

RMN DE SÓLIDOS DE ^{13}C COMO TÉCNICA DE PROSPECÇÃO DE DEPÓSITOS BILIARES *EX VIVO*

Data de aceite: 22/12/2023

Leandro Bandeira Borré

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Química, RJ, Brasil

Rosane Aguiar da Silva San Gil

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Química e Instituto de
Pesquisas de Produtos Naturais, RJ,
Brasil

Anderson Thiago Vasconcelos Veiga

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Química, RJ, Brasil

José Alberto Portela Bonapace

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Química, RJ, Brasil

Parte desse trabalho foi apresentado durante a XVII ERSBQ-Rio, Sociedade Brasileira de Química, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO: A análise da composição de cálculos biliares é vital para a etiopatogenia das litíases biliares, e pode ajudar na prevenção da sua formação. Nesse estudo uma amostra de cálculo biliar *in vivo* foi caracterizada *ex vivo* pela técnica de ressonância magnética nuclear de sólidos

de ^{13}C (RMNs) utilizando-se a sequência de polarizada cruzada (CP) e rotação em torno do ângulo mágico (MAS), na prospecção dos constituintes majoritários presentes, com o mínimo de manipulação do material. As condições de aquisição foram otimizadas, e a preparação da amostra envolveu apenas sua pulverização em gral de ágata. Foi constatado que o cálculo biliar do presente estudo apresentou o colesterol como principal constituinte. A comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C permitiu sugerir que a forma polimórfica predominante seria a do colesterol monoidratado cristalino, observado em pacientes portadores de colecistite crônica.

PALAVRAS-CHAVE: RMN de Sólidos de ^{13}C , polimorfos do colesterol, colecistite, depósitos biliares *in vivo*; doenças da vesícula.

^{13}C SOLID NMR AS A TECHNIQUE FOR PROSPECTING BILE DEPOSITS *EX VIVO*

ABSTRACT: Analysis of the composition of gallstones is vital for the etiopathogenesis of gallstone disease and can help prevent its formation. In this study, an *in vivo* gallstone sample was characterized *ex vivo* using

solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) magic angle spinning (CPMAS) sequence in prospecting the majority constituents present, with minimal material manipulation. The acquisition conditions were optimized, and the sample preparation involved only its grinding in an agate mortar. It was found that the gallbladder stones in the present study had cholesterol as the main constituent. A comparison of ^{13}C chemical shifts suggested that the predominantly polymorphic form would be crystalline cholesterol monohydrate, usually found in patients with chronic cholecystitis.

KEYWORDS: ^{13}C solid-state NMR; cholesterol polymorphs, colecistite, *in vivo* gallstones; gallbladder diseases.

INTRODUÇÃO

A presença de cálculos biliares, ou ‘pedras na vesícula’ (coletíase) é uma das principais causas de dores abdominais que necessitam de hospitalização e intervenção cirúrgica. Trata-se de um sério problema de saúde, que impacta milhões de pessoas em todo o mundo (Siddiqui et al., 2023). Cálculos biliares e câncer de vesícula são condições patológicas que frequentemente coexistem: pacientes com histórico de cálculos biliares que medem mais do que 3,0 cm de diâmetro são mais propensos a desenvolver câncer de vesícula (Kapoor, 2006).

O fígado produz e secreta bile, que é uma solução aquosa espessa de coloração amarelo-esverdeada, necessária para emulsificar os lipídeos antes da digestão. A bile é composta por colesterol (Figura 1), sais biliares (bilirrubina), fosfolipídeos (como a lecitina), bilirrubina conjugada, CaCO_3 , eletrólitos e água, e é transferida para a vesícula via duto hepático, onde é armazenada e concentrada. Após a ingestão de alimentos, a vesícula biliar transfere a bile para o intestino, de forma a dar continuidade ao processo de digestão.

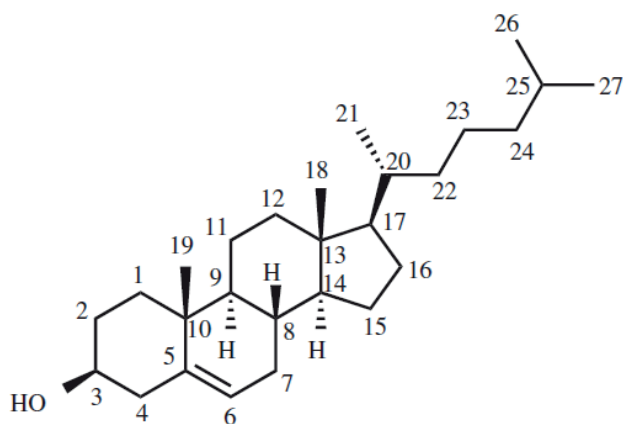


Figura 1. Estrutura química do colesterol.

Fonte: os autores.

O colesterol é um componente vital das membranas celulares e essencial para a estrutura celular. Trata-se de uma molécula muito pouco solúvel em água. Em sistemas biológicos a solubilização ocorre através de sua incorporação nas membranas lipídicas, por interação com os sais biliares ou com as lipoproteínas no sangue. Nas células, a maior parte do colesterol encontra-se localizado na membrana plasmática, onde a região hidrofóbica interage com as cadeias de ácidos graxos dos lipídeos, enquanto os grupos hidroxila se posicionam em torno das moléculas de água que envolvem a membrana celular (Shepelenko et al., 2022).

Cristais de colesterol são formados a partir da cristalização de moléculas de colesterol com ou sem moléculas de água incorporadas na estrutura cristalina final. Esses cristais são de grande interesse, já que tem papel importante em algumas doenças, como a formação de cálculos biliares e a aterosclerose (Kuçukbenli et al., 2012). Altos níveis de colesterol são patológicos, pois podem resultar na formação de domínios cristalinos bidimensionais nas membranas celulares e na precipitação de cristais de colesterol mono-hidratado. Por sua vez, domínios cristalinos bidimensionais podem se transformar em cristais tridimensionais do polimorfo monoclinico ou do polimorfo triclinico. O polimorfo monoclinico foi identificado em modelos de cultura de células relacionadas com a aterosclerose (Varsano, 2018), assim como em soluções de bile, precursoras da formação de cálculos biliares.

A aglomeração dos componentes da bile, por supersaturação de colesterol e reações incompletas da bilirrubina ocasiona a formação dos cálculos biliares, cuja composição apresenta concentrações variáveis desses componentes: cálculos de colesterol 'puro' ($\geq 70\%$ de colesterol, coloração branca, marrom claro ou esverdeada), cálculos de colesterol mistos (normalmente 30-70% de colesterol, coloração marrom ou marrom-amarelada) e cálculos altamente pigmentados ($\leq 30\%$ de colesterol, coloração preta ou marrom).

Várias condições patogênicas podem causar a hipersecreção de colesterol ou a hiposecreção de ácidos biliares, dando início à formação de depósitos. Com a supersaturação ocorre a formação de cristais que se combinam com os demais constituintes da bile. Tanto a quantidade quanto a forma polimórfica do colesterol presente nesses depósitos pode ser correlacionada com algumas doenças, como a colecistite crônica, a colecistite granulomatosa e o câncer de vesícula. Alguns outros constituintes da bile, como sais de magnésio e cálcio, também podem combinar-se com o colesterol e contribuir para formar os cálculos biliares (Rudling et al., 2019). Não existem até o momento medicamentos eficazes para tratar doenças que produzem esses depósitos. O procedimento padrão é a cirurgia de remoção da vesícula (Siddiqui et al., 2023).

Os cálculos biliares podem ser amorfos ou cristalinos, com diâmetros entre alguns milímetros até em torno de seis centímetros, e com diferentes geometrias. Para uma classificação acurada, é necessário proceder com a análise dos componentes presentes nesses depósitos. Os constituintes químicos devem ser identificados, de forma a elucidar os fatores etiopatogênicos que podem então ser utilizados para implementação de

tratamentos e planos de prevenção.

Várias técnicas tem sido utilizadas nos últimos anos para a caracterização dos cálculos biliares: difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens por ressonância magnética nuclear (MRI) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear em solução (RMN) e a ressonância magnética nuclear de sólidos (RMNs). Entretanto existem algumas limitações para o emprego de algumas dessas técnicas para o estabelecimento da composição dos cálculos biliares. Por exemplo a DRX necessita que a amostra esteja na forma de pó cristalino, enquanto o IV pode não ser capaz de detectar todos os componentes presentes sem ambiguidade (Jayalakshmi et al., 2009). Por outro lado, a aplicabilidade da espectroscopia de RMN é ampla, por ser uma técnica não invasiva e altamente reprodutível, e no caso particular da RMN de sólidos, não exige preparação extensa da amostra e possibilita a caracterização dos diferentes componentes presentes, solúveis ou insolúveis em um determinado meio, incluindo-se as estruturas cristalinas de um mesmo componente, e as eventuais fases amorfas presentes. Um exemplo de aplicação é o trabalho publicado por Bak et al. (2000), que utilizaram com sucesso a técnica de RMN de sólidos para a caracterização de amostras de cálculos renais. A observação dos sinais de ^{31}P e de ^{13}C possibilitou o estabelecimento da composição de seis amostras de depósitos produzidos in vivo, por comparação com espectros de padrões. Componentes cristalinos e amorfos puderam ser facilmente identificados, através das medidas dos parâmetros deslocamento químico isotrópico, anisotropia e parâmetro de assimetria, extraídos dos espectros experimentais por programas de ajuste apropriados.

A compreensão sobre a composição e microestrutura dos cálculos biliares fornece indicações sobre o mecanismo de sua formação e as doenças a ela associadas. Waterhous et al. (1985) publicaram os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C de uma série de ácidos biliares. Nos espectros de RMN de ^{13}C , além dos sinais na região entre 10 e 45 ppm, absorções características de carbonos do tipo HC-O na região entre 68 e 75 ppm, e dos grupos COOH e COO- entre 190 e 180 ppm foram apresentados. Ijare et al. (2005) obtiveram os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de vários ácidos biliares em meio aquoso, e assinalaram todos os sinais observados. Jayalakshmi et al. (2009) adquiriram espectros de RMN em solução (^1H e ^{13}C) e de RMN de sólidos de ^{13}C (sequência de polarização cruzada, CPMAS), de três formas polimórficas do colesterol, a mono-hidratada e duas formas anidras, presentes nos cálculos biliares. À temperatura ambiente duas formas cristalinas, uma forma monohidratada ($Z'=8$) e um forma anidra ($Z' = 8$) foram analisadas. A presença de múltiplos sinais para um mesmo carbono, que representa as moléculas cristalograficamente não equivalentes foi constatada para vários carbonos. Por exemplo, no espectro de ^{13}C do polimorfo anidro foram observados para o carbono C6 seis sinais diferentes, cinco com mesma intensidade e o sexto com aproximadamente o triplo da intensidade, o que confirma a presença de 8 moléculas na célula unitária, como indicado pelos dados cristalográficos. Os autores sugeriram que a determinação de qual polimorfo

específico estaria associado com a patologia poderia fornecer informações úteis sobre o prognóstico da doença. Dessa forma o conhecimento dos perfis dos espectros de RMN de sólidos das fases de cristais de colesterol é uma etapa essencial para o avanço da pesquisa nessa área. Kuçukbenli et al. (2012) estabeleceram os deslocamentos químicos de ^{13}C de algumas estruturas do colesterol por cálculos DFT. Os resultados foram comparados com os obtidos experimentalmente. Foi possível fazer o assinalamento de todos os sinais da forma mono-hidrato e do polimorfo anidro obtido a baixa temperatura. Sharma et al. (2016) publicaram espectros de RMN CPMAS de ^{13}C do colesterol recristalizado e de bilirrubina. Shepelenko et al. (2022) estudaram o polimorfismo e os mecanismos de nucleação de colesterol mono-hidratado a partir de cálculos DFT, e obtiveram dados sobre os polimorfos monoclinico e o polimorfo triclinico.

Recentemente Siddiqui et al. (2023) analisaram a composição de cálculos biliares de pacientes de diferentes regiões geográficas da Índia para investigar as possíveis variações entre as populações nessas regiões. Foram caracterizados cálculos biliares de diferentes condições patológicas, ou seja, doenças benignas (colecistite crônica) e malignas (câncer de vesícula biliar). O tipo de polimorfo das moléculas de colesterol também pode ser determinado, o que forneceu informações sobre as estruturas presentes nos depósitos estudados. No caso dos cálculos biliares estudados pelos autores, foi constatado que o colesterol foi o principal constituinte nas populações ao norte da Índia, enquanto na região sul ele se encontrava presente como componente minoritário. Além disso, foi observado que os cálculos de vesículas com câncer apresentaram teor de colesterol menor, comparado com os cálculos de indivíduos com colecistite crônica.

O objetivo desse trabalho foi utilizar a RMN de sólidos de ^{13}C (RMN-CPMAS) como técnica de prospecção *ex vivo* de uma amostra de cálculo biliar produzida *in vivo*, visando estabelecer os principais constituintes presentes e investigar a presença de polimorfos de colesterol.

EXPERIMENTAL

Amostras de cálculo biliar produzidos *in vivo* (Figura 2), e nomeados como DBI foram inicialmente macerados em gral de ágata e imediatamente transferidos para rotores de ZrO_2 de 4mm. Os espectros de RMN-CPMAS de ^{13}C foram adquiridos em um equipamento Bruker, modelo Avance III 400WB (9,4T), à temperatura ambiente ($T \approx 21^\circ\text{C}$), na frequência de 100.6 MHz (ν_{Larmor} do ^{13}C), em uma sonda Bruker CPMAS de triplo canal de 4 mm, e velocidade de rotação de 10kHz. Foi utilizada a sequência de polarização cruzada, com pulso de excitação de $4,5\mu\text{s}$ ($\pi/2$), tempo de contato otimizado de $2000\mu\text{s}$ e tempo de reciclo entre 4 e 20s. Para garantir uma boa qualidade do espectro, o processamento foi feito com correção manual da fase e correção automática da linha base. Utilizou-se entre 512 e 1024 acumulações em uma janela espectral de 80KHz, mantendo-se sinal/ruído

maior do que 200. Os deslocamentos químicos foram referenciados pelo sinal da glicina ($\delta_{C=O}$ 176,03 ppm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cálculos biliares humanos ocorrem em variedades de forma e tamanho, e variam de branco cremoso, amarelo, preto e marrom (Sharma et al., 2016; Siddiqui et al., 2023). Os cálculos biliares estudados apresentaram coloração marrom, com raias amarelas e brancas (Figura 2).



Figura 2. Morfologia do depósito biliar estudado – amostra DBI.

Fonte: os autores.

A aparência morfológica do cálculo biliar sugere a possível presença de bilirrubina ou de derivados de ácidos biliares, porém como indicado na literatura, a caracterização de cálculos biliares deve ser realizada a nível estrutural, para maior segurança nos resultados. Na Figura 3 estão apresentados os espectros de RMN-CPMAS de ^{13}C da amostra de depósito DBI, assim como do padrão de colesterol (COL-R), para fins de comparação.

O espectro de RMN-CPMAS de ^{13}C da amostra do cálculo biliar DBI apresentou perfil semelhante ao da amostra de colesterol padrão Merck, com sinal na região de 140 ppm desdobrado em dois sinais ($=C5$), além dos sinais em 120,6 ppm ($=HC6$), em torno de 70 ppm ($HO-C3$), e do sinal correspondente ao grupo metila desdobrado em dois, na região de 10 ppm (H_3C18). Pode-se constatar a ausência de sinais na região de 190-180 ppm ($COOH$; COO^-), e de múltiplos sinais na região de 78 a 70 ppm ($HO-CH$), característicos de ácidos biliares (Waterhous et al., 1985). Também pode-se excluir a presença de bilirrubina ou de bilirrubina conjugada, pela ausência de sinais na região de 190-170 ppm, e na região de 138 a 100 ppm (Jayalakshmi et al., 2009; Sharma et al., 2016). Dessa forma pode-se inferir que apesar da coloração marrom predominante no depósito biliar investigado (Figura 2), o componente orgânico majoritário é o colesterol (Tabela 1).

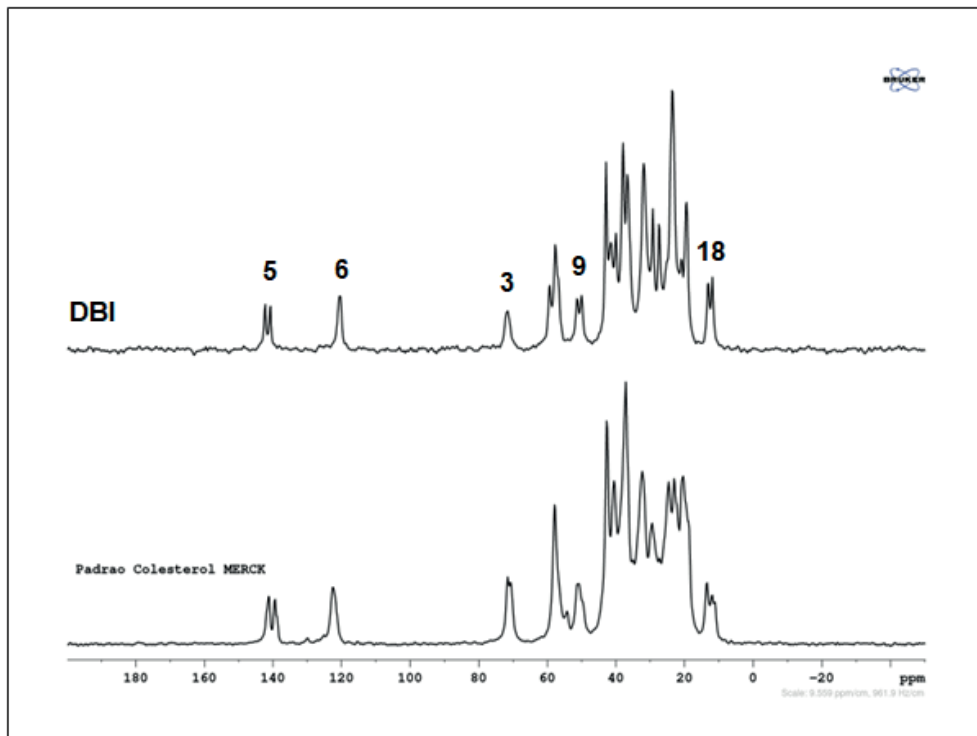


Figura 3. Espectros de RMN-CPMAS de ^{13}C das amostras: colesterol padrão Merck (COL-R) e cálculo biliar *in vivo*, analisado *ex vivo* (DBI).

Fonte: os autores.

	δ , ppm		Assinalamento
DBI	COL-R	COL	
sólido	sólido	solução ^a	proposto ^a
142,2/141,2	141,4; 139,6	141,2	C=C(5)
120,6	122,5	121,3	C=CH(6)
71,8	71,6; 70,9	71,3	C-O(3)
59,7/57,7	57,9; 54,7	56,9; 56,5	CH(14,17)
51,4/50,2	51,1	50,5	CH(9)
43,2/41,7	42,7	42,4	CH(4)
40,1	40,8	40,0	CH ₂ (24,12)
38,2	-	39,6; 37,5	CH ₂ +CH
36,8	37,1	36,5; 36,4; 35,8	CH ₂ +CH
31,9	32,6	32,3; 31,6	CH ₂ (2)/CH(8)
29,5/27,4	29,6	28,3; 28,0	CH ₂ (12)/CH(25)
-	24,8	24,3; 24,1	CH ₂ (15)(23)
23,5	23,2	22,8; 22,5	CH ₃ (26)(27)

21,1	20,4	21,2	C(10)
19,7	-	19,4; 18,8	CH ₃ (19)(21)
13,1/12,0	13,8; 12,2	12,0	CH ₃ (18)

^aGuo et al. (1996)

Tabela 1 – Deslocamentos químicos (ppm) de ¹³C.

A identificação das estruturas cristalinas do colesterol presentes na amostra DPI foi feita por comparação com os deslocamentos químicos publicados na literatura por Guo e Hamilton (1996), Jayalakshmi et al. (2009), Sharma et al. (2016) e Siddiqui et al. (2023). Na Tabela 2 estão listados os deslocamentos químicos de ¹³C publicados para a forma monoidrato, assim como para duas formas anidras de colesterol. Os perfis nas regiões: 138-145 ppm (C5), 120-125 ppm (C6), 60-75 ppm (C3) e 10-16 ppm (C18) foram comparados com o observado na amostra DPI.

Estrutura cristalina	carbono				Ref.
	C5	C6	C3	C18	
Monoidrato	142,4; 140,9	120,8; 120,3	71,8	12,0; 11,0	b,c,d
Anidro, Temp. ambiente	141,7; 141,2; 141,0; 140,8; 139,2; 138,5	122,9; 122,7; 122,5; 122,2; 121,8; 121,5; 121,1	71,4; 70,6; 70,3	13,8; 13,0; 12,7; 11,7	b,c
Anidro, Temp. >32 °C	141,7; 141,4; 141,1; 140,7; 139,9; 139,3; 138,8; 138,6	123,4; 122,9; 122,1; 121,6; 121,2	72,1-69,8	a	b
Mistura fases	141,7 – 140,9; 139,3; 138,5	123 – 121 6 sinais	71,4; 70,3	13,6 – 10,9 4 sinais	e
Amostra DBI (monoidrato)	142,2; 141,2	120,6	71,8		Este trabalho

^anão indicado.

^bGuo e Hamilton (1996).

^cSharma et al. (2016).

^dSiddiqui et al. (2023).

^eJayalakshmi et al. (2009).

Tabela 2. Deslocamentos químicos (ppm) dos sinais dos carbonos C3, C5, C6 e C18 do colesterol em várias formas cristalinas, e os observados para o cálculo biliar DBI investigado.

Os dois polimorfos anidros apresentaram os sinais dos carbonos C5 e C6 desdobrados em vários sinais, coerente com o indicado por estudos cristalográficos (Kuçukbenli et al., 2012). Por outro lado, os deslocamentos químicos publicados para o polimorfo monohidratado foram comparáveis aos observados para a amostra de depósito biliar investigada. Os resultados sugerem que na amostra DBI a forma predominante seria a do colesterol mono-hidratado cristalino, observado em portadores de colecistite crônica (Siddiqui et al., 2023).

CONCLUSÃO

A RMN de sólidos permitiu caracterizar de forma rápida o componente majoritário presente em uma amostra de cálculo biliar produzido *in vivo* como sendo o colesterol. A possível presença de bilirrubina não foi constatada, assim como de fosfolípidos como a lecitina. Foi possível estabelecer o polimorfo presente, por comparação dos deslocamentos químicos indicados na literatura, como sendo a forma monohidratada do colesterol, comumente presente em pacientes portadores de colecistite crônica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a GALP por bolsa de pós-doutorado (L.B. Borré) e à FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Brasil) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BAK, M., THOMSEN, J.K., JAKOBSEN, H.J., PETERSEN, S.E., PETERSEN, T.E., NIELSEN, N.C. **Solid-state ^{13}C and ^{31}P NMR analysis of urinary stones.** *The Journal of Urology*, v.164, p.856-863, 2020.
- GUO, W., HAMILTON, J. A. **^{13}C MAS NMR Studies of Crystalline Cholesterol and Lipid Mixtures Modeling Atherosclerotic Plaques.** *Biophys. J.* v.71, p. 2857-2868, 1996.
- IJARE, O.B., SOMASHEKAR, B.S., JADEGOUD, Y., GOWDA, G.A.N. **^1H and ^{13}C characterization and stereochemical assignments of bile acids in aqueous media.** *Lipids*, v.40, p.1031-1041, 2005.
- JAYALAKSHMI, K., SONKAR, K., BEHARI, A., KAPOOR, V.K., SINHA, N. **Solid state ^{13}C NMR analysis of human gallstones from cancer and benign gall bladder diseases.** *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. v.36, p. 60-65, 2009.
- KAPOOR, V.K. **Gallbladder cancer: a global perspective.** *Journal of Surgical Oncology*, v.93, p.607-609, 2006.
- KUÇUKBENLI, E., SONKAR, K., SINHA, N., GIRONCOLI, S. **Complete ^{13}C NMR Chemical shifts assignment for cholesterol crystals by combined CP-MAS spectral editing and ab initio GIPAW calculations with dispersion forces.** *J.Phys.Chem. A*, v.116, p.3765-3769, 2012.

RUDLING, M., LASAR, A., STRANIERO, S. **Gallbladder bile supersaturated with cholesterol in gallstone patients preferentially develops from shortage of bile acids.** *Journal of Lipid Research*, v.60, p.498-505, 2019.

SHARMA, R.K., SONKAR, K., SINHA, N., REBALA, P., ALBANI, A.E., BEHARI, A., REDDY, D.N., FAROOQUI, A., KAPOOR, V.K. **Gallstones: a worldwide multifaceted disease and its correlations with gallbladder carcinoma.** *PLoS ONE*, v.11, p.1-14, e0166351, 2016.

SHEPELENKO, M., HIRSCH, A., VARSANO, N., BEGHI, F., ADDADI, L., KRONIK, L., LEISEROWITZ, L. **Polymorphism, structure and nucleation of cholesterol.H₂O at aqueous interfaces and in pathological media: revisited from a computational perspective.** *J.Am.Chem.Soc.*, v.144, p.5304-5314, 2022.

SIDDIQUI, M.A., DWIVEDI, N., SIDDIQUI, M.H., RANA, S.V., SHARMA, A., DASH, N.R., PRADEEP, R., VIJAYAHARI, R., BEHARI, A., KAPOOR, V.K., SINHA, N. **NMR spectroscopy-based analysis of gallstones of cancerous and benign gallbladders from different geographical regions of the Indian subcontinent.** *PLoS ONE*, v.18, p.1-15, e0286979, 2023.

WATERHOUS, D.V., BARNES, S., MUCCIO, D.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. **Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 β -cholanoic acid.** *J. Lipid Res.* v.26, p.1068-1078, 1985.