

Guia prático para a preparação de amostras sedimentares para a análise de ácidos biliares e esteróis fecais por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 273

Guia prático para preparação de amostras sedimentares para a análise de ácidos biliares e esteróis fecais por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)

Juan Masias Sanéz
Fabrício Augusto Hansel
Lucilia Maria Parron
Sandro José Froehner

Embrapa Florestas
Colombo, PR
2014

Embrapa Florestas
Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,
83411-000, Colombo, PR - Brasil
Caixa Postal: 319
Fone/Fax: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida
Membros: Alvaro Figueredo dos Santos, Claudia Maria Branco de
Freitas Maia, Elenice Fritzsos, Guilherme Schnell e Schuhli, Jorge
Ribaski, Luis Claudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski,
Susete do Rocio Chiarello Penteado

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos
Revisão de texto: Patrícia Póvoa de Mattos
Normalização bibliográfica: Francisca Rasche
Ficha catalográfica: Elizabeth D. Roskamp Câmara
Editoração eletrônica: Rafeale Crisostomo Pereira

1ª edição
Versão eletrônica (2014)

Todos os direitos reservados
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em
parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Florestas

Guia prático para preparação de amostras sedimentares para a análise de ácidos
biliares e esteróis fecais por cromatografia gasosa – espectrometria de massa
(GC-MS) [recurso eletrônico] / Juan Masias Sáñez... [et al.]. Dados eletrônicos. -
Colombo : Embrapa Florestas, 2014.
35 p. - (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 273)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/item/221>>

Título da página da web (acesso em: 09 março 2015).

1. Qualidade da água. 2. Bacia hidrográfica. 3. Sedimento. 4. Manejo de água.
5. Poluição da água. 6. Cromatografia gasosa. I. Sáñez, Juan Masias, Estefano. II.
Hansel, Fabrício Augusto. III. Parron, Lucilia Maria. IV. Froehner, Sandro José VII.
Série.

CDD 628.161 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Autores

Juan Masias Sanez

Químico, Ph.D. em Ciências Ambientais,
Pós doutorante da Universidade Federal do Paraná
sanez.juan@gmail.com

Fabício Augusto Hansel

Químico, Doutor em Química,
Analista da Embrapa Florestas,
fabricio.hansel@embrapa.br

Lucilia Maria Parron

Bióloga, Doutora em Ecologia,
Pesquisadora da Embrapa Florestas,
lucilia.parron@embrapa.br

Sandro José Froehner

Químico, Doutor em Química,
Professor da Universidade Federal do Paraná,
froehner@ufpr.br

Apresentação

Oferta e qualidade da água são temas recorrentes nas discussões e ações para a proteção, recuperação e uso racional dos recursos hídricos e florestais. No que se refere à qualidade de água, a poluição de águas superficiais por esgotos e efluentes é um risco para a saúde humana e para a integridade dos ecossistemas aquáticos, em função da variedade de microrganismos patogênicos associados à poluição.

Nesse estudo, os autores defendem o uso de esteróis e ácido biliares na determinação da magnitude e da origem da poluição em sistemas aquáticos, especialmente em sedimentos. Este método seria mais adequado aos métodos microbiológicos, que não identificam as fontes de poluição. Os autores consideram que a determinação da magnitude e da origem da poluição fornece subsídios para a restauração de serviços ambientais em ambientes degradados. A publicação mostra um procedimento detalhado para preparação e tratamento de amostras de sedimentos, para posterior análise de biomarcadores por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).

Sergio Gaiad
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Florestas

Sumário

Introdução	9
Esteróis fecais e ácidos biliares	11
Procedimentos para coleta de sedimentos	14
Reagentes, materiais e equipamentos	14
Preparação e tratamento de amostra	18
Secagem e preservação da amostra.....	18
Adição do padrão interno	18
Extração dos lipídios.....	20
Saponificação.....	21
Separação do extrato neutro.....	22
Fracionamento do extrato neutro.....	23
Separação do extrato ácido	24
Esterificação.....	24
Fracionamento da fração ácida (opcional)	25
Sililação	26
Considerações finais	27
Referências	29
Anexos	31

Guia prático para preparação de amostras sedimentares para a análise de ácidos biliares e esteróis fecais por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS)

Juan Masias Sanez

Fabício Augusto Hansel

Lucilia Maria Parron

Sandro José Froehner

Introdução

A conservação da água doce é um tema integrador no contexto das estratégias para a conservação da biodiversidade florestal, exploração sustentável de produtos florestais, recuperação e restauração de florestas e prestação de serviços ambientais pelas florestas, temas que constituem a missão da Embrapa Florestas. Em diversas regiões do país, se manifestam limitações e demandas conflitantes no abastecimento de água doce para consumo doméstico, industrial e agrícola, fato que suscita discussões e ações para a proteção, recuperação e uso racional dos recursos hídricos. Dado o papel das florestas e outras formações naturais na conservação dos recursos hídricos que, em diferentes níveis, influencia a quantidade, qualidade e constância do suprimento de água doce, evidencia-se a importância de estudos nessa área, somando forças e propósitos para melhores padrões de desenvolvimento do setor florestal.

A água é indispensável para quase todas as funções dos ecossistemas e é um recurso fundamental para suportar o desenvolvimento socioeconômico. Está diretamente relacionada ao bem-estar da sociedade, e a formulação de políticas de manejo integrado de recursos hídricos requer um entendimento da sua

vulnerabilidade. A qualidade dos corpos hídricos pode variar de acordo com a finalidade de uso, se para consumo humano (água potável), para uso agrícola ou industrial, para recreação ou para manter a qualidade ambiental. Indicadores de avaliação da qualidade da água são utilizados para identificar as ações que a contaminam ou protegem. Os parâmetros físicos, químicos e biológicos mais comumente utilizados para avaliar a qualidade da água em geral não são específicos e, portanto, não determinam a origem das alterações ambientais. Por exemplo, o uso de micro-organismos para avaliar a contaminação por material de origem fecal seja de origem humana ou animal em amostras de água e sedimentos é dificultado pela falta de especificidade; sensibilidade à luz; tempo de vida curto; e pouca resistência à variação de temperatura (CHEVREMONTE et al., 2012; MARTINS, 2007).

Determinar a magnitude e a origem da poluição fecal através do uso de esteróis e ácido biliares podem contribuir na restauração de serviços ambientais, principalmente com relação à recuperação de ambientes degradados. O uso de biomarcadores em sedimentos (*i.e.* sedimentos de superfície e testemunhos) (MACHADO et al. 2014) se constitui numa forma segura para identificar poluições por compostos orgânicos ocorridas recentemente ou mesmo poluições antigas, visto que têm a capacidade de “acumular” essa informação; pois os sedimentos refletem a atuação dos parâmetros ambientais por um longo período de tempo, constituindo um registro da dinâmica local (APRILE et al., 2005). Certos compostos químicos de origem natural ou antrópica podem ficar adsorvidos e preservados, devido à degradação lenta ou quase nula, sendo possível reconstruir cenários do passado.

Considerando esta problemática, esse trabalho apresenta um guia prático para a preparação e tratamento da amostra, para análise de biomarcadores fecais (*i.e.* esteróis e ácidos biliares), em especial de sedimentos, por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS). O enfoque é mostrar o detalhamento das etapas envolvidas na preparação das amostras antes da sua análise instrumental.

Esteróis fecais e ácidos biliares

Os esteróis fecais (EF) e os ácidos biliares (AB) são compostos presentes nas excretas de humanos e animais que podem ser utilizados como indicadores da presença de material fecal, inclusive indicando a sua origem. Tais substâncias são chamadas de biomarcadores e são produzidos pelo metabolismo humano e dos animais e excretados através das fezes (STANDLEY et al. 2000). Estruturas moleculares destes compostos são apresentadas na Figura 1.

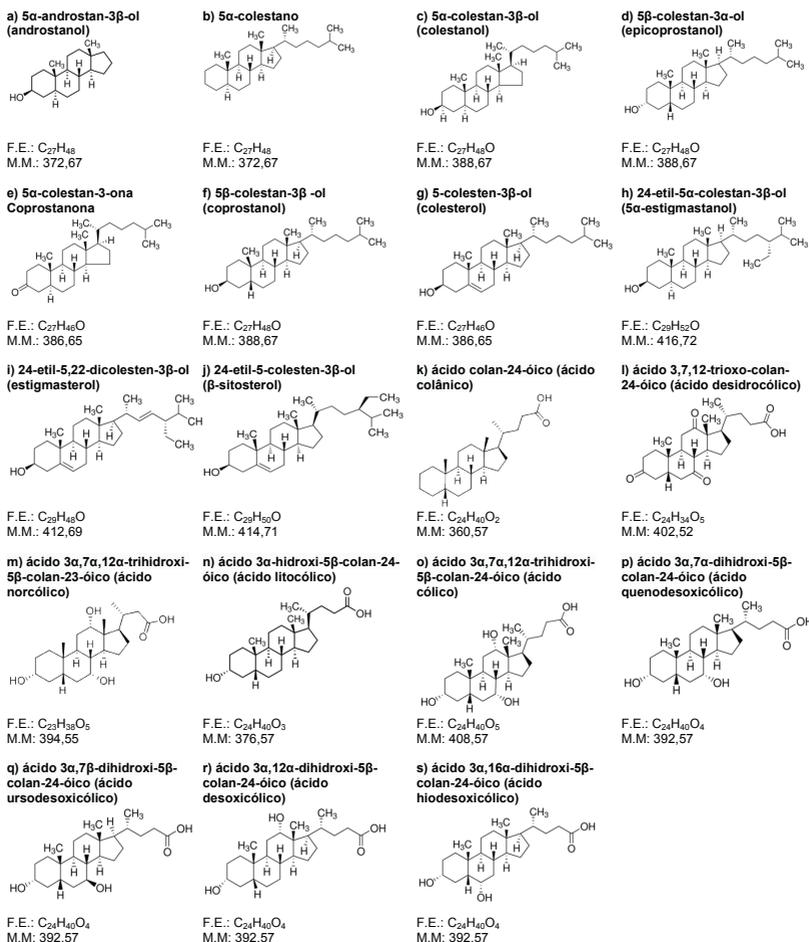


Figura 1. Estruturas moleculares dos principais esteróis fecais e ácidos biliares, incluindo alguns padrões para cada família de compostos. F.E.: fórmula empírica; M.M.: massa molecular em g mol⁻¹.

O coprostanol é um típico exemplo de biomarcador ou traçador da contaminação por esgotos domésticos (EVERSHED et al., 1997, 2002), tendo origem a partir do metabolismo do colesterol no intestino humano (EVERSHED et al. 2002). Alguns pesquisadores têm utilizados os AB como traçadores de esgotos domésticos, tanto para elucidar a poluição recente, como de cenários do passado (EVERSHED et al., 1997, 2002). Como os EF, os AB também são excretados pelos animais, mas a composição e a presença podem variar de acordo com a classe e a espécie. Existem várias pesquisas que procuram distinguir a origem destes (animal ou humano) com o uso desses biomarcadores combinados. Nesse caso, são usados diferentes índices relacionados com o conteúdo dos diferentes EF e/ou AB (TYAGI et al., 2009). É importante ressaltar que tanto os EF como os AB são resistentes à degradação, especialmente quando estão adsorvidos aos sedimentos.

Apesar do sucesso como traçador de poluição pelo esgoto, são poucos os trabalhos publicados que fizeram uso dos AB para tal finalidade, em parte pela dificuldade nas análises. As técnicas para a análise dos EF e dos AB não são padronizadas e variam em reagentes e procedimentos (BIRK et al., 2012; BULL et al., 2002; CHALLER et al., 2001; ISOBE et al., 2002; TYAGI et al., 2009).

As análises de EF e AB têm duas partes fundamentais: (i) o tratamento e preparação da amostra, e (ii) a análise por GC ou GC-MS. Na maioria dos artigos não existe um consenso e definições claras das etapas de tratamento e preparação da amostra. Geralmente, após a extração, a amostra é submetida a uma saponificação e dois tipos de fracionamento/purificação. No primeiro fracionamento são extraídos os compostos neutros, e logo esta fração é submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica com sílica gel, na qual se busca separar os EF. A solução que permanece após o primeiro fracionamento é acidificada para a extração dos ácidos. Esse último extrato, que contém os ácidos biliares, é esterificado via reação com diazometano e ainda pode ser fracionado para isolar os ácidos biliares. Ambos os extratos finais dos EF e AB já isolados são posteriormente sililados, antes da análise pelo GC-MS. Na Figura 2 é apresentado um esquema geral do processo.

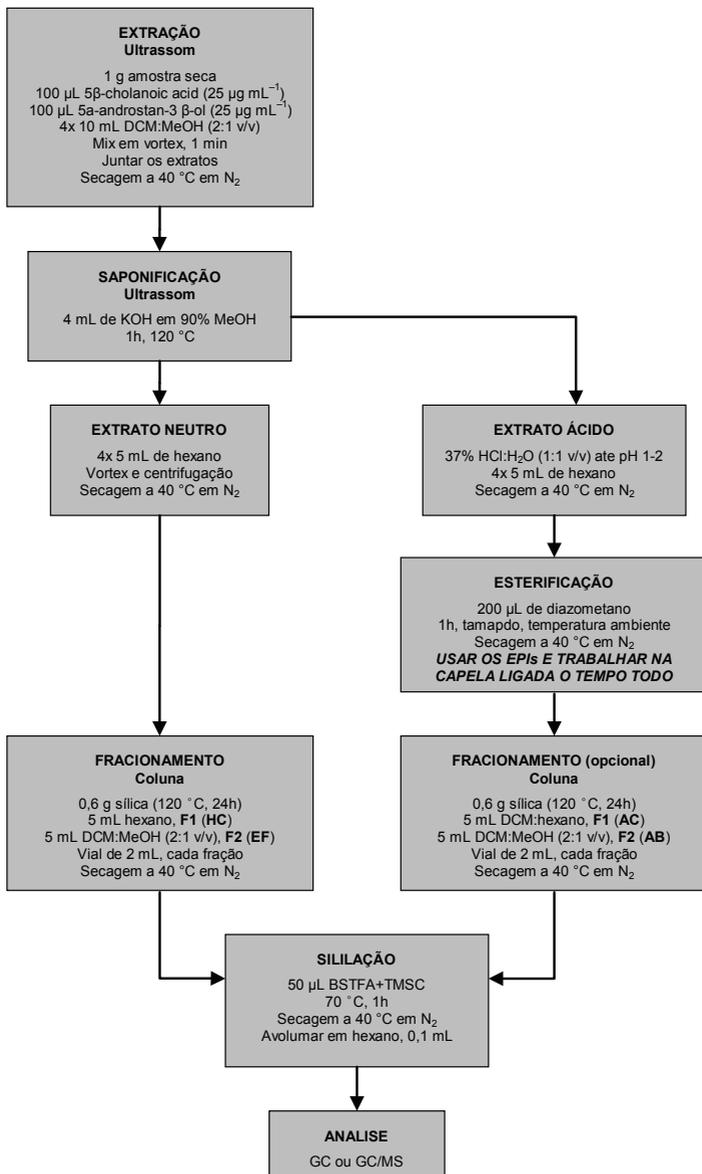


Figura 2. Diagrama do procedimento analítico. AB: Ácidos biliares; AC: Ácidos carboxílicos; BSTFA + TMSC: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida contendo 1,0% de trimetilclorosilano; DCM: diclorometano; EF: Esteróis fecais; GC-MS: cromatografia gasosa e espectrometria de massa; HC: Hidrocarbonetos; MeOH: metanol; N₂: nitrogênio gasoso.

Procedimentos para coleta de sedimentos

Diversas técnicas e aparatos podem ser usados na coleta das amostras de sedimentos (*e.g.* tubo PVC, *grabbers*, amostrador dinâmico, etc.). Além disso, o tipo de amostra também pode variar (*e.g.* suspenso na coluna de água, sedimentar superficial, testemunho). Considerando que o método pode ser aplicado a qualquer amostra sólida e, dependendo da natureza da pesquisa, essa pode se diferenciar, este documento tem como objetivo principal demonstrar um protocolo analítico para análise de esteróis e ácidos biliares em matrizes sólidas após coleta.

Reagentes, materiais e equipamentos

A listagem de reagentes, materiais e equipamentos, apresentados nas Tabelas 1 e 2, pretende ser uma referência com respeito aos insumos (pureza, marca, fornecedor, etc.) utilizados no teste do protocolo apresentado.

Tabela 1. Lista dos principais reagentes, solventes e padrões.

Nome	CAS	Observações
Reagentes e solvente		
diclorometano (DCM)	75-09-2	Grau HPLC
ácido clorídrico (HCl)	7647-01-0	Reagente tipo ACS, 37%
hidróxido de potássio (KOH)	1310-58-3	Pellets, reagente tipo ACS
metanol (MeOH)	67-56-1	Grau HPLC
hexano	110-54-3	Grau HPLC
sílica gel	0,063-0,200 mm	
BSTFA + TMCS, 99:1		N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida contendo 1,0% de trimetilclorossilano, Código Sigma-Aldrich: 33155-U
N-nitro-N-metil-uréia	80-11-5	Código Sigma-Aldrich: N4766-25G
Padrões ácidos biliares		
ácido colan-24-óico	546-18-9	ácido colânico/ padrão interno
ácido 3,7,12-trioxo-colan-24-óico	81-23-2	ácido desidrocólico/padrão interno
ácido 3 α -hidroxi-5 β -colan-24-óico	434-13-9	ácido lítocólico
ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-óico	81-25-4	ácido cólico
ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colan-24-óico	474-25-9	ácido quenodesoxicólico
ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-óico	83-44-3	ácido desoxicólico
ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colan-24-óico	128-13-2	ácido ursodesoxicólico
ácido 3 α ,16 α -dihidroxi-5 β -colan-24-óico	83-49-8	ácido hiodesoxicólico

Tabela 1. Continuação.

Nome	CAS	Observações
Padrões esteróis fecais		
5 α -androstan-3 β -ol	1224-92-6	Androstanol/padrão interno
5 α -colestano	481-21-0	padrão de injeção
5 α -colestan-3 β -ol	80-97-7	colestanol
5 β -colestan-3 α -ol	516-92-7	epicoprostanol
5 α -colestan-3-ona	566-88-1	coprostanone
5 β -Coprostan-3 β -ol	360-68-9	coprostantol
5-colesten-3 β -ol	57-88-5	colesterol
24-etil-5 α -colestan-3 β -ol	19466-47-8	(5 α -estigmasteranol)

Tabela 2. Lista dos principais materiais e equipamentos.

Nome	Observações
Materiais	
Cartucho de polietileno vazio	Capacidade: 3 mL, Figura 3 (d),
Tubos de centrífuga com tampa	Capacidade: 10, 15 mL
Equipamentos	
Centrifuga	Mínimo: 1.000 rpm
Bloco de aquecimento	Sistema de aquecimento em meio seco para pequenos volumes; 40, 70, 120 °C
Liofilizador	
Sistema para produzir diazometano	Código Sigma-Aldrich: Z411736-1EA, Figura 3 (b)
Sistema de vácuo para SPE	Figura 3 (c)
Sistema de secagem de N ₂	Figura 3 (a)
Ultrasound	
Vortex	

Fotos: Juan Masias Sanez



(a) Sistema de vácuo para SPE.



(b) O gerador de diazometano com a conexão System 45®.



(c) Bloco de aquecimento.



(d) Cartucho de 3 mL com 600 mg de sílica gel.

Figura 3. Aparelhos usados durante o tratamento da amostra para análise por cromatografia gasosa (GC).

Preparação e tratamento de amostra

Secagem e preservação da amostra

Diferentes métodos são usados para extrair os compostos orgânicos presentes nos sedimentos. O primeiro requisito é que o sedimento tem que estar completamente seco. A amostra coletada pode ser deixada por vários dias secando em temperatura ambiente ou podem ser liofilizadas. Nesse caso, a amostra úmida é congelada previamente e liofilizada por vácuo aproveitando a sublimação da água congelada. A principal vantagem da liofilização é que se evita, ou diminui, a ação microbiana sobre a matéria orgânica e analitos de interesse presentes na amostra. Após secagem, a amostra é moída finamente, peneirada ($< 250 \mu\text{m}$) e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Adição do padrão interno

No início do processo extrativo adiciona-se um ou mais padrões, com a finalidade de avaliar o processo de extração, antes da análise pelo GC. Os padrões são moléculas de estrutura similar ao analito a ser analisado. Possuem uma concentração conhecida, de modo que se pode calcular a porcentagem de recuperação durante o processo de preparação da amostra.

Distintos padrões para análise de ácidos biliares e esteróis fecais estão disponíveis na literatura (BIRK et al., 2012; BULL et al., 2003; CHALER et al., 2001; ELHMMALI et al., 1997, 2000; ISOBE et al., 2002; SIMPSON et al., 1999; TYAGI et al., 2008). Na Tabela 3 são apresentados alguns padrões usados nos estudos de ácidos biliares e esteróis fecais.

Tabela 3. Padrões usados nos estudos de ácidos biliares e esteróis fecais em diferentes matrizes.

Nome em inglês	Tipo de estudo	Matriz	Referência
ácido 3 α ,6 α ,7 α -trihidroxi-5 β -colan-24-óico (ácido hiocólico)	Ácidos biliares	Sedimento	Elhmmali et al. (1997, 2000)
5 α -pregnan-3 β -ol (pregnanol)	Estanois		
5 α -pregnan-3-ono (pregnanona)	Estanones	Solo	Birk et al. (2012)
ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-óico	Ácidos biliares		
ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-23-óico (ácido norcólico)	Ácidos biliares	Fezes	Tyagi et al. (2008)
5 α -colestano	Esteróis fecais		
ácido 3 α ,6 α ,7 α -trihidroxi-5 β -colan-24-óico (ácido hiocólico)	Ácidos biliares	Solo	Bull et al. (2003), Simpson et al. (1999)
5 β -pregnan-3 α -ol (pregnanol)	Esteróis fecais		
hexatriacontano	Esteróis fecais	Água, lodo	Chaler et al. (2001)
friedelin	Ácidos biliares		
ácido colan-24-óico (ácido colânico)			
ácido 3 α ,16 α -dihidroxi-5 β -colan-24-óico (ácido hiodesoxicólico)	Ácidos biliares	Fezes	Keller et al. (2004)

Extração dos lipídios

A extração de lipídios totais pode ser obtida mediante diferentes métodos, os mais comuns são a extração por Soxhlet (BULL et al., 2003; BIRK et al., 2012; ELHMMALI et al., 1997, 2000; SIMPSON et al., 1999) e por ultrassom (CHALER et al., 2001; ISOBE et al., 2002; TYAGI et al., 2008).

A extração por Soxhlet precisa de um equipamento específico e o processo demanda pelo menos 24 h. A amostra é colocada dentro do Soxhlet e, mediante uma destilação cíclica, os lipídios são extraídos. Diclorometano e metanol é a mistura de solventes mais usadas (DCM:MeOH 2:1, v/v). Com esse tipo de extração, pode-se trabalhar com quantidades relativamente maiores de amostra (5-25 g). As principais desvantagens são o tempo longo de extração e o uso de quantidades maiores de solventes (BULL et al., 2003; BIRK et al., 2012; ELHMMALI et al., 1997, 2000; SIMPSON et al., 1999).

A extração por ultrassom é um procedimento mais simples. Quantidades menores que 5 g de amostra seca podem ser processadas. A amostra é colocada dentro de um tubo, uma mistura de solvente é adicionada e logo submetida ao ultrassom. Para 1 g de amostra, se adiciona, por exemplo, 10 mL da mesma mistura de solventes DCM:MeOH 2:1, v/v. O tempo de sonicação é relativamente curto (10-15 min). Como se forma uma solução turva, é necessário centrifugar (3.000 rpm, 3 min) para separar o sobrenadante. O processo é repetido por quatro vezes e, em seguida, juntam-se os extratos (CHALER et al., 2001; ISOBE et al., 2002; TYAGI et al., 2008).

Extração por ultrassom (TLE)

- Pesar 1 g de amostra num tubo com tampa de 10 mL, registrar a massa da amostra;
- Adicionar 100 μ L de ácido 5 β -cholanoic (25 μ g mL⁻¹);
- Adicionar 100 μ L 5 α -androstan-3 β -ol (25 μ g mL⁻¹);
- Extrair com 8 mL DCM:MeOH (2:1 v/v), misturando o sólido com o solvente em agitador vortex por 1 min e em ultrassom por 10 min, para cada extração;
- Centrifugar cada extração (3.000 rpm, 3 min);
- Com auxílio de pipeta pauster, retirar o sobrenadante e adicionar a um tubo de 15 mL com tampa;
- Repetir o processo de extração 5 vezes;
- Secar os extratos juntos sob fluxo de nitrogênio a 40 °C.

Saponificação

O extrato seco é submetido à saponificação com solução de KOH, para saponificar os ácidos orgânicos preservados como ésteres. O grupo funcional orgânico ácido é convertido a um sal de potássio (COO⁻K⁺), que poder ser separado dos compostos orgânicos neutros por meio de solventes orgânicos antes da acidificação do meio.

Diferentes condições de saponificação são descritos na literatura. Em alguns casos, as condições são suaves: 0,7 mol L⁻¹ de KOH em metanol a temperatura ambiente por 10-14 h (BIRK et al., 2012) ou 6% de KOH em metanol a temperatura ambiente durante 12 h (CHALLER et al., 2001). Em outros casos, as condições são mais vigorosas, sendo 5 mol L⁻¹ de KOH em 90% metanol e aquecimento a 120 °C durante 1 h (ELHMMALI et al., 1997, 2000; SIMPSON et al., 1999) ou 2 mol L⁻¹ de NaOH em 90% metanol e aquecimento a 100 °C por 1 h (TYAGI et al., 2008).

Saponificação

- Adicionar 5 mL de 5 M KOH em 90% MeOH;
- Deixar reagir por 1h a 120 °C;
- Agitar no vortex a cada 10 min.

Separação do extrato neutro

Após saponificação, para conseguir a separação da fração neutra (alifáticos, aromáticos; alcoóis, cetonas, incluindo estanois, estanonas, esteróis) da fração ácida (ácidos carboxílicos; hidroxiácidos, incluindo os ácidos biliares) é recomendada a extração líquido-líquido com um solvente de baixa polaridade. Os solventes mais usados são clorofórmio (BIRK et al., 2012; SIMPSON et al., 1999) e hexano (CHALLER et al., 2001; TYAGI et al., 2008).

Extrato neutro

- Extrair com 5 mL de hexano;
- Misturar em agitador vortex e aguardar a separação das fases;
- Com auxílio de pipeta pauster, pipetar a fase orgânica e passar a um balão;
- Repetir o processo de extração 4 vezes, e juntar os extratos;
- Concentrar os extratos e secar em um vial de 2 mL a 40 °C e sob atmosfera de N₂;
- Redissolver com 1 mL de hexano.

Uma alternativa para a separação dos compostos neutros dos ácidos é o uso de uma coluna de amino-propil (BULL et al., 1999). Neste caso, tanto os compostos orgânicos neutros e os ácidos orgânicos são extraídos simultaneamente após acidificação com um solvente orgânico e logo são fracionados na coluna de amino-propil. A solução básica obtida após saponificação é acidificada com 6 mol L⁻¹ de HCl até pH 3-4, seguido por extração com clorofórmio. Os extratos são secos e redissolvidos (1 mL) em DCM:isopropanol (2:1 v/v). A coluna de amino-propil é condicionada com DCM:isopropanol (2:1 v/v), a qual se adiciona o extrato redissolvido. A fração neutra contendo predominantemente alcoóis e esteróis é eluída com DCM:isopropanol (2:1 v/v). A fração ácida, que é mais polar, contendo ácidos carboxílicos e hidroxiácidos é eluída com uma solução 5% de ácido acético em éter etílico (v/v) (BULL et al., 1999).

Fracionamento do extrato neutro

Após a separação dos compostos neutros (alifáticos, aromáticos; alcoóis, cetonas, incluindo estanoís, estanonas, esteróis) dos compostos polares (ácidos carboxílicos; hidroxíácidos, incluindo os ácidos biliares), os primeiros são submetidos a fracionamento por meio de uma coluna de sílica gel. Neste fracionamento os compostos orgânicos menos polares (e.g. hidrocarbonetos) são separados daqueles mais polares (e.g. álcoois).

Fracionamento do extrato neutro

- Colocar 600 mg de sílica ativada (120 °C, 24 h) num cartucho de 3 mL no sistema de vácuo para SPE (ver Figura 3a);
- Preencher o cartucho com hexano. Se ocorrer a formação de bolhas, agitar com uma espátula removendo-as, e passar solvente até elas desaparecerem;
- Eluir o hexano até que a linha do solvente fique ± 1 mm acima do nível da sílica;
- Colocar um tubo de 10 mL por baixo, para coletar a primeira fração F1 (HC): alifáticos e aromáticos;
- Adicionar o extrato dissolvido na etapa anterior e eluir até que a linha do solvente fique ± 1 mm acima da sílica;
- Eluir a coluna com 5 mL de hexano;
- Deixar o solvente ficar ± 1 mm acima da sílica, e fechar a torneira;
- Tirar o tubo com a F1 (HC) do sistema;
- Colocar outro tubo de 10 mL por baixo, para coletar a segunda fração F2 (EF): alcoóis, cetonas, incluindo estanoís, estanonas e esteróis;
- Eluir completamente com 5 mL DCM:MeOH (2:1 v/v);
- Secar sob fluxo de nitrogênio a 40 °C em um vial de 2 mL.

Separação do extrato ácido

Após a saponificação e a extração dos compostos neutros, a solução básica é acidificada, para facilitar a extração dos compostos orgânicos ácidos.

Extrato ácido

- Depois da extração da fração neutra, o líquido é acidificado com 37% HCl:H₂O (1:1 v/v) entre pH 1-2;
- Extrair com 5 mL de hexano;
- Misturar no vortex e deixar separar as fases;
- Com uma pipeta pauster, tirar a fase orgânica e passar a um balão;
- Repetir o processo 4 vezes, juntar os extratos;
- Secar sob fluxo de nitrogênio a 40 °C em um vial de 2 mL.

Esterificação

Os ácidos orgânicos extraídos no passo precedente são esterificados. Existem diversos procedimentos para a esterificação do grupo ácido (COOH). São alguns deles: HCl em metanol com aquecimento a 80 °C durante 2 h (BIRK et al., 2012) e complexo BF₃:MEOH (CHALLER et al., 2001, BULL et al., 1999). Esses dois processos de esterificação requerem etapas adicionais de limpeza.

Um procedimento mais simples é o uso de diazometano. Neste caso, o agente esterificante é preparado com antecedência e, depois de adicionado ao extrato, deixa-se reagir e logo se procede a secagem. Assim, tem-se a amostra pronta para a sililação, sem precisar fazer as etapas de limpeza ou passar a amostra esterificada para outro frasco. Entretanto, a preparação do diazometano requer cuidados, pois o gás gerado é tóxico, sendo o uso de EPI obrigatório (luvas nitrílicas, óculos de segurança e máscara para vapores orgânicos). Além desses cuidados, todo o procedimento deve ser realizado em capela de exaustão.

Esterificação

USAR OS EPIs E TRABALHAR NA CAPELA LIGADA DURANTE TODO O TEMPO

- Preparar diazometano (ver anexos);
- Adicionar 50 μ L de metanol ao vial com a amostra;
- Adicionar 200 μ L de diazometano em éter e tampar;
- Deixar reagir 1h a temperatura ambiente;
- Secar a 40 °C em nitrogênio gasoso;
- Redissolver com 1 mL de hexano caso proceder o fracionamento (descrito a seguir).

Fracionamento da fração ácida (opcional)

Nesta fração tem-se os compostos ácidos (e.g. ácidos carboxílicos) separados dos hidroxíácidos (e.g. ácidos biliares), tendo assim uma fração com hidroxíácidos com menor interferência para ser analisada. Para isso, o extrato é submetido a um novo fracionamento após a esterificação em sílica gel.

Fracionamento da fração ácida (opcional)

- Colocar 600 mg de sílica ativada (120 °C, 24 h) num cartucho;
- Preencher com DCM:hexano (2:1 v/v);
- Se ocorrer a formação de bolhas: mexer com uma espátula, removendo-as, e passar solvente até elas desaparecerem;
- Eluir até que a linha do solvente fique \pm 1 mm acima da sílica;
- Colocar um tubo de 10 mL por baixo, para coletar a primeira fração, F1 (AC): éster metílico dos ácidos carboxílicos;
- Adicionar o extrato dissolvido na etapa anterior e eluir até a linha do solvente ficar \pm 1–2 mm acima da sílica;
- Eluir a coluna com 5 mL de DCM:hexano (2:1 v/v);
- Deixar o solvente ficar \pm 1–2 mm acima da sílica;
- Tirar o tubo com a F1 (AC);
- Colocar outro tubo de 10 mL por baixo, para coletar a segunda fração, F2 (AB): éster metílico dos hidroxíácidos;
- Adicionar 5 mL DCM:MeOH (2:1 v/v) e eluir completamente;
- Secar sob fluxo de nitrogênio a 40 °C em um vial de 2 mL.

Sililação

A sililação é a reação de derivatização mais amplamente usada para análise GC. Na sililação, um átomo de hidrogênio ativo ($-OH$, $-COOH$, $=NH$, $-NH_2$, e $-SH$) é substituído por um grupo alquilsililo, na maioria das vezes de trimetilsililo (TMS: $-Si(CH_3)_3$). Em comparação com os compostos originais, os derivados de sililo são normalmente mais voláteis, menos polares, e mais estáveis termicamente, o que ajuda na análise pelo GC, em especial com os compostos de alto peso molecular. O agente sililante mais usado é a mistura de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, contendo 1,0% de trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS). Tanto o produto sililado como o reagente são sensíveis à umidade, por isso recomenda-se que a análise seja feita em até 24 horas.

Sililação

- Adicionar o padrão de injeção (e.g. 5α -colestano, $0,25 \mu\text{g}$) a cada fração de esteróis e ácidos biliares, respectivamente F2(EF) e F2(AB) ou sem fracionamento;
- Adicionar $50 \mu\text{L}$ de BSTFA + TMCS;
- Deixar reagir a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1h no vial fechado;
- Secar sob fluxo de nitrogênio a $40 \text{ }^\circ\text{C}$;
- Diluir com $0,1 \text{ mL}$ de hexano e analisar em até 24 h.

Considerações finais

O cromatograma gerado das frações contendo os EF e AB (sem fracionamento dos ácidos carboxílicos) é apresentado na Figura 4. Esse foi obtido de uma amostra de sedimento de rio. Além das frações de EF e AB, durante o processo são geradas duas frações adicionais. A primeira contém hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos **F1(HC)**, correspondente à separação dos EF, e a outra ácidos carboxílicos **F1(AC)**, quando fracionada em sílica gel, correspondente aos AB. Essas frações contêm compostos orgânicos, que podem estar relacionados à poluição antropogênica, pois apresenta uma relação indireta com poluição por esgotos. Em resumo, o presente documento descreve um procedimento detalhado o qual permite analisar os EF dos AB por GC-MS, e fornece também alternativas descritas na literatura para possíveis alterações quando a metodologia empregada não atende a complexidade da matriz usada (*e.g.* separação dos ácidos carboxílicos dos hidroxíácidos).

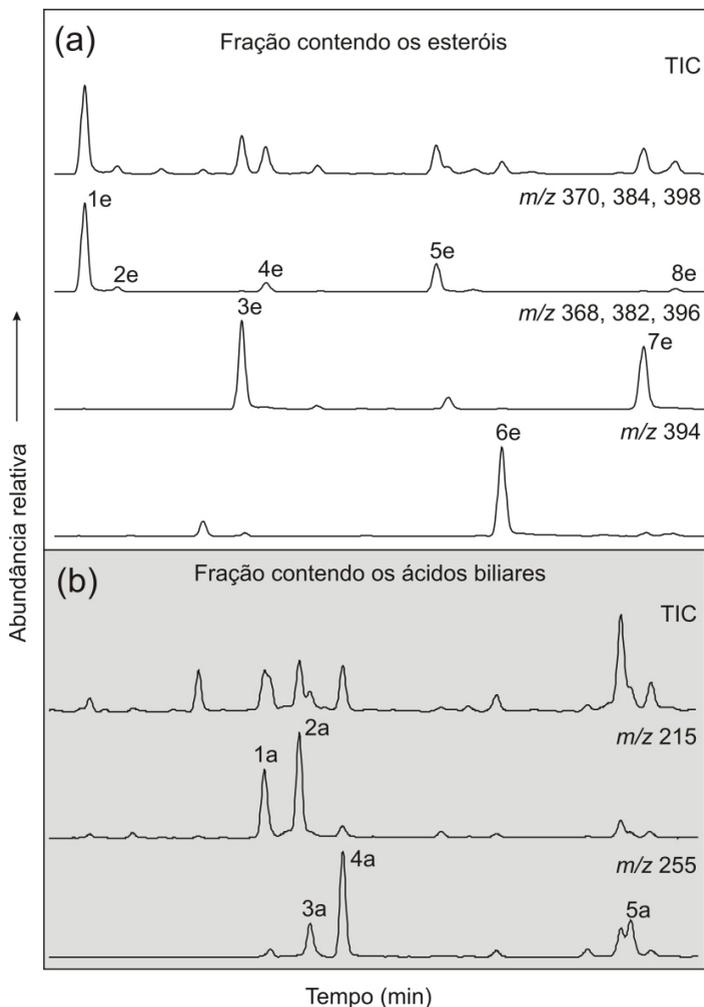


Figura 4. Cromatogramas parciais das correntes totais de íons e fragmentogramas característicos dos esteróis e ácidos biliares. Frações dos EF (a) e AB (b) (sem fracionamento dos ácidos carboxílicos), nos quais: 1e - coprostanol, 2e - epicoprostanol, 3e - colesterol, 4e - colestanol, 5e - 5 β -estigmasterol, 6e - estigmasterol, 7e - β -sitosterol, 8e - 5 α -estigmasterol, 1a - ácido litocólico (3 β), 2a - ácido litocólico (3 α), 3a - ácido desoxicólico (3 β), 4a - ácido desoxicólico (3 α), 5a - ácido hiodesoxicólico (3 α). Condições: GC - forno: 40 °C (1 min), 10 °C min⁻¹ até 150 °C, então 4 °C min⁻¹ até 310 °C (25 min), injetor (injeção 1 μ L, splitless 1 min, 290 °C), coluna: ZB - 5ms (60 m, 0,25 mm, 25 μ m); MS - fonte de íons (200 °C), 70 eV, corrente 250 mA, m/z 60 - 650, tempo total de ciclo 0,58 s.

Referências

APRILE, F. M.; DARWICH, A. J.; RAPOSO, J. C. Considerações sobre a geoquímica e dinâmica sedimentar do Lago Tupé. In: SANTOS-SILVA, E. N.; APRILE, F. M.; SCUDELLER, V. V.; MELO, S. (Org.). **Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**. Manaus: INPA, 2005. p. 69–83.

BIRK, J. J.; DIPPOLD, M.; WIESENBERG, G. L. B.; GLASER, B. Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and4 terrestrial sediments by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1242, p. 1–10, 2012

BULL, I. D.; LOCKHEART, M. J.; ELHMMALI, M. M.; ROBERTS, D. J.; EVERSLED, R. P. The origin of faeces by means of biomarkers detection. **Environment International**, v. 27, p. 647–654, 2002.

CHALER, R.; SIMONEIT, B. R. T.; GRIMALT, J. O. Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. **Journal of Chromatography A**, v. 927, p. 155–160, 2001.

CHEVREMONT, A. C.; FARNET A. M.; COULOMB, B.; BOUDENNE, J. L. Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. **Science Total Environment**, v. 426, p. 304–310, 2012.

EVERSLED, R. P.; BULL, I.; LOCKHEART, M. J.; ELHMMALI, M. M.; ROBERTS, D. J. The origin of faeces by means of biomarker detection. **Environmental International**, v. 27, p. 647–654, 2002.

EVERSLED, R. P.; ELHMMALI; ROBERTS, D. J. Bile Acids as a New Class of Sewage Pollution Indicator. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 3663–3668, 1997.

FROEHNER, S., SÁNEZ, J. Evaluation of Potential Sewage Contamination by Fecal Sterol Biomarkers Adsorbed in Natural Biofilms. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, p. 2080–2086, 2013.

ISOBE, K. O.; TARAO, M.; ZAKARIA M. P.; CHIEM N. H.; MINH, L. Y.; TAKADA, H. Quantitative Application of Fecal Sterols Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry To Investigate Fecal Pollution in Tropical Waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 4497–4507, 2002.

MACHADO, K. S.; FROEHNER, S.; SÁNEZ, J.; FIGUEIRA, R. C. L.; FERREIRA, P. A. L. Assessment of historical fecal contamination in Curitiba, Brazil, in the last 400 years using fecal sterols. **Science of The Total Environment**, v. 493, p. 1065–107, 2014.

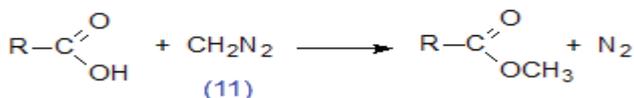
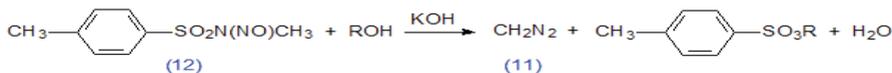
MARTINS, C. C. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 106–115, 2007.

STANDLEY, L. J.; KAPLAN, L.; SMITH, D. Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 3124–3130, 2000.

TYAGI, P.; EDWARDS, D. R.; COYNE, M. S. Use of Sterol and Bile Acid Biomarkers to Identify Domesticated Animal Sources of Fecal Pollution. **Water Air Soil Pollution**, v. 187, p. 263–274, 2009

Anexos

Esterificação com diazometano



OBS: O reagente acima poder ser substituído por N-nitro-N-metil-uréia.

Essa esterificação apresenta-se a mais adequada para a análise de compostos traços, pois ocorre em temperatura ambiente, não havendo riscos de perda dos compostos por degradação, com o mínimo efeito de matriz e sem etapas de purificação, o que ajuda na quantificação e caracterização dos compostos.

OBS: Usar corretamente todos os EPIs (máscara série 6.000, luvas de nitrila, óculos de proteção, capela sempre ligada) durante a preparação do composto e sempre que se manipular algum resíduo dele. Após o processo, neutralizar qualquer resíduo formado com sílica ácida.

O processo de esterificação por diazometano ocorre da seguinte forma:

- Secar o reagente do N-nitro-N-metil-uréia a 40 °C sob fluxo de N₂;
- Após seco, pesar 0,174 mg do composto, o que equivale a 0,134 mmol;
- O composto deve ser colocado dentro da parte superior do aparato para preparação de diazometano (Figura 2d) e depois adicionar 0,5 mL de água ultrapura. Fechar com a tampa;
- Preparar um banho de gelo;

- Adicionar com uma seringa 1 mL de KOH 55,5%, vagarosamente $\pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$; e agitar com cuidado sob o banho de gelo;
- A formação do diazometano será percebida pela aparição de cor amarelo no éter, o sistema deve ficar em repouso durante 1 h;
- Adicionar o reagente ao vial com a amostra;
- Neutralizar o resíduo com ácido salicílico e descartar apropriadamente (solvente orgânico não clorado).

OBS: Usar corretamente todos os EPIs (máscara série 6.000, luva de nitrila, óculos de proteção, capela sempre ligada) durante a preparação do composto e sempre que se manipular algum resíduo dele. Após o processo, neutralizar qualquer resíduo formado com sílica ácida.

Teste de coluna de fracionamento de esteróis fecais

Reagentes e materiais

- Sílica gel
- Hexano
- DCM
- MeOH

Preparar

- Sílica gel ativada: $120 \text{ }^\circ\text{C}$, $> 24 \text{ h}$;
- Solução teste de esteróis $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito;
- DCM:MeOH (2:1, v/v).

Procedimento

Coluna

- Preencher um cartucho com 0,6 g sílica gel ativada, adicionar solvente hexano;
- Se tiver bolhas: mexer com uma espátula, removendo-as, e passar solvente até elas desaparecerem;
- Repetir até que a coluna esteja ótima;
- Deixar o nível de solvente aproximadamente 1–2 mm acima da sílica.

Fração não polar F1 (HC): Alifáticos, Aromáticos

- Colocar um tubo de ensaio para coletar a primeira fração **F1 (HC)**;
- Adicionar 1 mL da solução contendo os analitos;
- Deixar pingar com vácuo até que o nível de solvente esteja aproximadamente 1–2 mm acima do nível da sílica;
- Adicionar pouco a pouco 5 mL de hexano, fazer vácuo, sem deixar a coluna secar;
- Coletar a fração **F1 (HC)**;
- Quando o nível de solvente estiver aproximadamente 1–2 mm acima da sílica, parar o vácuo, trocar por outro tubo para coletar a segunda fração **F2 (EF)**.

Nunca deixar a coluna secar.

Fração polar **F2 (EF)**: Alcoóis, cetonas, incluindo estanois, estanonas, esteróis

- Adicionar pouco a pouco 5 mL de DCM:MeOH (2:1, v/v);
- Coletar a fração **F2 (EF)**;
- Concentrar cada fração ate secura em um vial de 2 mL, sob fluxo de de N₂.

Derivatização

- Derivatizar com 50 µL de BSTFA, a 70 °C, 1 h;
- Secagem em fluxo de N₂;
- Diluir com 1 mL de hexano;
- Injetar no GC.

Teste de coluna de fracionamento ácidos biliares após reação de esterificação

Reagentes e materiais

- Sílica gel
- Hexano
- DCM
- MeOH
- Mix de ácidos carboxílicos (C_{15:0}, C_{19:0}, C_{22:0})

Preparar:

- Sílica gel ativada: 120 °C, > 24 h;
- Solução teste de ácido biliares 100 µg/mL de cada analito;
- DCM:hexano (2:1, v/v);
- DCM:MeOH (2:1, v/v).

Procedimento

Coluna

- Preencher um cartucho com 0,6 g sílica gel ativada, adicionar solvente hexano;
- Se tiver bolhas, sugar todo com vácuo e preencher novamente;
- Repetir até que a coluna esteja ótima;
- Deixar o nível de solvente aproximadamente 1–2 mm acima da sílica.

Fração não polar **F1 (AC)**: éster metílico dos ácidos carboxílicos

- Colocar um tubo de ensaio para coletar a primeira fração **F1 (AC)**;
- Adicionar 1 mL da solução contendo os analitos. Deixar pingar com vácuo até que o nível de solvente esteja aproximadamente 1–2 mm acima do nível da sílica;
- Adicionar pouco a pouco 5 mL de hexano, fazer vácuo. Nunca secar a coluna;
- Coletar a fração **F1 (AC)**;
- Quando o nível de solvente estiver aproximadamente 1–2 mm acima da sílica, parar o vácuo, trocar por outro tubo para coletar a segunda fração **F2 (AB)**. Nunca secar a coluna;

Fração polar **F2 (AB)**: hidroxi ácido metil éster, incluindo ácidos biliares metil éster)

- Adicionar pouco a pouco 5 mL de DCM:MeOH (2:1, v/v)
- Coletar a fração **F2 (AB)**;
- Concentrar cada fração em um vial de 2 mL, baixo atmosfera de N₂.

Derivatização

- Derivatizar com 50 µL de BSTFA, @ 70 °C, 1 h;
- Secagem sob baixa atmosfera de N₂;
- Diluir com 1 mL de nhexano;
- Injetar no GC.

Embrapa

Florestas