

3. Metodologia

3.1. Material utilizado

Solventes: Metanol da marca Mallinckrodt[®], grau pesticida, água ultra pura Direct-Q foram utilizados como fase móvel no método por CLAE/F. Os solventes diclorometano, acetona e n-hexano utilizados nos procedimentos para análise de HPA foram obtidos da Mallinckrodt[®] e o ciclohexano obtido da Tedia. Todos os solventes utilizados foram grau pesticida.

Ambos os solventes foram filtrados em membrana de PTFE 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,22 µm

Reagentes: O detergente utilizado para limpeza das vidrarias foi o Detertec 7 neutro (Vetec). Os padrões de fenantreno, 1-OH-fenantreno, 1-metil-fenantreno e 2,6,9-trimetil-fenantreno foram obtidos do laboratório Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha). A enzima β-glucuronidase de *Helix pomatia* 94.500 unid/mL foi obtida da Sigma (Steinheim, Alemanha). Os reagentes utilizados nos procedimentos para análise de HPA foram Sulfato de sódio anidro, grau P.A. (Merck[®]), descontaminado em mufla a 450°C por 6 horas e mantido em estufa a 160°C; alumina (óxido de alumínio 90 ativo, neutro, Merck[®], 0,063 – 0,200 mm), descontaminada em mufla a 450 °C por 6 horas e 2% desativada com água ultra pura Direct-Q; Sílica-gel (G60, Merck[®], 0,063 – 0,200 mm), descontaminada em Soxhlet por 6 horas em diclorometano e armazenada em estufa a 160°C. Os padrões de HPA, p-terfenil e padrões internos foram obtidos da Accustandard (New Haven, EUA).

Vidraria: Toda a vidraria utilizada, Soxhlet, balões de extração, bécheres, pipetas Pasteur, frascos de estocagem, demais vidrarias e gral de porcelana foram lavados com água da torneira, Detertec, água deionizada e descontaminados em mufla a 450 °C por 6 horas. As vidrarias volumétricas foram descontaminadas com acetona e diclorometano, após lavagem com detertec e água deionizada.

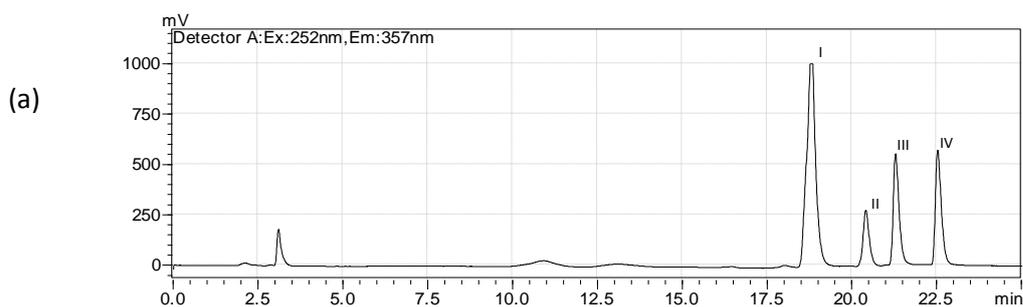
3.2. Desenvolvimento do método analítico para CLAE/F

O método utilizado no presente trabalho foi baseado na metodologia descrita por Nudi (2005) para metabólitos de pireno. Esta metodologia foi adaptada para determinação de metabólitos de fenantreno (1-hidroxifenantreno, 2-hidroxifenantreno, 3-hidroxifenantreno e 9-hidroxifenantreno), para os quais existem padrões disponíveis comercialmente, metabólitos conjugados e metabólitos de compostos alquilados de fenantreno, para os quais não há padrões disponíveis.

O trabalho incluiu a realização de experimentos com caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, onde foram inoculadas concentrações de fenantreno (FEN), 1-metil-fenantreno (1-MeF), 2,6,9-Trimetil-fenantreno (2,6,9-TriMeF) e óleo árabe leve.

3.2.1 Determinação dos comprimentos de onda e parâmetros instrumentais

Foram realizados testes para encontrar-se o melhor comprimento de onda para determinação de fenantreno (FEN), 1-hidroxi-fenantreno (1-OHF), 1-metil-fenantreno, 2,6,9-trimetil-fenantreno (Fig 3.1). As condições experimentais foram testadas em CLAE/F em comprimentos de onda sugeridos na literatura para detecção de FEN e OHF, utilizando uma coluna Vydac C18, 4,6 x 250 mm, 5 μ m (fig. 3.1). As condições finais de análise estão na tabela 3.1.



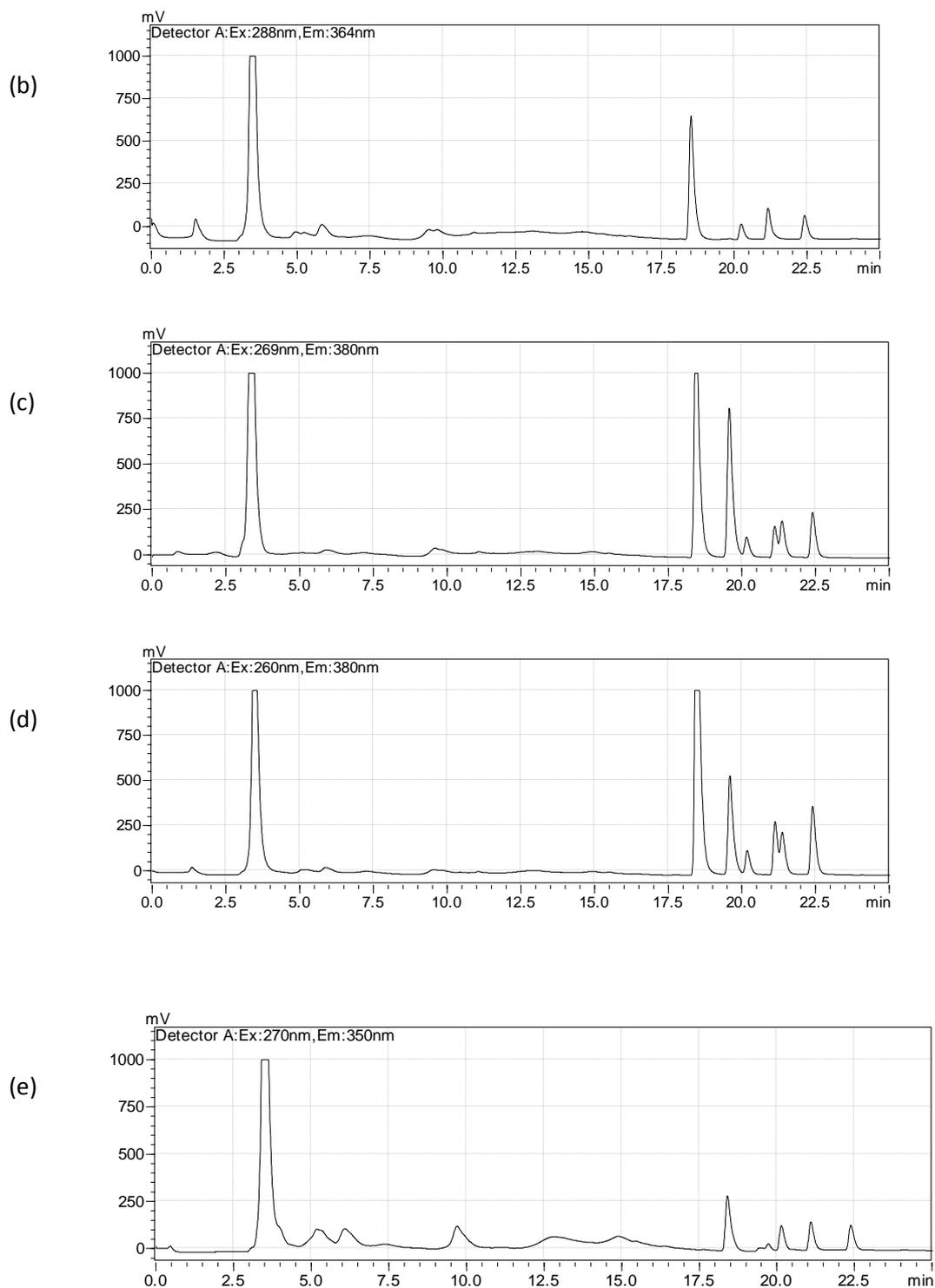


Figura 3. 1 Cromatogramas do padrão composto por pireno, fenantreno, 1-OHpireno, 1-OHfenantreno, 1-metilfenantreno e 2,6,9-trimetilfenantreno ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) nos seguintes comprimentos de ondas: (a) Ex 252/Em 357, (b) Ex 288/Em 364 (Napola *et al*, 2006), (c) Ex 269/Em 380 (Ariese *et al*, 2005), (d) Ex 260/Em 380 (You *et AL*, 2007), (e) Ex 270/Em 350 (Shen *et AL*, 2009). Pico (I) 1-OHF, (II) Fen, (III) 1-MeF e (IV) 2,6,9-TriMeF.

Tabela 3. 1 Condições de análise das amostras de urina por CLAE/F

| | |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Equipamento | HPLC LC-10AD Shimadzu |
| Detector | Fluorescência RF-10AXL Shimadzu |
| Coluna | Vydac C18, 4,6 x 250 mm, 5 μ m |
| Volume de injeção | 50 μ m |
| Solvente | Metanol:água |
| Comprimento de onda excitação (λ) | 252 nm |
| Comprimento de onda emissão (λ) | 357 nm |
| Gradiente | 5 min 90% água / 10% metanol 18 min 100% metanol 25 min 100% metanol 30 min 90% água / 10% metanol |
| Tempo de corrida | 30 minutos |
| Fluxo | 1 mL.min ⁻¹ |

3.2.2 Curva analítica e quantificação das amostras

As soluções de fenantreno (2; 5; 10; 20; 50; e 100 ng.mL⁻¹), 1-OHFenantreno (0,8; 1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 ng.mL⁻¹), 1-metilfenantreno, (1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 ng.mL⁻¹) e 2,6,9-trimetilfenantreno (1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 ng.mL⁻¹), foram preparadas em metanol, protegidos da luminosidade com papel laminado e armazenadas em geladeira. As curvas analíticas foram realizadas antes das análises das amostras e a quantificação de hidroxifenantreno foi realizada a partir da declividade da curva de 1-OHFen (Fig 3.2). As curvas analíticas apresentaram boa linearidade ($r^2=0,9994$, $r^2=0,9995$, $r^2=0,9974$, $r^2=0,9998$, respectivamente). O limite de detecção (LD) para 1-OHF foi determinado pelo desvio padrão de sete análises do padrão (S) de 1-OHF na menor concentração detectável multiplicado por 3, e somando-se à concentração do branco da amostra ($0 + 3S$).

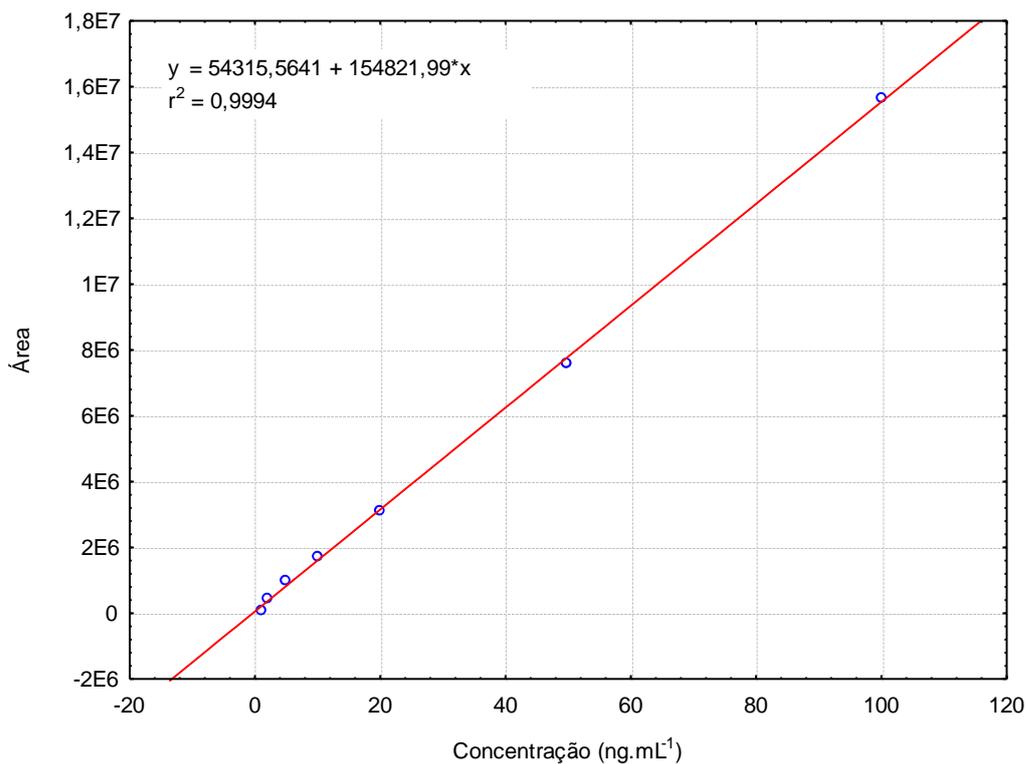


Figura 3. 2 Curva analítica de 1-OHF (n=3)

3.2.3 Interferência de matriz

Foram testadas a interferência da matriz, urina, sobre as soluções padrão de fenantreno, 1-OHfenantreno, 1-metilfenantreno, 2,6,9-trimetilfenantreno (Fig.3.3). Foi construída uma curva analítica com as concentrações de 2, 5, 10, 20,50 e 100 ng.mL⁻¹ (Fig. 3.4) em solução de urina previamente diluída 10 vezes em metanol/água 1:1 e filtradas em cartucho MillexTM de PTFE (0,22 μm, 13 mm)

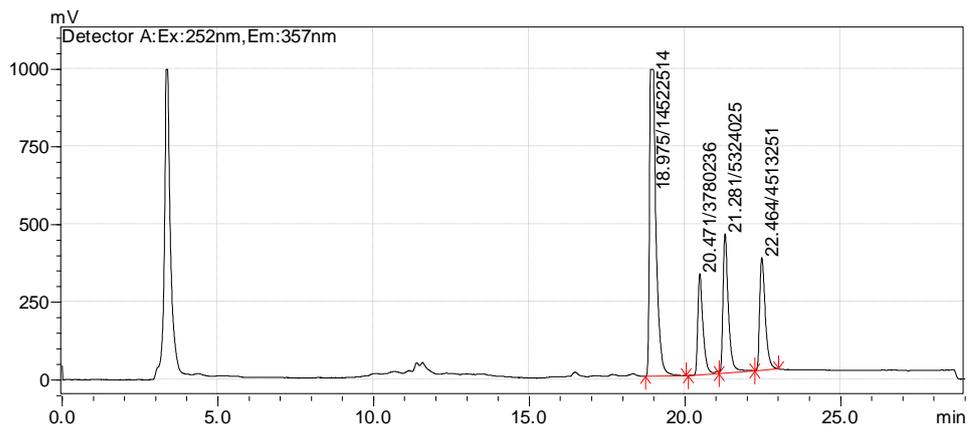


Figura 3. 3 Cromatograma da urina controle fortificada com 1-OHF, Fen, 1-MeF e 2,6,9-TriMeF (100 ng.mL⁻¹)

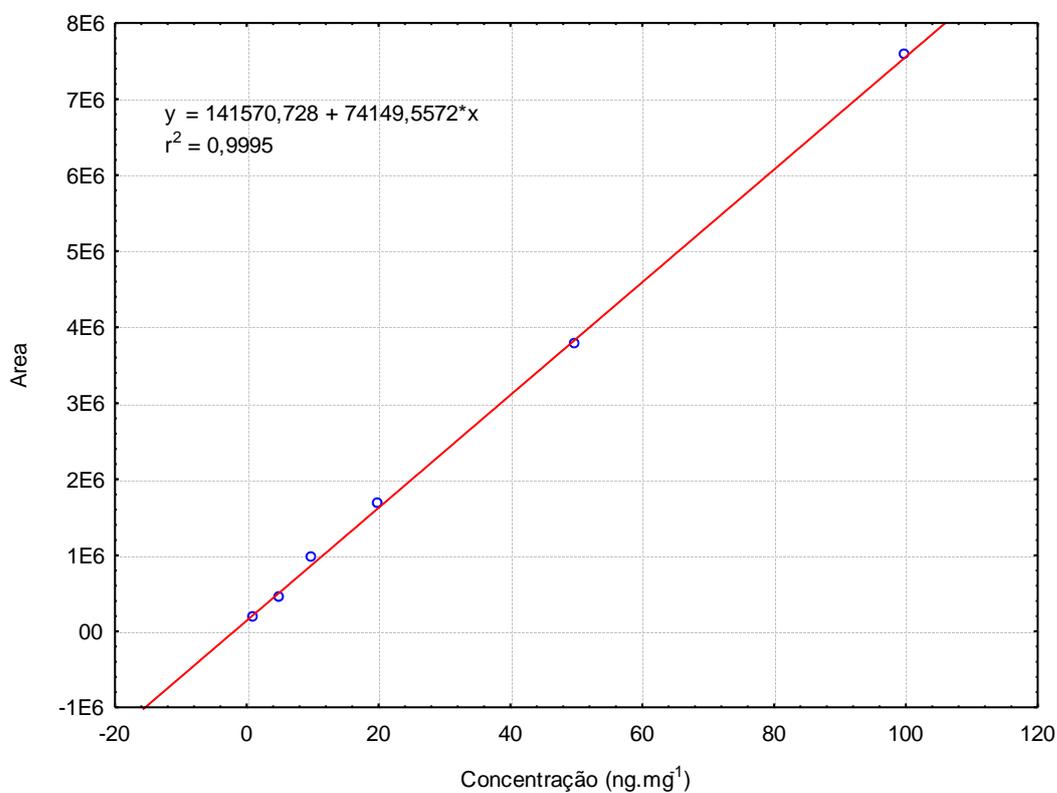


Figura 3. 4 Curva analítica de 1-OHF em urina de caranguejo (n=3).

3.2.4 Repetibilidade analítica

A repetibilidade do método foi testada injetando-se 10 vezes a mesma solução do padrão de 1-OHF (1 ng.mL⁻¹) em metanol (Eurachem Guide), nas condições cromatográficas descritas anteriormente na tabela 3.1.

3.3. Desenvolvimento do método analítico para CLAE/EM

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) vem sendo introduzida nos últimos anos a fim de eliminar etapas de derivatização necessárias para CG/EM e estabelecer uma melhor especificidade, não alcançada com os métodos de fluorescência (Xu *et al*, 2004). As técnicas de CLAE/EM mais utilizadas são as realizadas com ionização por *eletrospray* (ESI) e ionização química em pressão atmosférica (APCI), ambas são técnicas de ionização à pressão atmosférica (API). Como as técnicas de ESI e APCI, a CLAE/EM tem sido aplicada em diversas áreas, como em análises ambientais (Niessen, 2003).

Neste trabalho as análises por CLAE/EM foram realizadas em um equipamento Thermo LCQ Fleet acoplado a um injetor automático Rheodyne, nas condições descritas na tabela 3.2.

Todas as fragmentações dos picos foram verificadas pela elaboração de fragmentos de protonação em APCI utilizando o programa do MASS Frontier 5.0 além da comparação com as bibliografias disponíveis.

Tabela 3. 2. Condições de análise das amostras de urina por CLAE/EM

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Equipamento | Thermo LCQ Fleet |
| Detector | Espectrômetro de Massas |
| Coluna | Vydac C18, 4,6 x 250 mm, 5 µm |
| Fonte de íons | APCI |
| Temperatura de vaporização | 450 °C |
| Solvente | Metanol:água |
| Gradiente | 5 min 90% água / 10% metanol 25 min 100% metanol 28 min 90% água / 10% metanol |
| Tempo de corrida | 28 minutos |
| Fluxo | 0,8 mL.min ⁻¹ |
| Pressão do gás auxiliar | 20 (unidades arbitrárias) |
| Pressão do gás <i>sweet</i> | 0 (unidades arbitrárias) |
| Temperatura capilar | 300 °C |
| Voltagem capilar | 50 v |
| Polaridade | Positiva |
| Aquisição de dados | Full scan MS ² |

3.4. Bioensaio

3.4.1 Amostragem e montagem do bioensaio

Os animais, aproximadamente 30 caranguejos em cada bioensaio com massa média 123 g, foram coletados por catadores profissionais no manguezal de Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, (Fig. 3.5). Foram utilizados apenas organismos machos adultos, com largura da carapaça maior que 62 mm e fora do período de muda, ou seja, com a carapaça rígida, pois a mudança comportamental e metabólica a qual os organismos estão sujeitos nessa fase poderia influenciar os resultados do experimento.



Figura 3. 5 Coleta de caranguejos no manguezal de Barra de Guaratiba

No laboratório os animais foram limpos, para retirada do excesso de lama e realizadas as medidas de peso e largura da carapaça com o auxílio de uma balança mecânica e um paquímetro. Em seguida foi retirada a urina dos organismos e três indivíduos foram sacrificados para realização da análise de HPA no hepatopâncreas dos mesmos. Os animais foram então acondicionados em tanques de polipropileno, com água com salinidade entre 28 e 32, com temperatura mantida em $19^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e alimentados diariamente com vegetais. Os caranguejos foram deixados nos tanques, nestas condições por 5 dias para depuração. Durante este período os tanques foram limpos e a água trocada diariamente.

Foram realizados três bioensaios em datas diferentes. O bioensaio I foi realizado em agosto de 2009, quando após o período de aclimatação os

caranguejos foram separados em 3 grupos, dos quais um grupo controle (com inoculação de DMSO da Sigma), um grupo inoculado com solução de fenantreno em DMSO (2 mg.kg^{-1}) e o terceiro grupo inoculado com uma solução de óleo do tipo Árabe ($150 \mu\text{L}$ de solução de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$). O experimento teve duração de 48 horas e foram coletadas nas amostras de campo, no início do experimento e a cada 24 horas a seguir (24 e 48h), amostras de urina para análise de metabólitos por CLAE/F e CLAE/EM, hemolinfa para realização do teste do micronúcleo e hepatopâncreas para determinação de HPA por CG/EM (seção 3.7).

O bioensaio II foi realizado em setembro de 2009. Neste experimento foram separados dois grupos, um controle apenas com água salina e um grupo exposto a sedimento previamente coletados no manguezal de Suruí (Figura 3.6). O sedimento foi coletado no dia anterior ao início do bioensaio em painéis de alumínio com auxílio de espátulas, ambas descontaminadas com diclorometano. O experimento transcorreu por um período de 96 horas. Foram coletadas amostras de urina e hemolinfa a cada 24 horas após o início do ensaio e ao final do experimento os organismos foram sacrificados e dissecados para retirada do hepatopâncreas para realização das análises descritas anteriormente. Foi realizada análise de HPA por CG/EM (seção 3.8) no sedimento a qual os animais foram expostos.



Figura 3. 6. Bioensaio com sedimento de Suruí e bioensaio com inoculação

No terceiro experimento (Bioensaio III) os caranguejos foram separados em quatro grupos com dez indivíduos cada. O primeiro grupo foi o grupo controle, os grupos seguintes sofreram inoculação com os seguintes padrões diluídos em DMSO: fenantreno ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), 1-metil-fenantreno ($1,25 \cdot 10^{-5} \text{ mg.kg}^{-1}$) e o

quarto com 2,6,9-trimetil-fenantreno ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mg.kg}^{-1}$). O DMSO é um solvente utilizado como veículo na inoculação de xenobióticos nos animais (Eickhoff, 2003). Foram coletadas amostras de urina, hemolinfa e hepatopâncreas, como citado nos ensaios anteriores, a cada 24 horas totalizando 72 horas de experimento exceto para o grupo inoculado com 1-MeF, o qual houve coleta das matrizes citadas também após 96 horas da inoculação. O fluxograma destes bioensaios é apresentado na figura 3.7.

O “pool” das amostras de urina coletadas em cada bioensaio foi acondicionado em tubos de Ependorf e congeladas em N_2 líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise, assim como as amostras de hepatopâncreas. O esfregaço da hemolinfa para preparo das lâminas para realização do teste de micronúcleo foi realizado assim que as amostras foram coletadas.

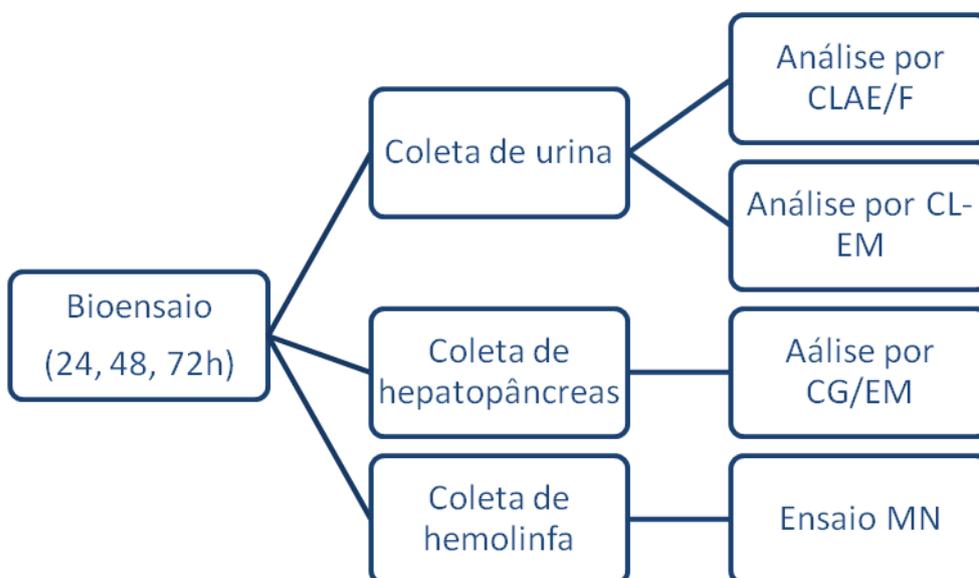


Figura 3. 7. Fluxograma do bioensaio com caranguejos *Ucides cordatus* realizado por 72 horas.

3.4.2 Coleta das amostras de urina

As amostras de urina foram retiradas seguindo a técnica descrita por Bamber e Naylor (1997), com algumas alterações devido à diferença na

localização do opérculo do *Ucides cordatus* em relação à espécie *Carcinus maenas*.

Após retirados dos tanques, os organismos foram secos e então imobilizados com elásticos, colocando-se sua superfície ventral para cima sob um microscópio estereoscópico. O opérculo dos indivíduos foram levantados com o auxílio de um instrumento pontiagudo, estimulando o fluxo urinário, que era coletado com o auxílio de uma micropipeta de 200 μL com pontas flexíveis (figura 3.8). As amostras de urina eram transferidas para tubos de microcentrífuga siliconizados da marca Ependorf, congeladas sob nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80° C até o momento da análise.



Figura 3. 8. Coletade de urina para determinação de metabólitos

3.5. Preparo das amostras de urina

Antes das análises as amostras foram descongeladas, diluídas 1:10 em solução de metanol:água (1:1) e filtradas em MillexTM, com membrana de PTFE (poro de 0,22 μm e 13 mm diâmetro), a fim de evitar a presença de partículas no sistema cromatográfico, e então transferidas para frascos de vidro de 2 mL, protegidas da luminosidade com papel laminado, para então serem injetadas para análise por CLAE/F. O fluxograma para determinação de metabólitos de fenantreno em urina de *Ucides cordatus* é apresentado na figura 3.9.

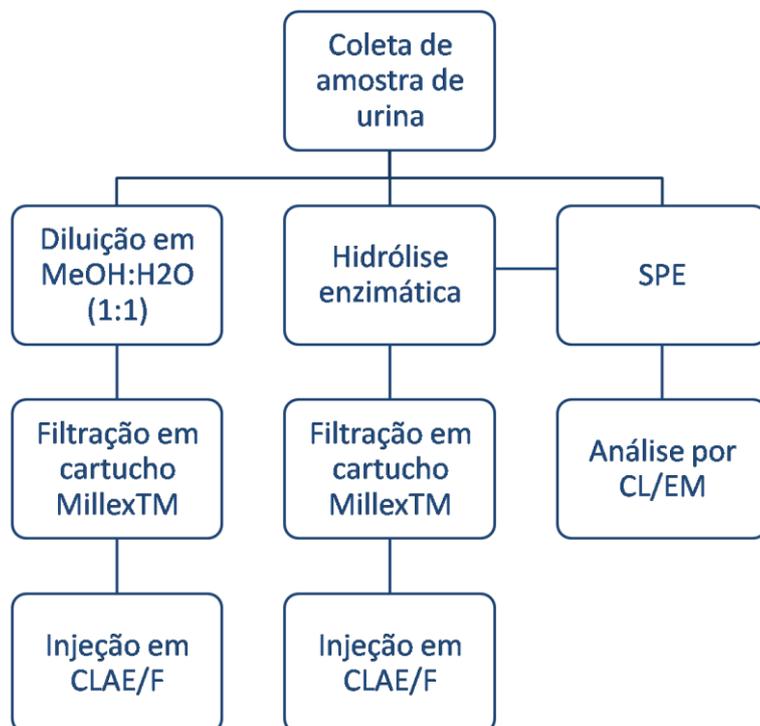


Figura 3. 9. Fluxograma com os procedimentos realizados nas amostras de urina de caranguejo *Ucides cordatus*.

3.5.1 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas com β -glucuronidase foram realizadas para avaliar a formação de metabólitos conjugados produzidos pela inoculação de fenantreno e homólogos alquilados em caranguejos. O uso desta enzima na quebra de conjugados de glucosidase e sulfato, presentes nos caranguejos, foi testada com sucesso por Nudi e colaboradores (2009).

Foram utilizadas alíquotas de 100 μL de amostras de urinas, coletadas a cada 24 horas desde o início do bioensaio, as quais eram transferidas para um frasco contendo 20 μL de enzima β -Glucuronidase em 380 μL em tampão acetato de amônio (pH 5). A solução foi encubada por 2 horas em temperatura controlada a 37°C (Fig. 3.10). A reação foi interrompida adicionando 500 μL de metanol. A solução final foi filtrada em cartuchos descartáveis MillexTM (MILLIPORE, Membrana PTFE 0,22 μm de poro e 13 mm de diâmetro) para posterior injeção em CLAE/F.



Figura 3. 10. Banho de areia para reação de hidrólise com temperatura controlada

3.5.2 Extração em fase sólida

Foi realizado o procedimento de extração em fase sólida como uma etapa de *clean-up* para as amostras destinadas às análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE/EM).

Após serem retiradas do freezer -80°C , as amostras foram levadas à temperatura ambiente no laboratório (22°C), uma alíquota de $100\ \mu\text{L}$ foi diluída em $10\ \text{mL}$ de solução tampão de acetato de amônio ($\text{pH}\ 5$), e transferida para o cartucho de SPE Bond Elution C18, Varian. Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com metanol e água. Em seguida os analitos foram eluídos em diclorometano, acetona e metanol (Fig. 3.11). Os extratos foram evaporados e o solvente trocado para metanol sob purga de N_2 , seguindo-se a avolumação a $1\ \text{mL}$ com metanol em balão volumétrico e a análise por CLAE/EM. As amostras destinadas à análise por CLAE/EM, após passarem pela reação de hidrólise descrita no item 3.3.3.1, exceto pela adição do metanol, foram transferidas diretamente para o cartucho de SPE pré-condicionados, seguindo o procedimento descrito acima.



Figura 3. 11. Extração em fase sólida

3.5.3 Análise de metabólitos por CLAE/F

3.5.3.1 Condições experimentais para análise

As análises de metabólitos em urina de caranguejo *Ucides cordatus* seguiram as condições experimentais descritas nos itens 3.1 e 3.2

3.5.3.2 Identificação dos metabólitos

A avaliação dos metabólitos produzidos pela inoculação de fenantreno, homólogos alquilados e óleo árabe leve incluiu a identificação por comparação com padrão de 1-OHF e as reações de hidrólises com a enzima β -glucuronidase.

3.6. Coleta das amostras de hepatopâncreas de *Ucides cordatus*

Após a coleta de hemolinfa e urina alguns caranguejos foram sacrificados e tiveram seu hepatopâncreas coletado para análise de HPA totais (Fig 3.12).

A carapaça do organismo foi cortada com uma tesoura, o material biológico foi coletado com auxílio de uma pinça e transferido para um recipiente de vidro. O hepatopâncreas foi homogeneizado com Ultra Turrax (T-25 Basic, Ika Labor Technik) e armazenado em freezer -80°C .

Todo material utilizado foi lavado com detergente e água deionizada e descontaminados com acetona e diclorometano (pinças, tesouras e Ultra Turrax) ou muflados a 450°C (potes de vidro).



Figura 3. 12. Retirada da amostra de hepatopâncreas do organismo.

3.7. Análise de HPA em hepatopâncreas de *Ucides cordatus*

3.7.1 Extração

Pesou-se aproximadamente 2 g da amostra úmida em um bécher e adicionou-se Na_2SO_4 previamente descontaminados em mufla a 450 °C. A amostra foi transferida para um Soxhlet de vidro com cartucho de celulose (previamente descontaminados com diclorometano por 6 horas) e extraído por 24 horas em 200 mL de diclorometano com um balão de 250 mL junto ao Soxhlet (Fig. 3.13), adicionando 50 μL do padrão sub-rogado p-terfenil (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O extrato teve seu volume reduzido em nitrogênio (N_2) no Turbovap.



Figura 3. 13.Extração do hepatopâncreas em soxhlet

3.7.2 Pré -fracionamento

O teor de lipídios foi reduzido através do procedimento analítico descrito por Sauer e Boehm (1995). Foi realizado pré-fracionamento (coluna *clean-up*) em coluna de vidro (2,2 cm de diâmetro interno e 30 cm de comprimento) descontaminada com acetona e diclorometano. Após introdução de um pequeno chumaço de algodão na extremidade final da coluna, foi adicionado diclorometano até preencher cerca de 2/3 da coluna. A esta foram então adicionados 20 g de alumina neutra desativada a 2%. Após assentamento da alumina ao longo da coluna de vidro, esta foi lavada com 50 mL de n-hexano. O extrato foi, então, transferido cuidadosamente para a coluna e eluído com 100 mL de diclorometano. O extrato recolhido em balão de 250 mL foi concentrado em Turbovap. Devido à demora na entrega do conjunto de colunas para o procedimento de *clean-up* por cromatografia de permeação em gel (GPC), este procedimento foi repetido duas vezes para que fosse eliminado um maior conteúdo de lipídios da amostra, afim de que não houvesse interferentes nas análises por cromatografia gasosa com espectrometria de massas.

3.7.3 Clean-up por cromatografia de permeação em gel

Após o fracionamento observou-se que o pré-tratamento utilizado nas amostras de hepatopâncreas de caranguejo não foi suficiente retirada do lipídio da amostra de forma que este não interferisse nos cromatogramas gerados por CG/EM. Por tanto se optou pela utilização do pré-fracionamento com cromatografia de permeação em gel (CPG).

O solvente dos extratos foram trocados para acetona:ciclohexano (3:7) e seguiu-se o método descrito por Nudi, 2005. Após esta etapa de *clean-up* as amostras foram evaporadas em evaporador rotativo e avolumas em diclorometano.

3.7.4 Fracionamento dos HPA

A fração de hidrocarbonetos aromáticos foi obtida por cromatografia líquida em coluna de sílica/alumina. Foi empregada uma coluna de vidro (1,3 cm de diâmetro interno com 30 cm de comprimento), previamente descontaminada. Após o preenchimento da coluna com diclorometano foi adicionado um chumaço de algodão na extremidade inferior da mesma. Foram transferidos lentamente, 7 g de alumina desativada a 2%, 10 g de sílica-gel desativada a 5% e 1 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4), a fim de assegurar a remoção de água e evitar a ressuspensão da camada mais superficial. A fração dos hidrocarbonetos aromáticos foi recolhida em 100 mL de hexano:diclorometano (1:1), após a eluição em 50 mL de hexano para retirada dos hidrocarbonetos saturados. Foram então evaporadas e avolumadas a 1 mL acrescentando padrão interno deuterado (Fig. 3.14).



Figura 3. 14. Fracionamento de HPA em coluna de sílica/alumina

3.7.5 Determinação do teor de umidade e lipídio

Foram pesados, em vidro de relógio e com o auxílio de uma balança de quatro casas decimais da marca Mettler modelo AE200, 1g de cada amostra de heptopâncreas homogeneizada e levadas à estufa a 60°C. As amostras foram

sucessivamente pesadas até que atingissem uma massa constante. O teor de umidade foi determinado pela diferença da massa inicial úmida e a amostra final seca.

Foi extraído em soxhlet aproximadamente 3 gramas da amostra de hepatopâncreas como procedimento descrito no item 3.4.5.1. Após avolumação evaporação foi transferida para frascos de vidro de 7 mL previamente pesados, levados a estufa a 60°C e pesados até atingir peso constante. O teor de lipídios foi determinado pela diferença da massa pesada pela massa de lipídio extraído e seco e apresentada em percentual.

3.8. Análise em sedimento

Após o término do bioensaio II foi coletada, com auxílio de uma espátula de alumínio descontaminada, uma alíquota da amostra de sedimento, previamente homogeneizada, utilizado no experimento. A amostra foi transferida para um recipiente de vidro e congelada em freezer -20°C. Sem que a amostra fosse descongelada ela foi transferida para um aparelho de liofilização onde foi mantida por cinco dias consecutivos.

Foi pesado, aproximadamente, sete gramas (7 g) do sedimento liofilizado e moída, que foi transferido para um soxhlet em cartucho de celulose, seguindo-se o procedimento descrito para extração e fracionamento de hepatopâncreas de caranguejo nos itens 3.3.5.1 e 3.3.5.3 acima.

Foi determinado o teor de umidade no sedimento conforme o item 3.3.5.6.

3.9. Análise instrumental de HPA por CG/EM

As determinações qualitativas e quantitativas dos HPA em hepatopâncreas e sedimento foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM). O CG/EM é uma combinação de duas técnicas analíticas poderosas. O cromatógrafo de fase gasosa separa os

componentes da mistura no tempo e o espectrômetro de massas fornece informação que ajuda na identificação estrutural de cada componente (Kitson et al., 1996). Devido a estas características, o CG/EM tem sido utilizado, preferencialmente, na determinação de HPA em amostras ambientais (Baumard et al., 1998; Baumard e Budzinski, 1998; Figueiredo, 1999).

O instrumento usado foi um cromatógrafo Thermo Finigan Trace GC, acoplado com um detector de massas Finigan MAT-GCQTM e com coluna cromatográfica capilar J&W Scientific, tipo DB-5msMSD (alta resolução), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e revestida internamente com filme de 0,25 µm.

Tabela 3. 3. Condições instrumentais utilizadas para determinação de HPA individuais.

| | |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Equipamento | EM - Finnigan modelo GCQ GC – Finnigan modelo Trace GC |
| Coluna | J&W DB-5msMSD (30 m, 0,25 mm de DI e 0,25 µm de filme) |
| Programa de temperatura | 50 °C durante 5 min 50 °C·min ⁻¹ até 80 °C 6 °C·min ⁻¹ de 80 °C a 280 °C 280 °C durante 25 min |
| Gás de arraste | hélio 1,2 mL·min ⁻¹ |
| Volume de Injeção | 2 µL |

3.10. Ensaio do micronúcleo

Foram coletadas amostras de hemolinfa dos organismos utilizados nos bioensaios, para confecção das lâminas para o ensaio do micronúcleo, utilizando método de Nudi *et al*, 2010 como demonstrado no fluxograma da figura 3.15. As lâminas foram confeccionadas individualmente, de forma que cada lâmina representasse um indivíduo.

A hemolinfa foi extraída com seringas BD de 1 mL com agulhas de 21 gauge, 0,8 x 40 mm (Fig. 3.16a) e, após a retirada da agulha, foram transferidas

para as lâminas de vidro e espalhadas cuidadosamente com a ajuda de uma ponteira de micropipeta (Fig. 3.16b). Em seguida as lâminas foram depositadas em uma caixa escura por trinta minutos para que as células aderissem à lâmina. As lâminas foram então secas ao ar livre e fixadas em solução de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1), por, aproximadamente, vinte minutos e novamente secas ao ar livre. Após esses procedimentos as lâminas foram coradas em solução Giemsa (Sigma-Aldrich) a 3% por 20 minutos, quando foram lavadas com água deionizada a fim de retirar o excesso do corante. Quando as lâminas estavam secas eram aderidas lamínulas sobre a amostra com solução de Entellan[®] (Merk). As lâminas foram então analisadas sob microscópio com aumento de 1000X, contando-se, uma média, 1000 células normais por lâmina. A quantidade de micronúcleo presentes foi registrada.



Figura 3. 15. Fluxograma do ensaio do micronúcleo.



(a)



(b)

Figura 3. 16. Coleta (a) e esfregaço da hemolinfa nas lâminas de vidro (b) para teste do MN