



Carla Borges Sette

**Formação e identificação de metabolitos
de fenantreno e homólogos alquilados em
caranguejo *Ucides cordatus***

Dissertação de Mestrado

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Química da Puc-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Orientadora: Prof.^a Angela de Luca Rebello Wagener

Rio de Janeiro, abril de 2010



Carla Borges Sette

**Formação e identificação de metabolitos
de fenantreno e homólogos alquilados em
caranguejo *Ucides cordatus***

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Química da Puc-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof^a. Angela de Luca Rebello Wagener
Orientadora
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof^a. Dr^a Adriana Haddad Nudi
Co-orientadora
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Dr. Josino Costa Moreira
Fiocruz

Dr^a Eleine Francioni de Abreu Lima
CENPES – Petrobrás

Dr^a Juliana Feitosa Felizzola
(Sem vínculo)

Prof. Dr. Arthur de Lemos Scofield
(Sem vínculo)

Prof. José Eugenio Leal
Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico –PUC-Rio

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2010

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização do autor, do orientador e da universidade.

Carla Borges Sette

Graduou-se em Ciências biológicas na USU (Universidade Santa Úrsula) em 2006. Participou de diversos trabalhos na área ambiental.

Ficha Catalográfica

Sette, Carla Borges

Formação e identificação de metabolitos de fenantreno e homólogos alquilados em caranguejo *Ucides cordatus* / Carla Borges Sette ; orientadora: Angela de Luca Rebello Wagner. – 2010.

114 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2010.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. HPA. 3. Fenantreno. 4. HPA alquilados. 5. Caranguejo. I. Wagener, Angela de Luca Rebello. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Aos meus pais, Marco e Margareth, que
me ensinaram a lutar e não desistir mesmo
nos momentos mais difíceis e pelo amor e
carinho de sempre.

Agradecimentos

À Prof. Angela Wagener pela orientação e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho e por sua amizade e apoio ao longo desses anos de convivência.

À minha querida co-orientadora e amiga Dr. Adriana Haddad Nudi, pela confiança, apoio, paciência e ajuda desde as noites no laboratório até o fim deste trabalho, e principalmente por sua amizade ao longo de todos esses anos de convívio.

Ao Dr. Arthur Scofield, sempre disposto a ajudar e bom humor, esclarecendo dúvidas e dando sugestões pertinentes.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Juliana Felizzola por toda dedicação na infinita investigação dos metabólitos por CLAE/EM e pela amizade e convivência agradável ao longo deste período.

À estagiária Thaís por toda ajuda e disposição ao longo deste trabalho.

À “guria” Letícia pela disposição e bom humor, principalmente pela ajuda nas leituras das lâminas de MN

À querida amiga Cássia, sempre positiva e disposta a ajudar desde os tempos da monografia.

À Cris, por toda ajuda, paciência e companheirismos nos dias e noites sobre os livros e ao apoio ao longo desses dois anos de amizade.

Ao Vitor e Felipe pela amizade e ajuda no laboratório com ou sem Heineken.

À Ivy, Lílian, Lígia, Kate, Núbia, Ricardo, Welington e Rafael pelo ótimo ambiente de trabalho e convívio.

À Eleine Francioni pelas oportunidades e conhecimentos transferidos.

Aos amigos Catau, Rodrigo e Lú pelo carinho e amizade de longas datas.

À Nadia, Lú, Dani e Dió, família do coração, pelo carinho dedicado.

Ao Dan pela paciência, carinho e companheirismo.

Aos meus pais, pelo apoio, amor e torcida. Que não me deixaram faltar nada, mesmo com dificuldades. Meu amor e gratidão eternos.

Aos meus amados irmãos, Rafael e Daniele, e ao cunhado Ricardo por estarem torcendo sempre por mim e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus sobrinhos Pepe e Manu, alegrias da minha vida.

Resumo

Sette, Carla Borges; Wagener, Angela de Luca Rebello (orientadora). **Formação e identificação de metabólitos de fenantreno e homólogos alquilados em caranguejo *Ucides cordatus***. Rio de Janeiro, 2010. 114p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a formação de metabólitos de fenantrenos, parental e alquilados, em urina de caranguejos da espécie ***Ucides cordatus***. Foram realizados bioensaios em laboratório com exposição dos organismos ao fenantreno ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$), bioensaio com exposição aos homólogos alquilados de fenantreno (Fen), 1-metilfenantreno (1-MeF) e 2,6,9-trimetilfenantreno (2,6,9-TriMeF) ($0,0125 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $0,025 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente), bioensaio com inoculação de óleo Árabe e bioensaio com exposição à sedimento contaminado por HPA. O tempo dos experimentos máximo foi de 96 h e nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h foram coletadas amostras (1) urina para avaliação da resposta biológica através da formação de metabólitos, (2) hemolinfa para realização do ensaio do micronúcleo para verificar a formação de mutações celulares e (3) hepatopâncreas para determinação de HPA totais por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM), principalmente os compostos de interesse no presente trabalho. Foram desenvolvidas metodologias para medidas de metabólitos em urina de caranguejo utilizando como ferramentas a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (CLAE/EM) com APCI. Foi identificada a formação dos metabólitos hidroxifenantreno (OHF) por CLAE/F e, outros metabólitos de fenantreno hidroxilados, epóxidos, ortoquinonas e conjugados de glicosídeos por CLAE/EM em amostras de urina injetadas com Fen, 1-MeF e 2,6,9-TriMeF. Ambas as metodologias apresentaram boa sensibilidade (LQ = 0,001 e $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e boa linearidade ($r^2 = 0,9998$ e $0,9997$, respectivamente). Não foi observada presença de mutações

nas células presentes nas lâminas de hemolinfa nos grupos inoculados com óleo e Fen ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e as mutações encontradas nas células dos grupos inoculados com Fen ($3 \mu\text{g.kg}^{-1}$), 1-MeF e 2,6,9-TriMeF não mostram resultado significativo. O grupo exposto ao sedimento de Suruí mostrou alterações na formação de micronúcleos (MN). As análises de HPA realizadas nas amostras de hepatopâncreas mostraram aumento na concentração de fenantreno naqueles grupos nos quais foi injetado o composto fenantreno, e não foi observada alteração nas concentrações dos metilados de fenantreno naqueles grupos injetados com 1-metilfenantreno e 2,6,9-trimetilfenantreno. Os métodos se mostraram eficiente para uma avaliação preliminar da formação de metabólitos de fenantreno. Porém as baixas concentrações de 1-metilfenantreno e 2,6,9-trimetilfenantreno as quais os caranguejos foram expostos, não permitiram uma melhor avaliação dos dados para este grupos.

Palavras chave

HPA; Fenantreno; HPA alquilados; Caranguejo.

Abstract

Sette, Carla Borges; Wagener, Angela de Luca Rebello (advisor). **Formation and identification of phenanthrene and its alkyl group metabolites in *Ucides cordatus* crab.** Rio de Janeiro, 2010. 114p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The main goal of this study was to evaluate the formation of phenanthrenes metabolites, parental and alkylated, in crabs *Ucides cordatus* urine. Laboratory experiments were carried out exposing organisms to phenanthrene ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$), to the phenanthrene homologues alkylated, 1-methylphenanthrene and 2,6,9-trimethylphenanthrene ($0,0125 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $0,025 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively), to a Arabe oil and to a PAH contaminated sediment. The experiment maximum time was 96 h and at 0, 24, 48, 72 and 96 h were collected samples of: (1) urine to perform tests in order to evaluate the biological response about the formation of phenanthrene metabolites, (2) hemolymph to perform the micronucleus assay in order to verify cell mutations formation and (3) hepatopancreas to the determination of total PAH, especially this work's interest compounds. Methodologies were developed to metabolites measurements in crab's urine using kind of tools as the high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC/F) and high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection (LC/MS). Were identified the formation of hydroxyphenanthrene (OHF) and other metabolites of phenanthrene, di- and tri-hydroxylated in urine samples injected with phenanthrene and trimethylphenanthrene. Both methods showed good sensitivity (LOQ = 0,001 and $0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively) and good linearity ($r^2 = 0,9998$ and $0,9997$, respectively). There was no presence of mutated cells in the hemolymph slides in either group of bioassays. Analysis of PAH in hepatopancreas samples showed an

increase in phenanthrene concentration in those groups of which the phenanthrene was the compound injected, and there was no concentrations change in methylphenanthrene on those groups injected with 1-methylphenanthrene and 2,6,9 - trimethylphenanthrene. The methods were showed to be effective in a preliminary assessment of phenanthrene and 2,6,9-trimethylphenanthrene metabolites formation. But the 1-methylphenanthrene and 2,6,9-trimethylphenanthrene low concentrations which the crabs were exposed, did not allow having a better evaluation of the data to this groups.

Keywords

PAH; phenanthrene; alkyl PAH; crabs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	23
2.2. Ferramentas analíticas	36
2.3. Ensaio do micronúcleo	38
2.4. <i>Ucides cordatus</i>	39
3. METODOLOGIA	41
3.1. Material utilizado	41
3.2. Desenvolvimento do método analítico para CLAE/F	41
3.3. Desenvolvimento do método analítico para CLAE/EM	47
3.4. Bioensaio	48
3.5. Preparo das amostras de urina	51
3.6. Coleta das amostras de hepatopâncreas de <i>Ucides cordatus</i>	54
3.7. Análise de HPA em hepatopâncreas de <i>Ucides cordatus</i>	55
3.8. Análise em sedimento	58
3.9. Análise instrumental de HPA por CG/EM	58
3.10. Ensaio do micronúcleo	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Bioensaio 1	63

4.2. Bioensaio 2	68
4.3. Bioensaio 3	71
5. CONCLUSÃO	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7. ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 Estruturas dos 16 HPA prioritários pela USEPA	24
Figura 2. 2 Estruturas de fenantrenos alquilados e metabólitos hidroxilados	25
Figura 2. 3 Concentrações relativas dos HPA parentais e alquilados em mistura pirogênica (barras escuras) e em petróleo (barras claras). N-Naftaleno e C-Criseno (Neff, 2002).	28
Figura 2. 4 Representação gráfica tridimensional simplificada de membrana celular (Alberts et al, 2004)	29
Figura 2. 5 Esquema metabólico de hidrocarbonetos policíclico aromáticos utilizando o fenantreno como modelo (adaptado de Onyemauwa et al, 2009).	33
Figura 2. 6 Modelo de processo de biotransformação de HPA com etapas de ativação e conjugação do composto.	35
Figura 2. 7 Estruturas Fenantreno e Benzo(a)Pireno com representação da região concôva (Baía).	36
Figura 3. 1 Cromatogramas do padrão composto por pireno, fenantreno, 1-OHpireno, 1-OHfenantreno, 1-metilfenantreno e 2,6,9-trimetilfenantreno (100 ng.mL ⁻¹) nos seguintes comprimentos de ondas: (a) Ex 252/Em 357, (b) Ex 288/Em 364 (Napola <i>et al</i> , 2006), (c) Ex 269/Em 380 (Ariese <i>et al</i> , 2005), (d) Ex 260/Em 380 (You <i>et AL</i> , 2007), (e) Ex 270/Em 350 (Shen <i>et AL</i> , 2009). Pico (I) 1-OHF, (II) Fen, (III) 1-MeF e (IV) 2,6,9-TriMeF.	43
Figura 3. 2 Curva analítica de 1-OHF (n=3)	45

Figura 3. 3 Cromatograma da urina controle fortificada com 1-OHF, Fen, 1-MeF e 2,6,9-TriMeF (100 ng.mL-1)	46
Figura 3. 4 Curva analítica de 1-OHF em urina de caranguejo (n=3).	46
Figura 3. 5 Coleta de caranguejos no manguezal de Barra de Guaratiba	48
Figura 3. 6. Bioensaio com sedimento de Suruí e bioensaio com inoculação	49
Figura 3. 7. Fluxograma do bioensaio com caranguejos <i>Ucides cordatus</i> realizado por 72 horas.	50
Figura 3. 8. Coletade de urina para determinação de metabólitos	51
Figura 3. 9. Fluxograma com os procedimentos realizados nas amostras de urina de caranguejo <i>Ucides cordatus</i> .	52
Figura 3. 10. Banho de areia para reação de hidrolise com temperatura controlada	53
Figura 3. 11. Extração em fase sólida	54
Figura 3. 12. Retirada da amostra de hepatopâncreas do organismo.	55
Figura 3. 13.Extração do hepatopâncreas em soxhlet	55
Figura 3. 14. Fracionamento de HPA em coluna de sílica/alumina	57
Figura 3. 15. Fluxograma do ensaio do micronúcleo.	60
Figura 3. 16. Coleta (a) e esfregaço da hemolinfa nas lâminas de vidro (b) para teste do MN	61
Figura 4. 1 Cromatograma de amostra de urina após 24 horas da inoculação com fenantreno.	64
Figura 4. 2 Concentração de fenantreno no hepatopâncreas dos organismos inoculadon com fenantreno após 12, 24, 48 e 72 horas da inoculação.	65
Figura 4. 3 Perfil cromatográfico dos HPA no óleo tipo Árabe (a) e nas amostras de hepatopâncreas de organismos inoculados com o óleo (b)	67

- Figura 4. 4 Perfil cromatográfico dos HPA individuais no sedimento de Suruí no início e final (após 96 horas) do bioensaio II (n=5). 69
- Figura 4. 5 Perfil cromatográfico dos HPA individuais no hepatopâncreas dos indivíduos após 96 horas de exposição ao sedimento de Suruí e dos organismos controle no bioensaio II. 70
- Figura 4. 6 Gráfico de frequência de MN nos hemócitos de caranguejos expostos ao sedimento proveniente do manguezal de suruí coletados após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. 71
- Figura 4. 7 Cromatograma por CLAE/F de amostra de urina do bioensaio III após 48 horas da inoculação de fenantreno (3 mg.kg^{-1}): (A) urina não hidrolisada e (B) urina hidrolisada com β -glucuronidase-arilsulfatase. 73
- Figura 4. 8 Concentrações de OHF em equivalentes de 1-OH Fenantreno nas amostras de urina de organismos inoculados com fenantreno antes e após hidrolise enzimática com β -glucuronidase 73
- Figura 4. 9 Cromatograma amostra de urina coletada após 72h da inoculação de fenantreno por CLAE/F 74
- Figura 4. 10 Cromatogramas por CLAE/F de amostra de urina do bioensaio III após 48 horas da inoculação de 1-Metil fenantreno: (A) urina não hidrolizada e (B) urina hidrolizada com β -glucuronidase-arilsulfatase. 75
- Figura 4. 11 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina controle 72h não hidrolisada 79
- Figura 4. 12 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina controle 72h hidrolisada 80
- Figura 4. 13 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 48h não hidrolisada destacando os metabólitos encontrados e suas possíveis estruturas. 81

Figura 4. 14 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 72h não hidrolisada	82
Figura 4. 15 (A) Concentração de fenantreno no hepatopâncreas e (B) somatório das áreas de fragmentos de glicosídeo ao longo do experimento nas amostras de urina não hidrolisadas dos caranguejos inoculados com fenantreno	82
Figura 4. 16 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 24h após hidrólise destacando os metabólitos e seus espectros de massas.	83
Figura 4. 17 Gráfico representando as áreas encontradas para o metabólito fenantreno ortoquinona nas amostras de 1-MeF hidrolisadas	84
Figura 4. 18 Transformação metabólica proposta para formação de fenantreno ortoquinona	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 Propriedades físico-químicas de alguns HPA (adaptado de Netto et al, 2000 e Morrisson, 1999).	26
Tabela 2. 2. Propriedades físico-químicas de alguns HPA alquilados (adaptado de Neff, 2002).	26
Tabela 2. 3. Métodos utilizados para detecção de HPA e seus metabólitos em diferentes matrizes ambientais e biológicas.	38
Tabela 3. 1 Condições de análise das amostras de urina por CLAE/F	44
Tabela 3. 2. Condições de análise das amostras de urina por CLAE/EM	47
Tabela 3. 3. Condições instrumentais utilizadas para determinação de HPA individuais.	59
Tabela 4. 1 Concentrações de fenantreno e homólogos alquilados encontradas no óleo árabe e concentração inoculada nos organismos para o bioensaio	65
Tabela 4. 2 Somatório das concentrações dos 16 HPA e HPA totais nas amostras de hepatopâncreas do bioensaio 1 após 24 e 48 horas ds inoculação.	68
Tabela 4. 3 Concentrações do somatório dos 16 HPA (USEPA) e HPA totais em sedimento do bioensaio II.	69
Tabela 4. 4 Possíveis metabólitos encontrados nas amostras controle e inoculadas com fenantreno, 1-Metil fenantreno e 2,6,9-Trimetil fenantreno não	

hidrolisadas e suas possíveis estruturas
moleculares e massas por CLAE/EM.

76

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier