

LÍPIDIOS, SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, LIGNINAS E METAIS – UMA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO A PARTIR DE UMA MESMA AMOSTRA DE SEDIMENTO

Airton B. de Barros, Angela M.A. de Barros
 Depto. Físico-Química, Instituto de Química, UFF, RJ, Brasil
 Marie-Thérèse M.-Kerfourn
 Institut de Géologie, Université de Rennes, França

Recebido em 06/06/90

The isolation and characterization of a range of organic compounds such as hydrocarbons, fatty acids, sterols, polyalcohols, terpenes, glycerol and of macromolecules such as lignins and humic compounds were done on a single 20 g sample of dry sediment, using an integrated extraction method, consisting of 83 sequential steps. The main consideration for these steps is the isolation of each fraction without destruction of the other fractions existing in the sediment. This approach was carried out with superficial sediment samples from Guarapina Lagoon, RJ.

INTRODUÇÃO

Várias são as substâncias orgânicas utilizadas nos estudos geoquímicos como marcadores ou traçadores ambientais, sendo que a maioria dos métodos empregados não fornecem resultados analíticos muito precisos em função das baixas concentrações de matéria orgânica presente nos sedimentos. Um sedimento considerado rico do ponto de vista orgânico, pode apresentar uma concentração de 5 a 10% dessas substâncias, o que representa, para uma classe de interesse, concentrações da ordem de ppm¹.

Essa baixa concentração exige um volume importante de material coletado (o que nem sempre é possível ou economicamente viável) ou o aperfeiçoamento de técnicas analíticas que permitem um rendimento bastante elevado, sem destruição de frações outras, durante os processos de separação e identificação.

O trabalho aqui apresentado corresponde a um protocolo experimental em que várias técnicas (já utilizadas isoladamente) de extração e separação de componentes orgânicos de um material sedimentar, foram integradas e aperfeiçoadas de maneira a permitir o isolamento e a caracterização química de um grande número de substâncias orgânicas a partir de uma mesma amostra e utilizando a menor quantidade possível de matéria bruta²⁻⁴.

EXPERIMENTAL

O sedimento é seco em estufa a vácuo e homogeneizado, sendo retirada uma alíquota para determinação do teor de carbono orgânico (COT) em Leco WR-12.

Segue-se uma acidificação com HCl 6N até a obtenção da relação 10ml/g de sedimento (Fig. 1). Procede-se a uma centrifugação a 20000g e a 5°C em centrífuga refrigerada Konttron H401, rotor A6.14 (6x290 ml) onde o sobrenadante AFLB (ácidos fúlvicos "leves" brutos) é estocado à baixa temperatura para posterior análise. O sedimento descarbonatado é alcalinizado com NaOH 0,1N sob atmosfera inerte e centrifugado nas mesmas condições. O resíduo correspondente LL (ligninas + lipídios) é estocado enquanto o sobrena-

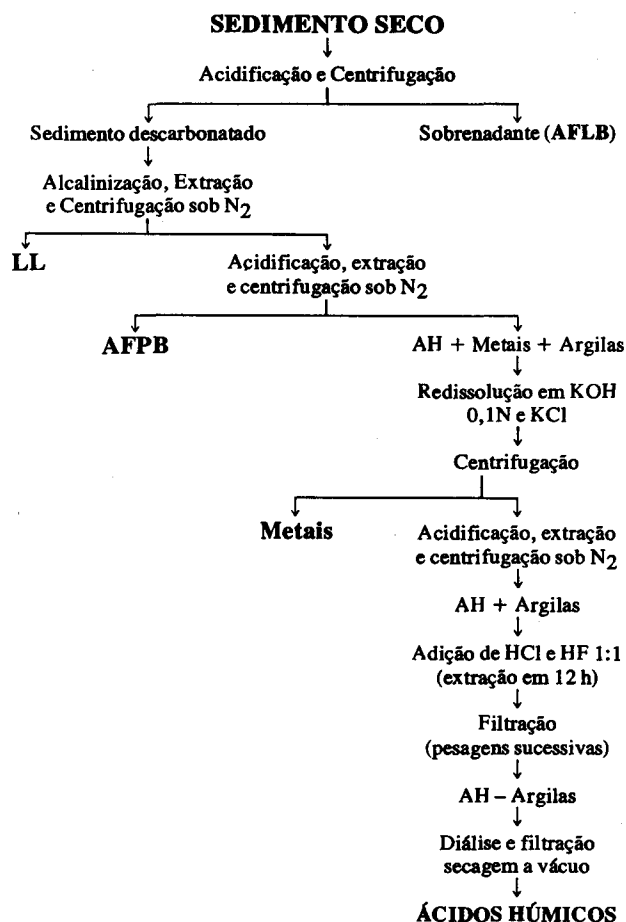


Figura 1. Separação dos ácidos fúlvicos "leves" brutos (AFLB), ácidos fúlvicos "pesados" brutos (AFPB), ligninas + lipídios (LL), metais e ácidos húmicos (AH).

dante é acidificado, decantado e centrifugado. A fração correspondente aos AFPB (ácidos fúlvicos "pesados" brutos) é estocada em geladeira para o prosseguimento da análise. Uma redissolução do resíduo (ácido húmicos + metais + argilas) é efetuada com KOH 0,1 N sob nitrogênio. Adiciona-se até

A fração de esteróis isolada por ccf é dissolvida em cloreto de propionila e aquecida em banho-maria por 15 min. Evapora-se a vácuo a 80°C e os cristais obtidos são dissolvidos em éter etílico; evapora-se a seco sob nitrogênio. Obtém-se desse modo os ésteres propiónicos que são levados à análise por GC^{17,18}.

Após a extração dos lipídios da fração LL, determina-se a porcentagem de carbono orgânico e o resíduo obtido é triturado e peneirado (0,315 mm) até a obtenção de um pó bem fino e homogêneo (Fig. 4); as operações seguintes são feitas sob atmosfera inerte e correspondem à reação de oxidação das ligninas para a obtenção dos seus produtos fenólicos.

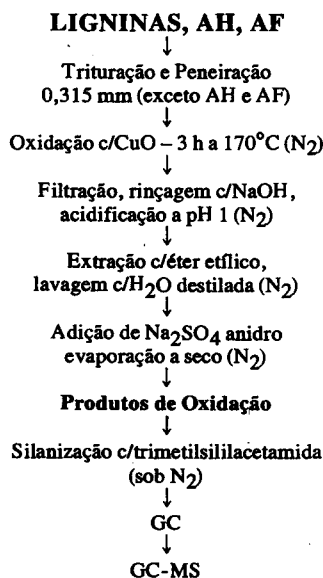


Figura 4. Oxidação c/CuO das ligninas, ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) - obtenção dos produtos fenólicos.

Num reator cilíndrico de aço inoxidável, procede-se à oxidação de 2 gramas de resíduo obtido (ligninas) ou 20 mg (AH ou AF). Adiciona-se 1 grama de óxido de cobre, 50 mg de sulfato ferroso amoniacal e 7 ml de NaOH a 1%. A mistura é aquecida a 170°C durante 3 horas; finda a reação, o reator é resfriado em água corrente, o seu conteúdo filtrado e rinçado 3 vezes com NaOH e acidificado com HCl 6N; seguem-se 3 extrações consecutivas com éter etílico, lavagem com água, secagem, filtração, evaporação a seco, pesagem e estocagem sob nitrogênio.

Os produtos de oxidação obtidos a partir das ligninas, são silanizados com a trimetilsililacetamida uma hora antes das análises cromatográficas e identificados contra padrões sendo utilizada a etilvanilina como padrão interno¹⁹⁻²⁴.

RESULTADOS

Nas tabelas abaixo são apresentados os resultados das análises de 4 amostras de sedimentos superficiais da Lagoa de Guarapina, RJ, com a finalidade de ilustrar o método. A interpretação geoquímica desses resultados, bem como de várias outras amostras analisadas, fará parte de outra publicação.

Os resultados das análises cromatográficas dos produtos de oxidação das ligninas e dos ácidos húmicos são apresentados na tabela 2. Tais fenóis não foram observados nas frações de ácidos fúlvicos "leves" e "pesados".

Tabela 1. Resultados gravimétricos das frações isoladas e % COT.

Amostras (*)	09	10	11	12
Sedimento bruto (g)	20,0	20,0	20,0	20,0
% C.O.T.	6,1	10,0	8,0	4,1
Metais	22,9	139,7	171,6	1294,8
Ácidos húmicos	132,5	29,5	97,4	86,4
Ácidos fúlvicos leves	3,3	2,1	2,1	8,7
Ácidos fúlvicos pesados	4,8	5,5	5,8	13,4
Fração insaponificável	14,2	3,6	18,2	7,7
Ácidos totais	47,1	8,9	46,8	19,5
Glicerol	112,0	67,0	82,0	101,4
Ácidos graxos	2,2	2,3	1,3	0,9
Esteróis	3,8	0,9	3,5	2,7
Poliálcoois e terpenos	0,8	0,7	1,8	1,2
Hidrocarbonetos alifáticos	0,1	0,5	0,4	0,4
Hidroc. arom./alícíclicos	0,3	0,2	0,1	0,2
Produtos de oxid. ligninas	5,8	2,3	2,1	1,7
Prod. oxidação ac. húmicos	2,2	1,0	1,2	1,1
Prod. oxid/ac. fúlvicos leves	0,7	2,7	3,0	0,7
Prod. oxid/ac. fúlvicos pesados	2,0	1,7	1,4	0,5

Valores expressos em mg.

(*) Os números 9, 10, 11 e 12 correspondem ao código das amostras na série amostrada.

Tabela 2. Resultados das análises cromatográficas nas frações de ligninas e ácidos húmicos.

Amostras	09	10	11	12	
LIGNINAS	Fenóis vanílicos	282,4	51,7	8,0	64,5
	Fenóis siringílicos	201,6	21,8	nd	25,3
	Fenóis cinamílicos	0,0	0,0	0,0	0,0
	Fenóis p-hidroxfílicos	285,8	15,9	22,7	34,7
	Massa total dos 14 padrões (%)	15,1	4,4	2,5	9,1
	AC. HÚMICOS	Fenóis vanílicos	nd	31,3	nd
Fenóis siringílicos		0,0	37,0	nd	29,4
Fenóis cinamílicos		0,0	0,0	3,3	6,7
Fenóis p-hidroxfílicos		48,2	45,0	46,3	54,2
Massa total dos 14 padrões (%)		3,6	13,5	5,6	11,0

Valores expressos em µg.

Fenóis vanílicos	- ácido vanílico + acetovanilona + vanilina.
Fenóis siringílicos	- ácido siringílico + acetosiringona + siringaldeído.
Fenóis cinamílicos	- ácido p-cumárico + ácido ferúlico.
Fenóis p-hidroxfílicos	- ácido p-hidroxibenzóico + p-hidroxiaacetofenona + p-hidroxibenzaldeído.

nd - não determinado.

0,0 - ausente.

Condições cromatográficas: coluna 100-270°C (2°C/min); injetor 250°C; detector 300°C; volume 1 µl.

Tabela 3. Resultados das análises cromatográficas nas frações de esteróis.

Amostras	09	10	11	12
Colesterol	0,83	0,18	0,46	0,43
Ergosterol	nd	nd	0,19	0,18
Campesterol	0,27	nd	0,13	0,19
Estigmasterol	0,23	0,07	0,25	0,24
Lanosterol	0,11	0,06	0,08	0,13
Beta Sitosterol	1,42	0,56	1,00	0,46

Valores expressos em mg.

Condições cromatográficas: coluna 260-290°C (1°C/min); injetor 260°C; detetor 300°C; volume 1 µl.

Tabela 4. Resultados das análises cromatográficas nas frações de ácidos graxos.

Amostras	09	10	11	12
Ácido mirístico	0,007	0,006	0,021	0,010
Ácido pentadecanóico	0,000	0,000	0,012	0,005
Ácido palmítico	0,053	0,041	0,118	0,056
Ácido margárico	0,006	0,000	0,009	0,005
Ácido esteárico	0,046	0,027	0,024	0,033

Valores expressos em mg.

Condições cromatográficas: coluna 120-250°C (2°C/min); injetor 160°C; detetor 270°C; volume 1 µl.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O método acima descrito foi testado em várias amostras de água, sedimentos superficiais e testemunho. Os resultados parciais aqui apresentados tiveram por objetivo mostrar a viabilidade da metodologia em questão. A interpretação geoquímica desses resultados e dos demais fará parte de outra publicação.

A quantidade necessária de sedimento de partida depende, evidentemente, do seu teor em carbono orgânico. A tabela 1 permite estimar um rendimento médio para cada operação.

A principal limitação do método consiste no tempo gasto para o desenvolvimento das etapas a serem cumpridas durante o processo de extração e purificação, o que, evidentemente, aumenta os riscos de contaminação e perda de material. Por outro lado, a purificação das frações facilita as análises cromatográficas bem como garante um maior rendimento e durabilidade das colunas.

Dadas as baixas concentrações de material orgânico presente e a complexidade do método, a pureza dos reagentes (que implica em destilações sucessivas), os cuidados especiais com a vidraria (lavagens consecutivas e criteriosas) e um exaustivo tratamento de regeneração das resinas, tornam-se indispensáveis.

Sérios cuidados devem ser tomados com o material húmico e os produtos fenólicos das ligninas, a fim de evitar oxidação. O tratamento dessas frações deve ser feito sob atmosfera inerte em câmara apropriada.

Durante a extração das frações de ácidos fúlvicos foram utilizadas as denominações "pesados" e "leves", que correspondem aos seus diferentes comportamentos durante o processo de centrifugação e não estão relacionados com os seus pesos moleculares.

Os resultados gravimétricos tiveram por finalidade um acompanhamento do processo analítico para fins de controle de perdas e evidenciaram um aumento acentuado na concentração de metais da amostra 12, fato que pode ser explicado geoquimicamente como um provável fator de poluição.

Nas análises cromatográficas dos fenóis, estes diferentes produtos aparecem agrupados, de modo a permitir a caracterização dos vegetais que contribuíram na formação dos sedimentos.

O emprego deste método de separação e purificação permite uma abrangência de resultados que poderão ser explorados por diversos especialistas atuando em projetos multidisciplinares.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pelo apoio financeiro através do Programa CAPES-COFECUB.

REFERÊNCIAS

- Aizenshtat, Z.; Baedeker, M.J.; Kaplan, I.R.; *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1973), 45, 1881.
- Barros, A.B.; "Evolution des lipides dans les sédiments holocènes récents de la lagune de Guarapina, Rio de Janeiro, Brésil"; Tese de doutorado, École Nationale de Chimie de Rennes, Université de Rennes I, França (1986).
- Barros, A.M.A.; "Evolution du taux des produits d'oxydation des lignines, des acides humiques et des acides fúlviques dans les sédiments holocènes récents de la lagune de Guarapina, Rio de Janeiro, Brésil"; Tese de doutorado, École Nationale de Chimie de Rennes, Université de Rennes I, França (1986).
- Morzadec-Kerfourn, M.T.; Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; *Rev. Soc. Nat. Elf Aquitaine*, França (1990). In Press.
- Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; Boutry, J.L.; Brault, A.; Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília, DF (1987).
- Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; Boutry, J.L.; Brault, A. e Morzadec-Kerfourn, M.T.; 4th International Meeting IHSS, Sevilha, Espanha (1988).
- Harvey, G.R. and Boran, B.A.; In: Aiken, G.R.; McKnight, D.M. Wershaw, R.L. and MacCarthy, P. (Eds). *Humic Substances in Soil, Water and Sediment: Geochemistry, Isolation and Characterization*. Wiley-Interscience. New York (1985).
- Stevenson, F.J.; *Humus Chemistry*. Wiley-Interscience. New York (1982).
- Saliot, A.; Tissier, M.; Février, M.; Tusseau, D.; Ewald, M.; Bousuge, C.; *Orgon II - Atlantique - N. - E. Brésil.* (1975), 233.
- Smith, D.J.; Eglinton, G.; Morris, R.J.; *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (1986) 319, 375.
- Barros, A.B.; Barros, A.M.A.; Boutry, J.L.; Brault, A.; 39a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília, DF (1987).
- Barros, A.B.; Barros, A.M.A.; Boutry, J.L., Brault, A.; Morzadec-Kerfourn, M.T.; I Congresso Latinoamericano de Geoquímica Orgânica, Rio de Janeiro, RJ (1988).
- Sanchez, B.A.S.; Mc Alister, J.J.; Barros, A.B.; Barros, A.M.A.; II Congresso Latinoamericano de Geoquímica Orgânica, Caracas, Venezuela (1990).

14. Farrington, J.W.; Quinn, J.G.; *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1971), 35, 735.
15. Barros, A.B.; Barros, A.M.A.; Boutry, J.L.; Brault, A.; XXVII Congresso Brasileiro de Química, Niteroi, RJ (1987).
16. Barros, A.B.; Barros, A.M.A.; Sanchez, B.A.S.; Rodrigues, R.; Concha, F.J.M.; II Congresso Latinoamericano de Geoquímica Orgânica, Caracas, Venezuela (1990).
17. Saliot, A.; Barbier, M.; *Deep-Sea Research.* (1973), 20, 1077.
18. Barros, A.B.; Boardman, M.R.; 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Campinas, São Paulo (1982).
19. Hedges, J.I.; Parker, P.L.; *Geochim. Cosmochim. Acta* (1976), 40, 1019.
20. Hedges, J.I.; Mann, D.C.; *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1979), 43, 1803.
21. Barros, A.M.A.; Boardman, M.R.; 34a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Campinas, São Paulo (1982).
22. Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; Bidone, E.D.; *Atlantica* (1982), 5, 2.
23. Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; Boutry, J.L.; Brault, A.; *Anais do I Congresso Brasileiro de Geoquímica* (1987) 2, 493.
24. Barros, A.M.A.; Barros, A.B.; Sanchez, B.A.S.; Rodrigues, R.; Concha, F.J.M.; II Congresso Latinoamericano de Geoquímica Orgânica, Caracas, Venezuela (1990).