

2

MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares podem ser definidos como compostos cujas estruturas estão ligadas a origens específicas (Takada e Eganhouse, 1998). Graças a suas estruturas únicas, podem gerar informações específicas difíceis de se obter por outras aproximações. Compostos orgânicos relacionados estruturalmente a fontes biológicas específicas, utilizados como marcadores, podem ser denominados biomarcadores (Eganhouse, 1997).

Marcadores moleculares são aplicados a várias ciências da Terra (paleoclimatologia, petroquímica, química ambiental, etc.) e são divididos em três categorias: marcadores biogênicos contemporâneos, biomarcadores fósseis e marcadores antropogênicos (Eganhouse, op. cit.).

Marcadores moleculares biogênicos são utilizados para identificar fontes biogênicas de matéria orgânica e para caracterizar a estrutura e atividade das comunidades microbianas. Exemplos são a lignina, os esteróis, pigmentos (clorofilas e carotenóides), os terpenóides, os ácidos graxos, os álcoois graxos, os fosfolipídios, etc (Takada e Eganhouse, 1998).

Biomarcadores fósseis são compostos residuários da matéria orgânica biogênica e de seus produtos diagenéticos. Incluem os n-alcenos, os triterpanos, os isoprenóides acíclicos, os esteranos, etc., que podem ser úteis, entre outros, na identificação de fontes de contaminação por petróleo em ambientes aquáticos (Volkman *et al.*, 1997).

Os marcadores moleculares antropogênicos são compostos orgânicos introduzidos no ambiente através de atividades humanas relativamente recentes, portanto estão mais relacionados à contaminação ambiental (Takada *et al.*, 1997). O coprostanol e outros esteróis são exemplos de marcadores moleculares antropogênicos amplamente utilizado no mapeamento de efluentes domésticos. A aplicação de marcadores antropogênicos segue o seguinte critério (Eganhouse, op. cit.):

- Fontes dos poluentes e/ou seu meio de transporte (partículas, fase aquosa);
- Distribuição e concentração de poluentes;
- Informação geocronológica.

Quando marcador molecular é utilizado para obter informações sobre fonte, transporte ou concentração de outros contaminantes, a similaridade e/ou a diferença entre as propriedades físico-químicas do marcador molecular e do contaminante de interesse devem ser consideradas. A propriedade mais importante que controla a concentração de poluente num ambiente aquático é a solubilidade, daí a relevância de se conhecer o coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) (índice de hidrofobicidade) e da solubilidade dos compostos (Takada e Eganhouse, 1998).

Valores do $\log K_{OW}$ são apresentados na figura 1-A e a solubilidade na figura 1-B para alguns marcadores moleculares, incluindo o coprostanol.

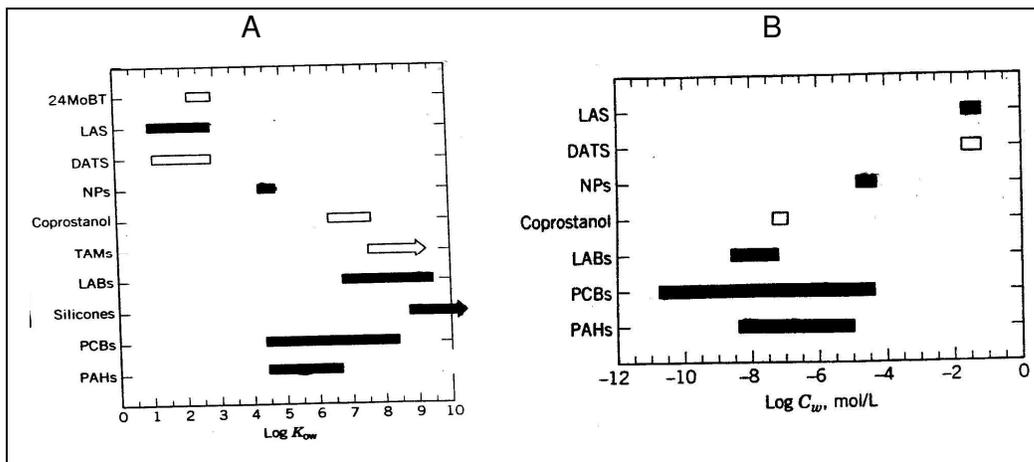


Figura 1: A - Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) dos marcadores moleculares e de alguns micropoluentes orgânicos. B - Solubilidades dos marcadores moleculares e alguns micropoluentes orgânicos. Onde: (■) indica valores determinados experimentalmente; (□) indica valores estimados; 24MoBT = 2(4-morfolinil)benzotiazol; LAS = alquilbenzenosulfonatos lineares; DATS = dialquiltetralinsulfonatos; NPs = nonilfenóis; LABs = alquilbenzenos lineares; silicones = poliorganosiloxanos; PCBs = bifenis policlorados (bifenis monoclorados a bifenis decaclorados); PAHs ou HPAs = hidrocarbonetos poliaromáticos (3 a 5 anéis); APR = aminopropanonas; TAMs = trialquilaminas; LANs = alquilnitrilas de longa cadeia; DSBP = 4,4'-bis(2-sulfostriril)bifenil; e α -TA = α -tocoferil acetato. Para o coprostanol, K_{OW} é estimado a partir da solubilidade do colesterol. *Fonte:* Takada e Eganhouse (1998).

Os esteróis são marcadores hidrofóbicos utilizados no estudo do transporte e das fontes de poluentes hidrofóbicos de mesma origem. Muitos compostos hidrofóbicos acumulam nos tecidos de organismos vivos e/ou em sedimentos, onde persistem por décadas, provando sua resistência a alterações diagenéticas, ou sendo degradados a outros compostos (Takada e Eganhouse, op. cit.).

As maiores fontes de poluição para o ambiente aquático são os efluentes municipais, que podem ser domésticos e industriais (Takada e Eganhouse, op. cit.). Embora a proporção destes dois tipos seja variável, os efluentes domésticos são o maior contribuinte antrópico para a de Baía de Guanabara (CIBG, 2005).

Os efluentes domésticos podem ser divididos em duas categorias, os que compõem-se de excrementos e urina humanos - *blackwater* (fezes e urina); e os derivados do descarte de pias, chuveiros, lavanderia e outras atividades domésticas - *graywater*. Em países da Europa e nos Estados Unidos a *blackwater* e a *graywater* são tratados juntos. Entretanto no Japão e em alguns países asiáticos são tratados separadamente (Takada e Eganhouse, op. cit.). No Brasil e em outros países, normalmente os efluentes domésticos não tratados são introduzidos em rios via pequenas e numerosas fontes, são as fontes não pontuais, difusas, sendo então transportados aos ambientes lacustre e marinho (Takada e Eganhouse, op. cit.).

Assim, marcadores moleculares de efluentes municipais também podem ser divididos em dois grupos: produtos naturais e produtos sintéticos. Os marcadores são utilizados nesses efluentes para identificar as plumas e para estimar o grau de diluição, além de estimar a contribuição de efluentes para sedimentos oceânicos.

A figura 2 mostra a faixa de concentração típica de marcadores moleculares encontrada em efluentes domésticos.

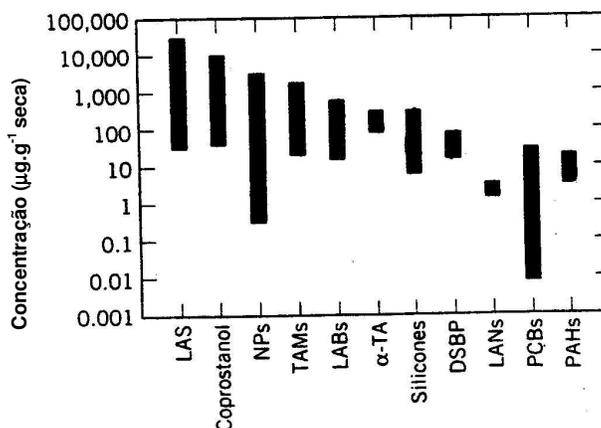


Figura 2: Concentrações dos marcadores moleculares, incluindo o coprostanol, e de alguns micropoluentes orgânicos em efluentes domésticos. Todos os tipos de esgoto estão combinados nessa representação (bruto, primário, ativado e com digestão anaeróbica). Veja a figura 1 para as definições dos acrônimos. *Fonte:* Takada e Eganhouse (1998).

Os lipídios apresentam boa especificidade em relação à sua origem e são mais resistentes à degradação microbiana, por isso atuam como eficientes marcadores moleculares. São substâncias hidrofóbicas, solúveis em solventes orgânicos apolares. São divididos em lipídios neutros: ácidos graxos, esteróis livres, hidrocarbonetos, ceras e ésteres de glicerol; e lipídios polares: principais constituintes das membranas celulares desempenhando as funções de receptor, transmitir sinais intra e extra-celulares (são os fosfolipídios, pigmentos e lipoproteínas) (Saliot, 1994).

Os lipídios representam cerca de 10 a 25 % do carbono orgânico particulado em águas superficiais (Dachs *et al.*, 1999). Apesar de não serem tão abundantes como as proteínas e carboidratos, possuem uma importante função no ciclo do carbono. Apresentam caráter refratário, são excelentes estoques de energia, constituindo uma rica fonte nutritiva e atuam no controle das atividades biológicas (Parrish, 1998).

Neste trabalho, dentre os lipídios marcadores, foram utilizados os esteróis.

2.1. Esteróis

Os esteróis, cuja estrutura básica é apresentada na figura 3-B, são compostos derivados do perhidrociclopentafenantreno, cuja cadeia carbônica é apresentada na figura 3-A.

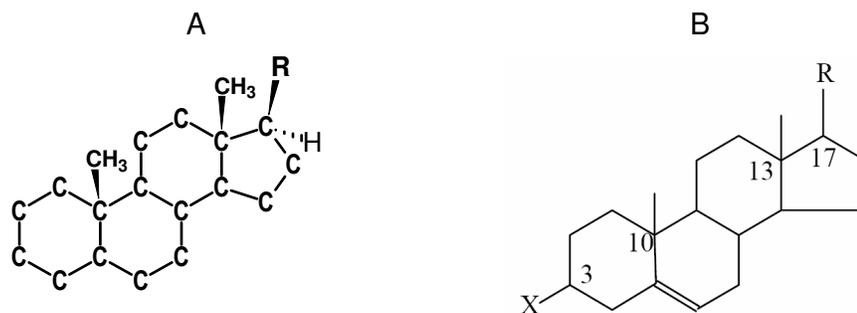


Figura 3: A - Estrutura do perhidrociclopentafenantreno. B - Estrutura básica de um estero. *Fonte:* A – Steraloids (2006); B – Martins (2001).

A tabela 1 apresenta algumas características básicas dos esteróis identificados neste trabalho e nas figuras 4 e 5 estão representadas suas estruturas.

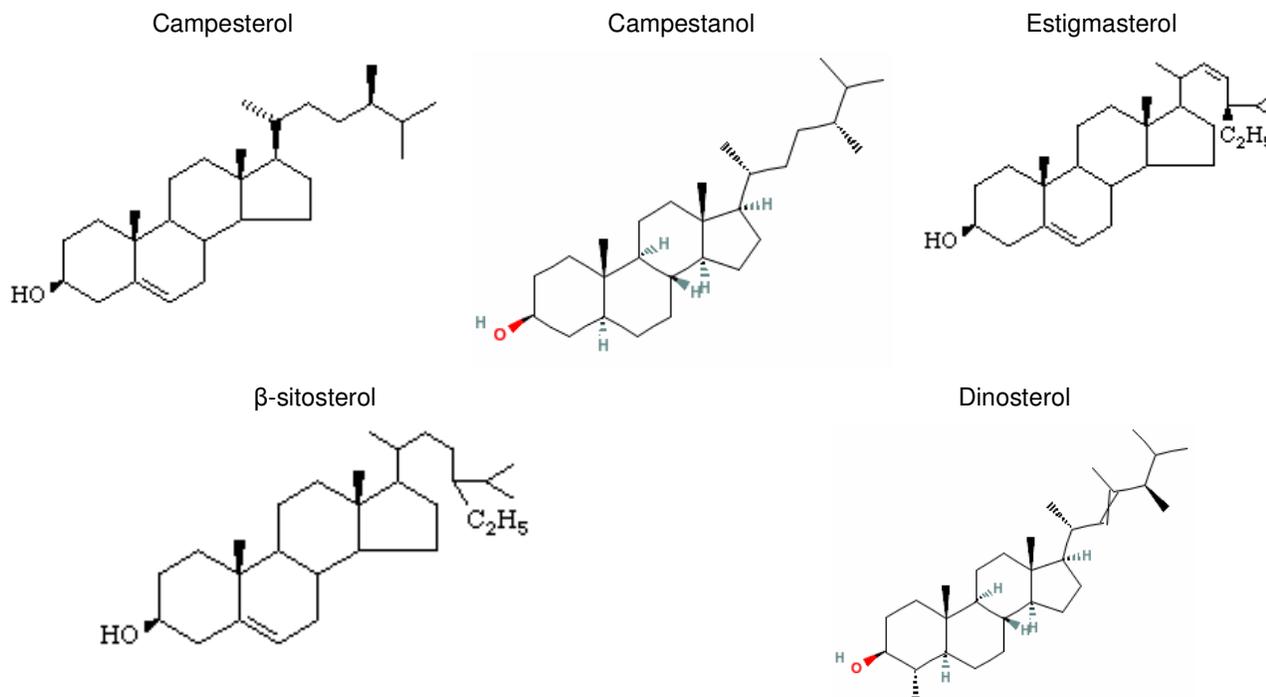


Figura 4: Estrutura de esteróis identificados neste estudo. *Fonte:* Steraloids (2006); NCBI (2005).

Tabela 1: Nomenclatura química e informações dos esteróis quantificados neste estudo.

NOME USUAL	SINÔNIMOS	NOMENCLATURA	FÓRMULA	PM	PONTO DE FUSÃO (°C)	INFORMAÇÃO AMBIENTAL
Androstanol (PR)		5 α -androstan-3 β -ol	C ₁₉ H ₃₂ O	276,5	-	Recuperação analítica
Colestano (PI)		5 α -colestano	C ₂₇ H ₄₈	372,67	78 - 80	Quantificação
Coprostanol	Coprostan-3-ol	5 β -colestano-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,67	105 - 106	Traçador de esgotos
Epi-colestanol	α -colestanol / epi-diidrocolesterol	5 α -colestano-3 α -ol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,67	181 - 182	Esgoto antigo, ambiente eutrofizado
Epi-coprostanol	Epi-coprosterol	5 β -colestano-3 α -ol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,67	112 - 113	Esgoto tratado e fezes mamíferos aquáticos
Coprostanona	Coprostan-3-one	5 β -colestano-3-one	C ₂₇ H ₄₆ O	386,65	61 - 62	Esgoto degradado, ambiente óxico
Colesterol		5-colesten-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	386,65	148 - 150	Ampla ocorrência, degradação, fito e zooplâncton
Colestanol	β -colestanol; diidrocolesterol	5 α -colestano-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,67	143 - 144,5	Diatomáceas, redução <i>in situ</i> do colesterol
Colestanona	3-keto-5 α -colestano	5 α -colestano-3-one	C ₂₇ H ₄₆ O	386,65	129 - 130	Esgoto degradado, ambiente óxico
Campesterol		5-colesten-24-metil-3 β -ol	C ₂₈ H ₄₂ O	394,63	157 - 158	Plantas superiores, diatomáceas e clorofíceas
Campestanol	24 β -etilcolestanol	colestano-24-metil-3 β -ol	C ₂₈ H ₅₀ O	402,67	-	Idem campesterol
Estigmasterol		5,22-colestadien-24-etil-3 β -ol	C ₂₉ H ₄₈ O	412,69	166 - 168	Plantas superiores
β-sitosterol	24 α -etilcolesterol; cinchol	5-colesten-24-etil-3 β -ol	C ₂₉ H ₅₀ O	414,71	140 - 142	Plantas superiores, esgoto
β-sitostanol		5 α -colestano-24-etil-3 β -ol		-	-	Idem β -sitosterol
Dinosterol		4 α ,23,24-trimetilcolest-22-en-3 β -ol	C ₃₀ H ₅₂ O	428,73	-	Dinoflagelados
Dinosterol-8(14)		4 α ,23,24-trimetilcolest-8(14)-en-3 β -ol		-	-	Idem dinosterol

Legenda: PR – Padrão de Recuperação; PI – Padrão Interno; PM – Peso Molecular. Fonte: Steraloids (2006); NCBI (2006).

2.2. Esteróis fecais

Os esteróis fecais são aqueles derivados do colesterol, produzidos ainda no trato intestinal de animais superiores. Os esteróis fecais identificados neste estudo são: coprostanona, coprostanol e colestanona. Aqui, classificamos também seus isômeros, produzidos no ambiente, como esteróis fecais, por indicarem contaminação fecal, são eles: epi-coprostanol, epi-colestanol e colestanol.

O coprostanol é o esteroide fecal prevacente em fezes humanas, no adulto ele compreende de 24 a 89 % do total de esteróis; o colesterol varia de 1,4 a 65 % (Walker, 1995). A coprostanona é o esteroide fecal minoritário (< 6 %) (Grimalt *et al.*, 1990). Dois estereoisômeros do coprostanol, o colestanol e o epi-coprostanol, também são compostos traçadores de fezes humanas. A maioria dos esteróis fecais é encontrada em vários organismos como bactérias, algas, zooplâncton e protozoa, porém, o coprostanol não é encontrado em organismos menores (Takada e Eganhouse, 1998).

Segundo a literatura (Björkhem e Gustafsson, 1971; Nishimura, 1977; Huang e Meinschein, 1979; Nishimura, 1982; Mermoud *et al.*, 1984; Mermoud *et al.*, 1985; Wakeham, 1987; Venkatesan e Santiago, 1989), o colesterol pode sofrer degradação bacteriana ainda no intestino ou *in situ* no ambiente formando esteróis que são importantes marcadores moleculares. Um resumo das vias de degradação do colesterol que produzem esteróis já encontrados no ambiente está representado na figura 5 e descrito a seguir.

Pode ocorrer a hidrogenação da ligação dupla dos carbonos C₅ e C₆ do colesterol envolvendo a formação da estenona de colest-4-en-3-ona (via I da figura 5). A estenona é reduzida a 5 β (H)-colestan-3-ona (via V) - colestanona; e a 5 β (H)-colestan-3-ona (via II) - coprostanona. As estanonas são então reduzidas aos estanóis: colestanona a colestanol (via VI) e coprostanona a coprostanol (via III). Pode ocorrer o processo de conversão de estanóis a estanonas novamente, principalmente em ambiente óxicos. O coprostanol pode ser convertido a coprostanona (via IV) e colestanol pode ser convertido a colestanona (via VII). Também foi reportada a degradação direta do colesterol a coprostanol (via VIII) e a colestanol por bactérias anaeróbicas (via IX). E ocorre ainda a epimerização dos estanóis a seus outros dois estereoisômeros, convertendo coprostanol a epi-coprostanol (X) e colestanol a epi-colestanol (XI).

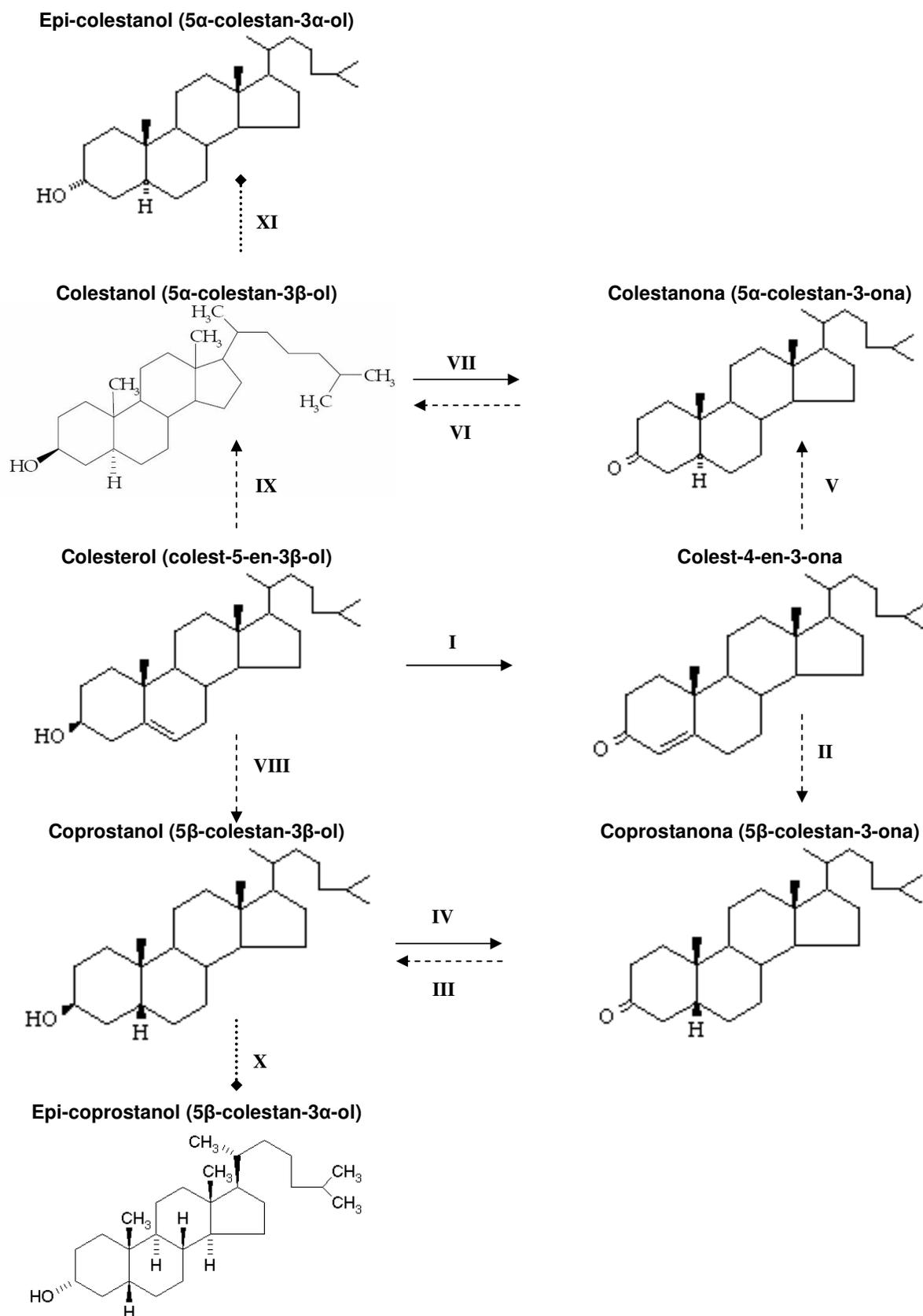


Figura 5: Possíveis vias de degradação do colesterol e formação dos outros esteróis fecais.
 Legenda: (\longrightarrow) Via oxidativa; (\dashrightarrow) Via Redutora; ($\cdots\blacklozenge$) Epimerização.
 Fonte: Adaptado de Takada e Eganhouse (1998).

2.3. Coprostanol

O coprostanol é o esteroide fecal mais utilizado como marcador molecular de efluentes domésticos. Os outros esteróides, assim como razões entre eles, são sempre utilizados como ferramentas auxiliares e complementares na interpretação da distribuição deste esteroide.

Em temperatura ambiente o coprostanol é um sólido cristalino branco de massa molecular 388,67 e seu ponto de fusão é entre 105-106 °C (Steraloids, 2006). É hidrofóbico e solúvel em hexano, diclorometano, éter, clorofórmio e etanol. A solubilidade do coprostanol não foi reportada mas é estimada a partir da solubilidade do colesterol: $2,6 \cdot 10^{-5} \text{ g.L}^{-1}$ ($6,7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$). Seu coeficiente de partição (K_d , em L.g^{-1}) foi reportado por (Bayona *et al.*, 1997) com valor de $19,3 \pm 2,3$. A via I (figura 5) é comumente relatada na literatura como a via preferencial da formação do coprostanol, mas muitos experimentos relatam a produção *in situ* deste esteroide através da redução direta do colesterol (Björkhem e Gustafsson, 1971; Nishimura, 1982; Ren *et al.*, 1996; Sun e Wakeham, 1998).

As taxas de excreção humana *per capita* variam de 82 a 1.272 mg de coprostanol por dia. As concentrações de coprostanol nas fezes humanas também são variáveis, numa média de 4,1 a 21,3 mg.g^{-1} (Takada e Eganhouse, 1998). Entretanto, o coprostanol também pode ter outras fontes além das excretas humanas, o que faz com que possa ser encontrado em regiões onde não haja fonte conhecida de esgoto. São propostas duas possíveis fontes de coprostanol onde há ausência de esgoto: redução do colesterol *in situ* e fezes de mamíferos marinhos e terrestres (Venkatesan e Santiago, 1989; Grimalt *et al.*, 1990; Takada e Eganhouse, *op. cit.*).

Apesar do isômero 5α ser mais estável termodinamicamente, as proporções entre os isômeros 5α e 5β variam dependendo da comunidade microbiana responsável pela redução dos esteróides. Em alguns experimentos o coprostanol foi formado em quantidades iguais ou superiores ao colestanol. Em testemunhos sedimentares a proporção de colestanóis para a de colesterol aumenta com a profundidade. Tais resultados sugerem que a redução do colesterol ocorra durante a diagênese recente. Assim, a produção *in situ* de coprostanol a partir do colesterol é um processo possível e até provável. Através de correlações entre as concentrações de coprostanol em sedimentos não poluídos e condições

deposicionais, foi concluído que o suprimento de matéria orgânica autóctone lábil (algal) e condições anaeróbicas favorecem a formação *in situ* do coprostanol (Taylor *et al.*, 1981; Nishimura, 1982).

Distribuição no ambiente:

Esteróis podem existir como ésteres, os quais correspondem menos de 22 % do total de coprostanol em águas doces e sedimentos marinhos. Em fezes humanas, de 6 - 38 % do coprostanol é encontrado como ésteres (linoleatos, palmitatos e estearatos). No esgoto, a proporção dos ésteres decresce para 8 - 15 % do total do coprostanol, o que é causado por condições naturais que favorecem a hidrólise de ésteres coprostanílicos (Takada e Eganhouse, 1998).

Como o coprostanol é hidrofóbico, a maior parte deste esteroide no esgoto está associada à matéria particulada. Mais de 98 % do coprostanol é achado na fase particulada de esgotos com altas concentrações de sólidos em suspensão ($> 1000 \text{ mg.L}^{-1}$) (Takada *et al.*, 1994) e entre 82 - 96 % em esgotos com baixas concentrações de sólidos em suspensão ($7 - 59 \text{ mg.L}^{-1}$) (Takada e Eganhouse, *op. cit.*). Entretanto, em águas estuarinas do Rio Krka, o coprostanol dissolvido prevaleceu sobre o coprostanol particulado (filtrado em filtro de porosidade de $0,7 \mu\text{m}$), o que pode ser devido a associações com colóides menores que o poro do filtro (Takada e Eganhouse, *op. cit.*).

Em sedimentos anóxicos de ambientes eutróficos, as concentrações de coprostanol podem exceder $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Nishimura, 1982; Grimalt e Albaiges, 1990; Grimalt *et al.*, 1990). Por outro lado, poucos autores reportam concentrações de coprostanol na coluna d'água de lagos remotos e áreas costeiras (Grimalt *et al.*, 1990). Talvez pela natureza de alta adsorção deste composto, ou pela possibilidade de haver um processo rápido de degradação do coprostanol em ambientes óxicos (Wakeham, 1987; Sun e Wakeham, 1998, 1999).

Uma vez que as concentrações de coprostanol em fezes não-humanas são, pelo menos, uma ordem de grandeza menor, essa contribuição é considerada insignificante em relação àquela de ambientes urbanos. Entretanto, casos particulares devem ser considerados, como ambientes aquáticos próximos a criações de animais terrestres, que sofrem impacto de suas fezes. Assim, nesses casos, é necessária a distinção entre esteróis de origem fecal humana e não-

humana, por isso, utilizam-se bancos de dados com a composição das fezes de alguns animais para comparações (incluindo a taxa coprostanol/etilcoprostanol) e indicadores bacterianos (Takada e Eganhouse, 1998).

O coprostanol é facilmente degradado microbianamente sob condições óxicas (Ren *et al.*, 1996; Sun e Wakeham, 1998). A tabela 2 apresenta as taxas de degradação do coprostanol. Apesar dos valores de meia-vida dependerem das condições experimentais, são, em geral, menores que 10 dias a 20 °C. Porém, a degradação microbiana do coprostanol é muito mais lenta sob condições anaeróbicas (Takada e Eganhouse, *op. cit.*).

Tabela 2: Resumo de experimentos de degradação com o coprostanol. *Fonte:* Takada e Eganhouse (1998). *Legenda:* d - dias

Condição Redox	T (°C)	Meio	Meia-vida (d)	Restante (%)
Óxico	27	Água de rio	3.9	
	20	Água de lago	9.9	
	-	Efluente	~1	15 após 3 d
	15	Efluente com água do mar (1:50)		24 após 5 d
Aerado	20	Água de rio		16 após 3 d
	20	Esgoto primário		15 após 29 d
	20	Esgoto diluído (10x)		6 após 22 d
Interface com água aerada	20	Sedimento artificial		~100 após 54 d
Anóxico	15	Sedimento de lago		90 após 450 d
	30	Sedimento de lago		79 após 450 d

As concentrações de coprostanol nos sedimentos são influenciadas pelo tamanho da partícula e pela fração de matéria orgânica. Para se comparar quantitativamente concentrações entre sedimentos de granulometrias diferentes, deve-se fazer uma normalização das concentrações de coprostanol para as concentrações de outros constituintes, como para o carbono orgânico (Takada e Eganhouse, *op. cit.*; Carreira *et al.*, 2001).

Já que o coprostanol é relativamente estável, especialmente após depositar em sedimentos anóxicos, este marcador é utilizado na reconstrução histórica da poluição da região e na avaliação dos processos de sedimentação. É necessário

considerar os processos de degradação pós-deposicionais para alcançar resultados verdadeiros (Takada e Eganhouse, 1998).

As concentrações de coprostanol em geral decrescem conforme aumenta a distância da fonte (Hatcher e McGilivray, 1979; Grimalt e Albaiges, 1990). Isso corrobora o fato deste marcador ser um bom mapeador de áreas impactadas por efluentes domésticos. Devendo-se, obviamente, considerar as características deposicionais do ambiente.

Como não existe legislação ambiental brasileira que inclua esteróis com valores limítrofes a serem lançados no ambiente, deve-se comparar as concentrações encontradas com valores limítrofes utilizados no resto do mundo, principalmente em regiões ambientalmente similares à área de estudo, como regiões tropicais (Carreira *et al.*, 2001).