1747, p. 1-21, 12 abr. 2024. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules29081747>.

[21] BRASIL. Talita Delgrossi Barros. Embrapa. Transesterificação. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/biodiesel/tecnologia/transesterificacao>. Acesso em: 7 nov. 2024.

[22] SKOOG, Douglas A. *et al.* Gas Chromatography. In: SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. [S.L.]: Cengage Learning, 2013. Cap. 32. p. 887-911.

[23] WOJNOWSKI, Wojciech *et al.* AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 149, n. 116553, p. 1-9, abr. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.

[24] JANGJOU, Ali *et al.* Awareness raising and dealing with methanol poisoning based on effective strategies. **Environmental Research**, [S.L.], v. 228, n. 115886, p. 1-17, jul. 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2023.115886>.

[25] Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ. **Álcool metílico**. Disponível em: <https://www.labsynth.com.br/fispq/FISPQ-%20Alcool%20Metilico.pdf>. Acesso em: 10/11/2024.

[26] MJØS, Svein A.. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [S.L.], v. 106, n. 8, p. 550-560, ago. 2004. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200401013>.

[27] SKOOG, Douglas A. *et al.* Statistical Data Treatment and Evaluation. In: SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. [S.L.]: Cengage Learning, 2013. Cap. 7. p. 123-152.

[28] YAMASHIRO, Hideyuki *et al.* Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S.L.], v. 122, n. 4, p. 397-407, abr. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491\(99\)00014-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491(99)00014-0).

[29] CHARRIEZ, Kathleen Lugo *et al.* Application of an Improved Chloroform-Free Lipid Extraction Method to Staghorn Coral (*Acropora cervicornis*) Lipidomics Assessments. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 107, n. 1, p. 92-99, 3 jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-020-03078-3>.

[30] LIU, Chengyue *et al.* Differences in Fatty Acids and Lipids of Massive and Branching Reef-Building Corals and Response to Environmental Changes. **Frontiers In Marine Science**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-10, 26 maio 2022. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.882663>.

[31] REYES-GARCÉS, Nathaly et al. Recent developments and applications of solid phase microextraction as a sample preparation approach for mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 172-181, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.009>.