

ESCOLA UNIVERSITÀRIA POLITÈCNICA DE MANRESA

Departament d'Enginyeria Minera i Recursos Naturals

**ESTUDI DELS MARCADORS
BIOMARCADORS DE CONQUES
ALTAMENT REDUCTORES**

Autor: Miquel Cabrera Ortega
Director: F. Xavier de las Heras i Cisa

Juny, 1999

2. PART EXPERIMENTAL

2. PART EXPERIMENTAL

2.1 PREPARACIÓ DEL MATERIAL

Dissolvents

Els dissolvents orgànics emprats en tot el treball foren de qualitat per a anàlisi, es van purificar posteriorment per destil·lació en una columna de fraccionament.

Els dissolvents destil·lats es van guardar en ampolles de vidre amb tap roscat i es protegiren internament amb paper d'alumini.

L'aigua emprada fou desionitzada i destil·lada sobre permanganat de potassi, es conservà en ampolles de vidre, perfectament netes, amb tap roscat protegit amb paper d'alumini.

Material metàl·lic

El material metàl·lic es rentà en un bany d'ultrasons (Selecta) amb 1% de detergent alcalí (Extran AP 13, Merck) en aigua desionitzada durant quinze minuts. Després, s'esbandí amb aigua corrent, aigua destil·lada i finalment acetona destil·lada. S'assecà a 60°C a una estufa d'aire forçat i posteriorment s'emmagatzemà embolicat amb paper d'alumini per tal d'evitar la pols.

Material de vidre

El material de vidre es va sotmetre al mateix procediment que el material metàl·lic. Les columnes de fraccionament es rentaren amb mescla cròmica durant 24 hores i després s'esbandiren amb aigua de l'aixeta, aigua de destil·lada i finalment acetona destil·lada.

Els extractors Soxhlet i el didal de cel·lulosa es van netejar per reflux amb una mescla (2:1, v/v) de CH_2Cl_2 : CH_3OH durant 24 hores. Finalment, el material s'emmagatzemà protegit amb paper d'alumini.

Productes

Els adsorbents emprats foren gel de sílice (Kieselgel 40, 70-230 mesh) i alumina (aluminium oxide active, 70-230 mesh) proveïts per Merck. Aquests es van rentar, juntament amb la llana de vidre, de la següent manera: s'omplí el didal de cel·lulosa, es tapà amb llana de vidre i es van rentar durant 24 hores a reflux amb diclorometà en un extractor Soxhlet. Després, el dissolvent s'evapora sota un llum infraroig.

L'alúmina i la sílica per a ús cromatogràfic s'activaren, prèviament al seu ús, per escalfament a 280°C durant 12 hores i a 105°C durant 24 hores, respectivament. Es deixaren refredar a temperatura ambient i es desactivaren amb un 5% d'aigua destil·lada. L'addició es realitzà gota a gota mentre s'agitava lentament.

L'hidròxid de potassi (Scharlau) i el sulfat de sodi anhidre es van rentar amb *n*-hexà en un bany d'ultrasons. Els altres reactius com és el cas de l'àcid clorhídric, 25% w/w (Merck) es van utilitzar sense cap tractament previ.

La bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA; reactiu sililant) utilitzada era de Fluka Chemie (Buchs, Suïssa).

2.2 RECOLLIDA DE MOSTRES

Mostreig

Les mostres procedents de mines o afloraments estratigràfics es van recollir segons el procediment següent. Primer, s'excavà amb un pic uns 20 cm de fondària en el punt de mostreig per tal d'eliminar la capa alterada. Després, amb l'ajut d'un pic més petit i net, es recollí la mostra no alterada per l'erosió en pots de vidre nets. A continuació, es conserven hermèticament tancades a temperatura ambient a les fosques.

Liofilització

Abans del procés de trituració s'elimina l'aigua de les mostres amb un liofilitzador (Telstar). Les mostres es congelen a -40°C en una safata d'alumini mantenint la pressió a 0,2 Tor durant un període que oscil·la entre 3 i 5 dies, segons la humitat i porositat de la roca.

Trituració

Les roques es van moldre en un molí de cercols fins a un tamany de partícula de 250 µm. Prèviament, es va netejar el molí i els cercols amb aigua i acetona destil·lada. Després, una vegada secs, es va procedir a moldre una petita quantitat de mostra que es rebutjà. La resta de mostra, un cop mòlta, es recollí en pots de vidre nets on es conservarà a temperatura ambient.

2.3 ANÀLISI DE LA FRACCIÓ LIPÍDICA

Extracció de les mostres

Aquesta operació es portà a terme en un aparell Soxhlet en introduir uns 20 grams de mostra en un didal de cel·lulosa, el qual es cobrí amb llana de vidre. L'extracció de la

fracció lipídica es va fer amb una mescla (2:1, v/v) de clorur de metilè: metanol durant 36 hores.

Separació de la fracció àcida i neutra

L'extret del Soxhlet s'evaporà a quasi sequedat per evaporació rotatòria al buit i es saponificà amb 40 ml d'una dissolució de KOH en CH₃OH al 6% w/w durant 12 hores a temperatura ambient. A continuació, es va separar la fracció neutra per extracció de la mescla amb *n*-hexà (30 ml x 6). Els extreus orgànics reunits es varen concentrar fins a 1 ml i es van guardar en vials dins el congelador (-20°C) per al seu posterior fraccionament. L'addició posterior d'una solució aquosa de HCl al 25% fins a pH 2 i la reextracció amb *n*-hexà (20 ml x 6), va permetre obtenir la fracció àcida. Les fases hexàniques reunides es varen evaporar al buit i el residu es va guardar en un vial dins el congelador (-20°C).

Anàlisi de la fracció neutra

Els extreus neutres es varen cromatografiar en una columna per tal de separar-los en 6 fraccions i així simplificar l'anàlisi. Les columnes emprades foren de vidre, de 250 x 9 mm de diàmetre interior, amb dipòsit a la part superior i clau de tefló a la part inferior. Les columnes es van emplenar amb 8 g de silicagel (70-230 mesh, Merck), a la part inferior, i 8 g d'alúmina (70-230 mesh, Merck), a la part superior, ambdós suports desactivats amb el 5% d'aigua.

Es recolliren sis fraccions per elució successiva amb:

1 ^a F 20 ml d' <i>n</i> -hexà	Hidrocarburs (HC) alifàtics.
2 ^a F 20 ml d' <i>n</i> -hexà/CH ₂ Cl ₂ (90:10, v/v)	HC aromàtics mono i dicíclics.
3 ^a F 40 ml d' <i>n</i> -hexà/CH ₂ Cl ₂ (80:20, v/v)	Hidrocarburs aromàtics policíclics.
4 ^a F 20 ml d' <i>n</i> -hexà/CH ₂ Cl ₂ (25:75, v/v)	Cetones i aldehids lineals.
5 ^a F 40 ml de CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (95:5, v/v)	Cetones cíclics i alcohols lineals.
6 ^a F 40 ml de CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (90:10, v/v)	Alcohols cíclics.

Posteriorment, les fraccions es van concentrar fins a 0.5 ml aproximadament i tot seguit es varen passar a vials on s'evaporà el dissolvent amb corrent de N₂. Els vials, un cop etiquetats, es van guardar al congelador a una temperatura de -20°C fins a la seva anàlisi.

Derivatització de les fraccions polars

Les fraccions cromatogràfiques més polars (cinquena i sisena de l'extracte neutre, així com la fracció àcida) es varen derivatitzar per reacció de la fracció concentrada amb 200 µl de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) a una temperatura de 80°C durant 60 minuts. Un cop transcorregut el temps de reacció, el dissolvent (trifluoroacetamida i BSTFA en excés) es va evaporar a sequedat amb corrent de N₂. Els silil derivats es formen per substitució d'un H actiu dels grups OH, SH i NH. La gran capacitat sililant del reactiu BSTFA rau en la labilitat de la trifluoroacetamida resultant.

Anàlisi per Cromatografia de gasos/Espectrometria de masses

La tècnica analítica emprada en l'estudi dels components lipídics del present treball ha estat la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (CG/EM). L'anàlisi es realitzà amb un cromatògraf de gasos Fisons-8000 acoblat a un espectròmetre de masses model Fisons MD-800 equipat amb una font d'ionització per impacte d'electrons (70 eV) i analitzador quadripolar.

Les temperatures de treball foren 275°C, per a l'injector, 200°C en la font d'ions, 300°C en la interfase i 230°C en l'analitzador.

El programa de temperatura del cromatògraf de gasos fou:

A 60°C durant 2 minuts.

De 60°C a 150°C a 15°C/minut.

De 150°C a 310°C a 4°C/minut.

A 310°C durant 25 minuts

Les especificacions de la columna cromatogràfica són:

Fase estacionària: DB-5MS.

Espessor del recobriment: 0,1-15 µm.

Longitud de la columna: 30 m.

Diàmetre interior: 0.25 mm.

Pressió del gas portador (Heli): 2 ml/min.

Cada mostra es punxà al cromatògraf de gasos segons segons la tècnica de l'agulla calenta. Abans de la punxada es va mantenir l'agulla de la xeringa a l'injector durant 5 segons.

La vàlvula de divisió de flux s'obrí passats 60 s de la injecció. L'escombratge es donà entre m/z 50 i 600 a una velocitat de 1.4 scan per segon.

El cromatògraf de gasos i l'espectròmetre de masses es controlaren amb un PC que disposa d'un software de tractament de dades MassLab 2.13.

Anàlisi de carbonats i de cendres

La determinació dels carbonats es realitzà per atac directe de la mostra amb HCl 2N (3 vegades). Es rentà la mostra amb aigua desmineralitzada (3 vegades) i posteriorment s'assecà. El percentatge de carbonats es va calcular per diferència de pesada.

Per a la determinació de les cendres s'han van seguir les normes UNE 32.001, 32.019 i 32.001: les mostres van ser escalfades a 900°C durant 30 minuts i els càlculs es van fer per diferència de pesada del lignit lliure d'humitat i volàtils.

Anàlisi elemental

La determinació de l'anàlisi elemental de C, H i N es va fer amb un analitzador Fisons 1106 i el S amb el Fisons 1108.