

Elucidação Estrutural Dos Intermediários Da Biodegradação Do Alquilbenzeno Linear Sulfonato (LAS)

L.Cavalli, CONDEA Augusta S. p. A
G.Cassani, CONDEA Augusta S. p. A
Maraschin, CONDEA Augusta S. p. A

Publicado em *The CLER Review*, Vol. 2, Nº1, junho 1996, pág. 04

Foram usados testes laboratoriais para avaliar a biodegradação do sulfonato de alquilbenzeno linear C₁₀ - C₁₃ comercial e de outros compostos equivalentes, como o homólogo linear C₁₂ iso-LAS e dois isômeros C₁₂ iso-LAS. O processo de biodegradação foi estudado por meio da análise específica da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) capaz de detectar os intermediários da biodegradação, os sulfenil-carboxilatos (SPC) e examinar sua formação e desaparecimento. Foram identificados, separados e depois pesquisados estruturalmente, os sulfenil-carboxilatos mais importantes por ressonância magnética nuclear da transformada de Fourier (RMN -TF) em ambos, ¹H e ¹³C.

A biodegradação do sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS) tem sido extensivamente estudada em laboratório, através de métodos analíticos não específicos⁽¹⁾, isto é, remoção da substância ativa do azul de metileno e do carbono orgânico dissolvido (COD), evolução de CO₂, e tomada de O₂, além de técnicas analíticas específicas tais como a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)⁽²⁾ e a cromatografia à gás - espectrometria de massa (GC-MS)⁽³⁾.

Utilizando-se o método da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), é fácil compreender a primeira etapa da biodegradação do sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS) (Figura 1), especialmente a formação de intermediários da biodegradação, os sulfenil-carboxilatos (SPC), que são formados pela oxidação - w , seguida da oxidação - b da cadeia alquílica do LAS.⁽⁴⁾ A etapa determinante da velocidade da mineralização do sulfonato de alquilbenzeno linear é a abertura do anel. Quando isso acontece, a biodegradação progride rapidamente até sua conclusão, com a formação da biomassa CO₂, H₂O e Na₂SO.⁽⁵⁾

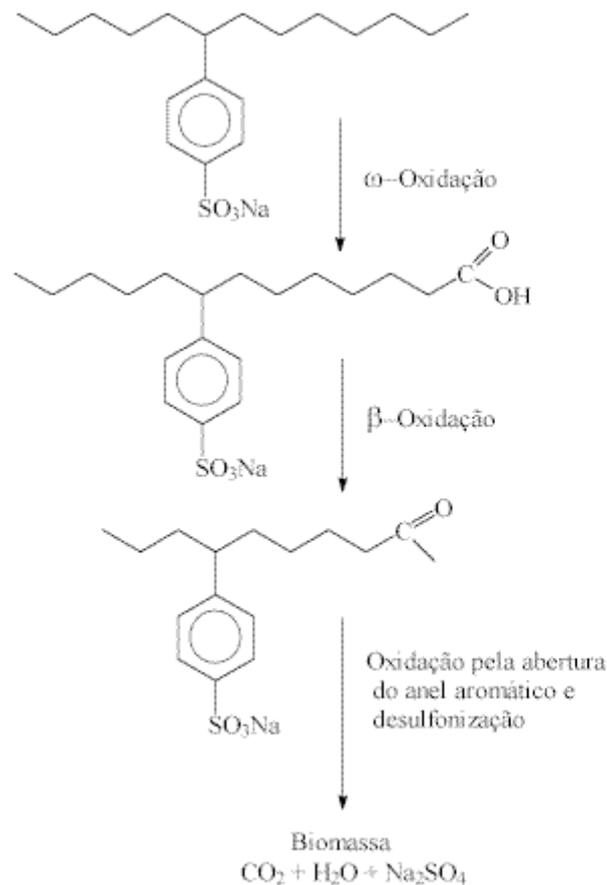


Figura 1 - Etapas da Biodegradação do Sulfonato de Alquilbenzeno Linear

O LAS comercial é formado pela mistura de homólogos da cadeia alquílica C10 - C13 e de todos os isômeros de posições de fenil possíveis (exceto para os carbonos terminais das cadeias alquílicas). Portanto, durante a biodegradação do LAS comercial, formam-se vários sulfenil-carboxilatos. Alguns deles mineralizam-se mais rapidamente do que os outros, dependendo de sua estrutura. Isto já foi confirmado em estudos anteriores sobre a biodegradação dos LAS(6) e dos compostos do mesmo modelo(7), usando-se a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) como método de detecção. Para obtermos uma visão mais completa sobre este fenômeno, separamos e pesquisamos a estrutura dos sulfenil-carboxilatos predominantes.

Nesta apresentação, resumimos os resultados de nossa pesquisa sobre os sulfenil-carboxilatos mais predominantes, identificados durante a biodegradação dos LAS, incluindo algumas das características estruturais a eles associadas.

TESTES DE BIODEGRADAÇÃO

Os testes de biodegradação usados em nossos estudos sobre os sulfenil-carboxilatos predominantes, foram:

1. Teste OECD 301 E
2. Teste " vivo"

O primeiro teste é o método de biodegradação seletivo, executado em níveis baixos da biomassa bacteriana.(8) Nesse teste, usando a HPLC como técnica de detecção, estudamos a biodegradação de três compostos-modelo, sendo que cada um apresentava uma concentração inicial de aproximadamente 10 mg/l. Foram estudados o homólogo do

LAS C12 e dois isômeros C12 chamados de iso-LAS, modelos de estruturas da ramificação metila, presentes em taxas de 2 - 6% no LAS comercial. Os dois padrões iso-LAS C12 do LAS, são os sais de sódio do ácido sulfonil undecano 5 -metil - 2-fenil (iso-LAS I) e do ácido sulfonil undecano 6- metil, 6 - fenil (iso - LAS II). Na Figura 2, são exibidos através da HPLC, alguns modelos da biodegradação do C12 linear do LAS em diferentes ocasiões e os modelos dos dois C12 iso-LAS são exibidos na Figura 3. Podemos observar que após cinco dias, foram identificados somente cinco (05) sulfenilcarboxilatos predominantes no C12 linear do LAS, e somente dois (02) foram observados depois de sete dias. Nas duas moléculas C12 iso-LAS, só foi notado um (1) sulfenilcarboxilato principal em cada uma delas, desde o início. As estruturas dos SPC predominantes mineralizam-se totalmente, se houver tempo suficiente para o processo de biodegradação.

Os sulfenilcarboxilatos predominantes, marcados de X e C na Figura 2, e de I e II na Figura 3, foram separados através de cromatografia e sua estrutura foi determinada pela análise da ressonância magnética nuclear (RMN).

Cromatografia líquida de alto desempenho de detecção fluorescente (HPLC-DF) do modelo de biodegradação seletivo do homólogo I linear C12 LAS, no início e após 5 e 7 dias, respectivamente.

HPLC do método de biodegradação seletiva de dois modelos C12 iso-LAS no início e depois de 10 dias.

O segundo teste é um longo teste de biodegradação ("vivo"), desenvolvido em nosso laboratório(6) e desde seu início, foi realizado de acordo com as condições experimentais do teste OECD 301 E e depois mantido ativo, com periódicas adições do produto que está sendo analisado. Nesse teste foi examinado o LAS comercial C10 -C13 do tipo HF com baixo teor (<0.5%) de sulfonato de dialquiltetralina (DATS), adicionando-se 10 mg do produto a cada quatro dias, durante um período de 76 dias. No final do teste, foram usados 694 mg de sulfonato de alquilbenzeno linear.

O objetivo do teste era concentrar os intermediários mais estáveis da biodegradação e verificar se haveria a possibilidade de acumulação dos compostos recalcitrantes. A Figura 4 mostra o cromatograma da análise HPLC dos intermediários da biodegradação do teste no octogésimo dia, quatro dias depois da última adição do produto. Conforme demonstrado, a análise HPLC indicou a presença de quatro (4) sulfenilcarboxilatos predominantes que representam aproximadamente 80% do total dos intermediários restantes da biodegradação. Esses quatro (4) sulfenilcarboxilatos marcados A,B,C e D na Figura 4, foram separados e sua estrutura química determinada por ressonância magnética nuclear.

ANÁLISE

As condições de HPLC para a análise das soluções dos testes de biodegradação e identificação dos intermediários dos sulfenilcarboxilatos estão resumidas na Tabela 1. O método analítico de cromatografia líquida de alto desempenho é muito sensível. As concentrações de SPC até poucas mg/l, podem ser detectadas através de injeção direta de solução aquosa, sem necessidade de quaisquer procedimentos anteriores à concentração ou de limpeza.

A ressonância magnética nuclear foi usada para identificar a estrutura dos sulfenilcarboxilatos que depois de recuperados, foram redissolvidos em D2O (2-3 ml), filtrados em GF-F(0.7m m de porosidade) e depois da adição de traços de dioxano como referência interna (δ 1H = 3.7 e δ 13 C = 67.8), foram analisados por ressonância magnética da transformada de Fourier (FT) do próton(1H) e do carbono13 (13C). As condições do teste estão resumidas na Tabela 2.

As diversas atribuições estruturais da ressonância magnética nuclear foram apoiadas por experimentos de desacoplamento homonuclear, usando-se a seqüência de 135° - DEPT(aumento sem distorção pela transferência de polarização) e referentes aos cálculos

dos deslocamentos químicos do ^{13}C dos carbonos alquílicos, de acordo com as regras da ressonância magnética nuclear, referentes ao carbono- 13 (9).

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE SULFENILCARBOXILATOS

As soluções aquosas finais dos testes de biodegradação, foram rapidamente levadas para a secagem sob vácuo e em fluxo de N_2 , em temperaturas não mais altas do que 50°C e em evaporador rotativo. Os resíduos brutos, após terem sido analisados por HPLC, foram examinados através da ressonância magnética nuclear e depois cromatograficamente fracionados, para isolar os sulfenilcarboxilatos individuais. Todos os resíduos foram redissolvidos em água e depois da filtração, acidificados ($\text{pH}=2$) e percolados sobre uma coluna C_{13} de extração de fase sólida (Supelclean LC-18, 6ml, 1g). Nessas condições ácidas, os sulfenilcarboxilatos foram adsorvidos com alto rendimento(10).

Foi aplicada a eluição gradiente por etapas com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ de 0:100 a 40:60, tendo a eluição sido verificada através de HPLC. As frações foram agrupadas de acordo com os tipos de sulfenilcarboxilatos: A,B,C,D, I, e II, e depois levadas com muito cuidado para a secagem. Os diversos sulfenilcarboxilatos foram obtidos em quantidade e pureza suficientes (alguns mg) para poder ser realizada a caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear.

Entretanto, a quantidade de sulfenilcarboxilatos extraídos das soluções do teste, não permitiram a total caracterização de todos os compostos de carbono por ressonância magnética nuclear. A maioria dos sinais do carbono quaternário COOH era muito fraca para ser detectada pela ressonância magnética nuclear. Também, a quantidade de sulfenilcarboxilatos X era muito pequena e de pouca pureza, para possibilitar a análise bem sucedida por ressonância magnética nuclear.

Figura 4.O modelo de HPLC de detecção fluorescente (FD) do método de biodegradação "vivo" do LAS C10 - C13 comercial no final do teste (80 dias).

TABELA 1 - Condições da análise HPLC para a quantificação de SPC e do LAS residual

Coluna: Hypersil RP C_{18} , 250 x 2mm, 5 μm

Eluente:

- H_2O + 0.005M TEAHS (sulfato de hidrogênio tetraetilo amônia)
- AcCN : H_2O (80/20v.) + 0.005M TEAHS

Tabela 1 - Gradiente:

Tempo (min)	A %	B %
0	100	0
20	64	36
21	64	36
46	19	81
51	19	81
52	0	100
54	0	100
55	100	0

Temperatura da coluna: 40°C

Velocidade de fluxo: 0.25 ml/min.

Detector de FD: $\lambda_{\text{ex}} = 232\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 290\text{ nm}$

Injeção: 100 μl

TABELA 2 - Condições analíticas da RMN - transformada de Fourier, para a análise de resíduos do teste " vivo" e as frações dos SPC.

Instrumento: Bruker AC 200 e AC 400

Temperatura da sonda: 40 ° C

Solvente: D2 O em condições ácidas

---	¹ H(*)	¹³ C
Frequência	MHz 200.13	50.32
SW - amplitude espectral	Hz 1,800	12,000
PW - largura de pulso-μ seg.	5.9	5.0
AQ - aquisição - seg.	6.0	1.3
RD - retardo de relaxamento,seg.	0.0	3.0
NS - no. de escaneamentos	800	40,000
LB - alargamento de banda	0.0	3.0
TD - pontos de domínio do tempo	16K	32K

(*) com pré- saturação do sinal HDO

TABELA 3 - Deslocamentos químicos de SPC A e B em D₂O, analisados por ressonância magnética nuclear.

SPC A - Atribuição			
Posição	¹³ C	¹ H	Observação *
1,5	n.d.	---	---
2,4	40.9	2.71 (Ha);2.84 (Hb)	dd
3	39.0	3.60	tt
1 - Ph	153.2	---	---
2,6 - Ph	128.8	7.40	d
3,5 - Ph	126.8	7.71	d
4 - Ph	140.1	---	---

SPC B - Atribuição			
Posição	¹³ C	¹ H	Observação *
1,7	n.d.	---	---
2,6	33.4	2.15	m
3,5	32.1	1.95	m
4	45.3	2.70	m
1 - Ph	n.d.	---	---
2,6 - Ph	129.7	7.35	d
3,5 - Ph	126.8	7.70	d
2,6 - Ph	129.7	7.35	d
4 - Ph	n.d.	---	---

Legenda:

*d = duplete	m = múltiplete	t = triplete
dd = dupletes de duplete	s = simplete	tt =tripletes de triplete

TABELA 4 - Deslocamentos químicos de SPC C e D em D₂O, analisados por ressonância magnética nuclear.

SPC C - Designação			
Posição	¹³ C	¹ H	Observação *
1	n.d.	---	---
2	43.0	2.52 (Ha);2.65 (Hb)	dd

3	43.5	3.10	tt
4	38.8	1.60	m
5	21.0	1.11	m
6	14.3	0.79	t
1 - Ph	n.d.	---	---
2,6 - Ph	129.3	7.36	d
3,5 - Ph	126.8	7.67	d
4 - Ph	n.d.	---	---

SPC D - Designação

Posição	¹³ C	¹ H	Observação*
1	178.4	---	---
2	42.2	2.61 (Ha);2.74(Hb)	dd
3	42.9	3.08	tt
4	36.2	1.63	m
5	29.9	~ 1.1	m
6	22.9	~ 1.2	m
7	14.3	0.75	t
1 - Ph	149.2	---	---
2 - Ph	129.3	7.33	d
3,5 - Ph	126.8	7.67	d
4 - Ph	141.9	---	---

TABELA 5 - Deslocamentos químicos de SPC do tipo I e II, analisados por ressonância magnética nuclear.

SPC I - Designação

Posição	¹³ C	¹ H	Observação*
1	179.68;179.75	---	---
2	42.43;42.59	2.10 (Ha);2.02(Hb)	dd
---	---	2.26 (Hb);2.22 (Hb)	dd
3	31.02;31.22	1.80	m
4	34.83;35.00	0.98 (Ha)	m
---	---	1.12 (Hb)	m
5	35.75;35.80	1.58	m
6	40.41;40.52	2.73	m
7	22.46;22.76	1.18	d
8	19.93;20.15	0.83	d
1 - Ph	153.03;153.17	---	---
2,6 - Ph	128.81;128.85	7.35	d
3,5 - Ph	126.70	7.65	d
4 - Ph	141.30	---	---

SPC II - Designação

Posição	¹³ C	¹ H	Observação*
1,7	179.42	---	---
2,6	30.12	~2.1	m
3,5	37.98	~1.9	m
4	40.97	---	---
8	22.66	1.29	s
1 - Ph	149.86	---	---
2,6 - Ph	128.18	7.45	d
3,5 - Ph	126.20	7.72	d
4 - Ph	41.20	---	---

Figura 5. Espectro da RMN dos SPC do tipo I e II, em D₂O.

Ressonância magnética nuclear de sulfenilcarboxilatos (SPC)

Os parâmetros da ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C dos SPC separados nos testes de biodegradação são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5. Os espectros correspondentes da ressonância magnética nuclear são exibidos nas Figuras 8 e 9. A interpretação desses dados estruturais, apoiados pelas informações⁽¹¹⁾ fornecidas pela literatura sobre o assunto e pelos cálculos dos deslocamentos químicos do ¹³C⁽⁹⁾, é apresentada nas Figuras 8 e 9, onde também são fornecidas as estruturas propostas dos diversos SPC. São esses SPC, os principais sulfenilcarboxilatos observados.

Os sulfenilcarboxilatos do tipo I e II são os intermediários predominantes da biodegradação das duas moléculas iso-LAS pesquisadas. O iso-LAS é um derivado menor do sulfonato de alquilbenzeno linear e sua concentração no composto comercial é pequena, normalmente na faixa de 2 - 6 %.

Os SPC do tipo A e B que são dicarboxilatos e os C e D que são monocarboxilatos, derivam de componentes lineares do C₁₀ - C₁₃LAS comercial. O SPC do tipo C foi também identificado como um dos dois intermediários predominantes na biodegradação do C₁₂ homólogo do LAS (Figura 2). O outro intermediário, o SPC do tipo X, não pode ser estruturalmente analisado. Entretanto, através da análise HPLC do cromatógrafo, sabemos que é um dicarboxilato e que se mineraliza mais rapidamente do que o SPC do tipo C. Todos os SPC desaparecem das soluções do teste do cromatógrafo da análise de HPLC com o passar do tempo, mostrando que o processo de biodegradação está chegando a seu fim (mineralização).

Figura 6. Espectro da RMN dos SPC do tipo A e B, em D₂O.

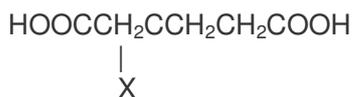
DISCUSSÃO

A biodegradação do LAS como já se sabe, progride via oxidação w / b das cadeias alquílicas que levam à formação dos SPC⁽⁴⁾. Evidentemente, a oxidação - w diminui, à medida em que são aproximados os carbonos terciários e quaternários, isto é, os carbonos benzílicos e a ramificação metila do iso-LAS. Assim, os SPC correspondentes são um pouco lentos para se degradarem completamente, se comparados aos outros SPC e podem ser detectados no ambiente até serem mineralizados. Com base nesses estudos estruturais, podemos prever quais serão os SPC que provavelmente predominarão no ambiente, quando o fim do processo de biodegradação estiver próximo.

Figura 7. Espectro da RMN dos SPC C e SPC D em DO₂

No caso do C₁₀ - C₁₃ LAS, prevê-se que os homólogos de carbono alquila de números ímpares (C₁₁LAS e C₁₃LAS) irão produzir somente dois (2) dicarboxilatos, do tipo A e do tipo B, como serão encontrados no fim do teste "vivo" da biodegradação (Figura 8).

Quanto aos homólogos de alquilcarbono de números pares (C₁₀ LAS e C₁₂LAS) somente é antecipada a formação de um (1) dicarboxilato, que deve apresentar a seguinte estrutura:



onde X é o grupo de p - sulfofenil.

Este SPC não foi detectado pelo teste "vivo" da biodegradação, provavelmente devido à sua alta instabilidade química e térmica. Como tentativa, atribuímos esta estrutura ao SPC do tipo X, o intermediário observado na biodegradação do homólogo C₁₂LAS (Figura 2), que desaparece mais rapidamente do que um de seus precursores, o monocarboxilato do SPC C.

No teste "vivo" da biodegradação, foram encontrados somente dois (2) precursores do dicarboxilato: o monocarboxilato do SPC do tipo C proveniente das cadeias ímpares do carbono alquila do LAS.

No caso das duas moléculas iso-LAS pesquisadas, os dois (2) intermediários identificados que predominaram, o SPC do tipo I e o SPC do tipo II (Figura 9) são como previsto: o monocarboxilato - do SPC do tipo I, pode ser explicado pelo fato de sua degradação requerer oxidação-a , que é mais lenta do que a oxidação -b e o SPC do tipo II, é um dicarboxilato simétrico resultante do ataque microbiano nas duas terminações do iso - LAS II.

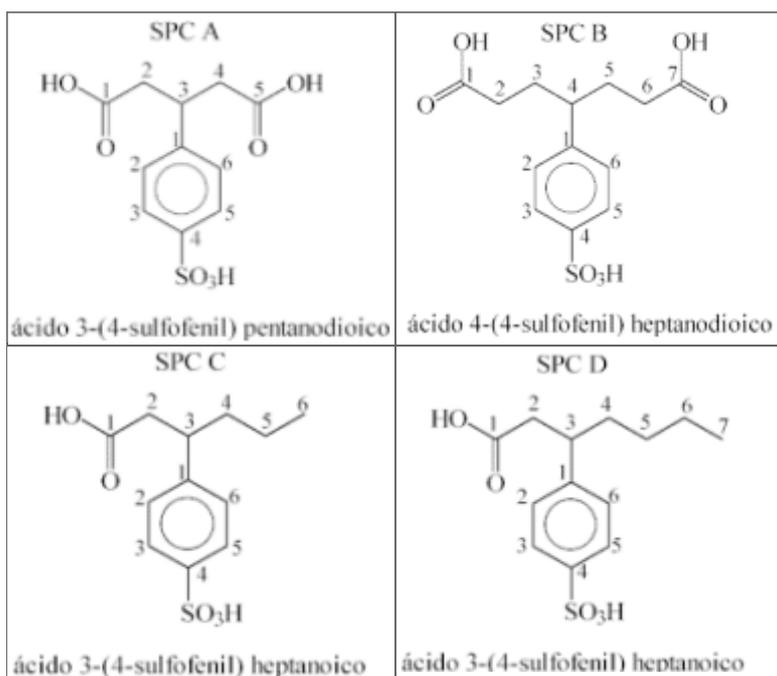


Figura 8. Os principais SPC (A,B,C,D) que se formaram durante a biodegradação do C₁₀₋₁₃ LAS comercial.

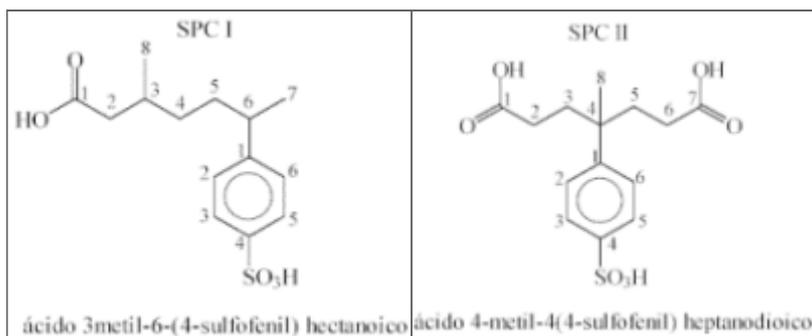


Figura 9. Os principais SPC (I e II) que se formaram durante a biodegradação do iso-LAS I e do iso - LAS II.

REFERÊNCIAS

1. Steber, J. e H. Berger, em *Biodegradability of Surfactants* (D.R. Karsa e M.R. Porter, editors), Blackie Ac. & Profes., pag. 149 (1995)
2. Matthijs, E. e H. De Henau, *Tenside Surfact. Det.*, 24:193 (1987).
3. Trehy, M.L., W.E. Gledhill, J.P. Admova, R. A. Kimerle, A. M. Nielsen, H. O. Perkins e W. S. Eckoff, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:233 -240 (1996).
4. Schoberl, P., K. J. Bock e L. Huber, *Tenside Surfact. Det.*, 25:86 (1988).
5. Swisher, R.D., *Surfactant Biodegradation*, Marcel Dekker, p.599 (1987)
6. Cavalli, L., G. Cassiani, M. Lazzarin, C. Maraschin, G. Nucci e L. Valtoria, *Tenside Surfact. Det.* apresentado.
7. Cavalli, L. G. Cassani, M. Lazzarin, C. Maraschin, G. Nucci, J.L. Berna, J. Bravo, J. Ferrer, A. Moreno, *Toxicology Environment Chem.*, em publicação.
8. Commission Directive 84/449/EEC, *Off. J. Eur. Commis.*, No. L251, pag. 160 (19/09/84).
9. Wehrli, F.W. e T. Wirthlin, *Interpretation of Carbon -13 NMR spectra*, Heyden, pag. 36 (1978).
10. Marcomini, A. e L. Cavalli, 3rd CESIO World Congress, Section E, pag.8, Londres (junho de 1992).
11. Pretsch, Clerc, Seibl e Simon, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*, second edition, Springer - Verlag (1989).