Aplicação da Química Verde na Análise de Esteroides: Uso do Etanol Para Extração em Fase Sólida como Alternativa Sustentável

CARDOZO, K. H. M.[a], NAKAMURA, O.[a], ERNESTO, V. A. R. T.[a], CAVASSIN, E. D. [a], GONÇALVES, A. S. E.[a], GIANNETTI, B. F.[b],CARVALHO, V. M.[a*]

a.Grupo Fleury, São Paulo.

b.Universidade Paulista, São Paulo.

**valdemir.carvalho@grupofleury.com.br*

Resumo

Este trabalho descreve o uso de uma estratégia "verde" para a análise de esteroides em soro utilizando um processo de extração em fase sólida *on-line*semi-automatizado e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem. A extração em fase sólida foi realizada utilizando como fase extratora, soluções aquosas de etanol ao invés de soluções aquosas do solvente acetonitrila. Para avaliar a exatidão do método, 80 amostras distribuídas ao longo do intervalo de relevância clínica foram analisadas pelos dois métodos e os resultados foram comparados utilizando o programa EP Evaluator 10. Os resultados mostraram que a substituição do acetonitrila pelo etanol na etapa de extração não trouxe prejuízos ao processo analítico evidenciando que os métodos são totalmente equivalentes. A substituição do acetonitrila pelo etanol trouxe benefícios ambientais, econômicos e de menor exposição ocupacional. O etanol tem um EHS (*environmental, healthandsafety*) melhor que o doacetonitrila sendo portantomenos tóxico ebiodegradávelpoluindo menos omeio ambiente. Além disto, o etanol é considerado um "bio-solvente", pois sua produção é a partir de fontes renováveis (processos de fermentação). Por se tratar de um solvente pouco nocivo, a sua manipulação é menos prejudicial à saúde dos analistas e o mesmo pode ser descartado como resíduo comum, reduzindo em aprox. 560 L/ano o descarte de resíduo químico. A estratégia empregada mostrou que é possível na prática aliar qualidade e segurança com produção mais limpa contribuindo, portanto para processos mais ecoeficientes.

Palavras-chave: *Produção mais limpa, prevenção de poluição na fonte, extração "verde", etanol, LC-MS/MS.*

1. Introdução

A quantificação dos esteroides testosterona e androstenediona é importante no diagnóstico do hipogonadismo, do hirsutismo e virilização em mulheres e no seguimento do tratamento de pacientes portadores de defeitos da 21-hidroxilase (Wudyet al., 1995). A testosterona é normalmente quantificada por métodos eletroquimioluminométricos automatizados. A androstenediona é processada por meio de um longo e trabalhoso método baseado em extrações líquido-líquido e radioimunoensaio. Além das duas metodologias serem suscetíveis a interferências promovidas por reatividades cruzadas, os métodos empregam grandes volumes de solventes tóxicos e radioisótopos. O método de análise considerado padrão ouro é baseado ainda em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Siekmann, 1979; Lawsonet al., 1989). Os métodos por GC-MS são bem específicos e permitem a análise de múltiplos compostos. No entanto, o processo de preparo da amostra é longo e

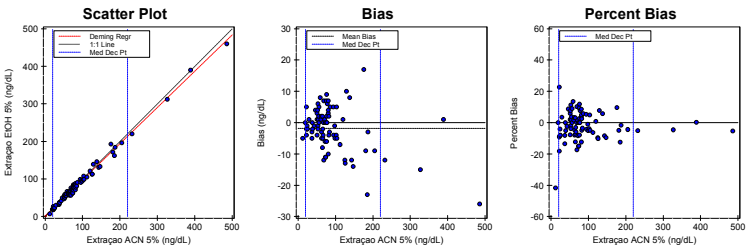
trabalhoso, pois é necessário a derivatização dos analitos para que os mesmos sejam detectados. A cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) foi rapidamente introduzida nesta área como uma melhor alternativa e vem ganhando muito espaço na análise desta classe de compostos (Moal et al., 2007). Tendo em vista as amplas vantagens dos métodos baseados em LC-MS/MS, foi desenvolvimento um método semi-automatizado que combina extração on-line com LC-MS/MSpara análise simultânea de testosterona e androstenediona em soro. O método foi validado e empregado nas análises rotineiras para fins diagnósticos destes dois esteroides. Utilizando a métrica da Ecoeficiência, foram avaliadas a intensidade de materiais e a emissão indireta de CO_2 resultantes da produção mensal do exame Androsterona. Embora muito melhor que os métodos anteriormente disponíveis, a etapa de extração envolvia o uso de grandes volumes de uma solução aquosa contendo o solvente acetonitrila. Para eliminar o uso do acetonitrila nesta etapa, o objetivo deste trabalho foi a padronização de uma extração "verde" empregando como solvente o etanol.

2. Métodos

O preparo da amostra é executado por um pipetador robotizado (Multiprobe) e consiste na adição de padrões internos deuterados seguida por uma etapa de desproteinização de soro. O sobrenadante é diretamente processado por um sistema composto por uma válvula de2 posições e 10 portas acopladas a duas colunas de extração associadas em série e conectadas a um sistema de LC-MS/MS com espectrômetro de massas em tandem Quattro Premier (Waters)operando no modo APCI positivo. As amostras são extraídas utilizando a solução aquosa de acetonitrila ou de etanol utilizando um fluxo de 5mL/min. As extrações são multiplexadas, ou seja, paralelas. Enquanto uma amostra é extraída, outra é analisada e quantificada por LC-MS/MS utilizando uma coluna analítica monolítica de fase reversa empregando gradientes binários com metanol e formiato de amônio. Para os testes de extração, foram avaliadas concentrações de etanol com efeitos elutrópicos correspondente aos do acetonitrila no método anteriormente validado. 80 amostras foram extraídas pelos dois métodos e os resultados comparados por meio do programa EP Evaluator 10 seguindo as normas da CLSI (*ClinicalandLaboratory Standards Institute*). AEcoeficiência do processo foi avaliada com base no inventário e valoração das embalagens de insumos utilizados na produção mensal do exame Androsterona. Foram utilizados os fatores de Intensidade de materiais (*Wuppertal Institute for Climate, Environmentand Energy*) e emissão indireta de CO_2(Herendeen RA, 1998).

3. Resultados

A substituição do acetonitrila por etanol resultou em um aumento considerável da viscosidade da fase móvel. No entanto, a substituição de colunas de extração particuladas por monolíticas permitiu o uso do etanol como alternativo não tóxico para a extração dos esteroides avaliados. Os estudos comparativos mostraram que a substituição não trouxe prejuízos ao processo analítico evidenciando que os métodos de extração são totalmente equivalentes como mostrado nasFig1 e Fig 2.



Regression Analysis

	Deming	Regular
Slope	0,964 (0,945 to 0,983)	0,960 (0,941 to 0,979)
Intercept	1,4 (-0,8 to 3,7)	1,8 (-0,4 to 4,0)
Std Err Est	6,5	6,5

95% Confidence Intervals are shown in parentheses

Fig. 1. Comparação os métodos de extração para androstenediona: Extração ACN 5% versus Extração EtOH 5%.

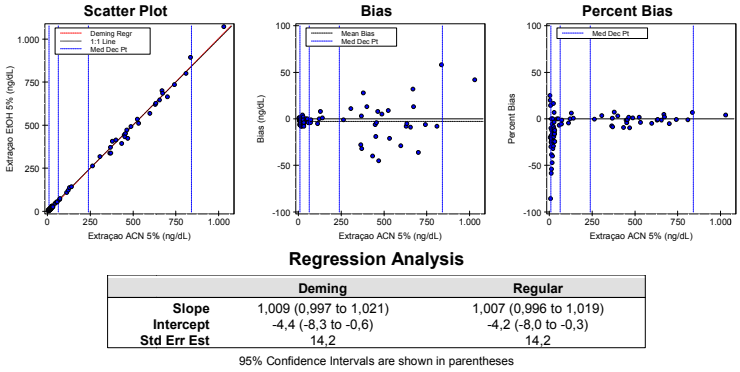


Fig. 2. Comparação os métodos de extração para testosterona: Extração ACN 5% versus Extração EtOH 5%.

A substituição do acetonitrila pelo etanol trouxe benefícios ambientais, econômicos e de menorexposição ocupacional. O etanol por ter um EHS (*environmental, healthandsafety*) melhor que o do acetonitrila, é biodegradável e menos tóxico contribuindo assim para uma menor poluição do meio ambiente (Capello et al., 2007). Além disto, o etanol é considerado um "bio-solvente" (Capello et al., 2007), pois sua produção é a partir de fontes renováveis (processos de fermentação).A alteração permitiua redução de aproximadamente560 L/ano no descarte de resíduo químico, uma vez que o etanol em concentrações baixas pode ser descartado como resíduo comum. Além do aspecto ambiental, houveredução aproximada de 84% nos custos na etapa de extração. A rotina mensal de Androsterona resultou em 2,4 toneladas de intensidade de materiais, sendo 7 Kg de materiais bióticos, 69 Kg de abióticos, 2.360 litros de pegada d'água e 59 Kg de emissão indireta de CO_2 (Fig3). Outro aspecto importante proporcionado pela nova metodologia foi uma menor exposição da equipe a agentes tóxicos como o acetonitrila, que além de ter o custo elevado, ser tóxico (metabolização a cianeto), tem de ser descartado como resíduo químico mesmo em baixas concentrações. Esta busca proativa por alternativas mais limpas vai ao encontro da necessidade de se desenvolver sistemas sustentáveis de produção, conforme descrito por Scruggs CE., 2013.

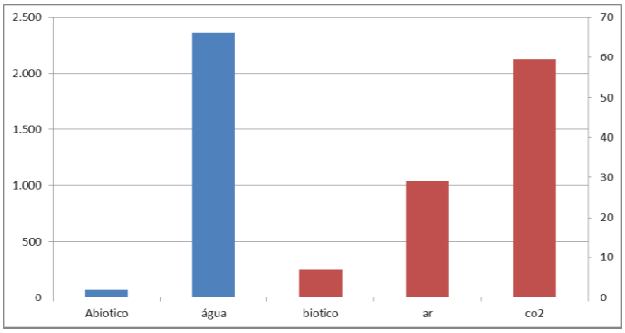


Fig. 3. Intensidade de materiais e emissão indireta de CO_2 relacionados a 2000 testes/mês Androsterona (Kg/Kg).

4. Conclusões

Os métodos empregados para a quantificação de esteroides têm evoluído bastante nos últimos anos quanto ao aspecto ambiental. A eliminação de radioisótopos, de solventes tóxicos bem como a substituição de solventes por outros com menor índice EHS promovem uma menor exposição ocupacional e menor impacto ambiental. A estratégia empregada mostrou que é possível na prática aliar qualidade e segurança com produção mais limpa contribuindo, portanto para processos mais ecoeficientes.

5. Referências

Capello C, Fischer U, Hungerbuhler K., 2007.What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents.Green Chemistry. 9, 927-934.

Herendeen RA. Ecological Numeracy.Editora: John Wiley & Sons, Inc. Nova Iorque, EstadosUnidos, 1998. Página 304.

Lawson AM, Gaskell SJ, Hjelm M., 1985. Methodological aspects on quantitative mass spectrometry used for accuracy control in clinical chemistry. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.23, 433-41.

Moal V, Mathieu E, Reynier P, Malthiery Y, Gallois Y., 2007. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques.Clinica ChimicaActa. 386, 12-9.

Scruggs CE., 2013. Reducing hazardous chemicals in consumer products: proactive company strategies.Journal of Cleaner Production. 44, 105-114.

Siekmann L., 1979. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. Journal of Steroid Biochemistry.11, 117-23.

Wudy SA, Wachter UA, Homoki J, Teller WM., 1995. 17 alpha-hydroxyprogesterone, 4-androstenedione, and testosterone profiled by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry in plasma of children. Pediatric Research. 38, 76-80.