

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos autores já demonstraram capacidade de metabolização dos caranguejos da espécie *Ucides cordatus* de alguns HPA transformando-os em compostos mais polares, menos hidrofóbicos para eliminação pelo sistema urinário (Nudi *et al*, 2010, Dissanayake *et al*, 2008, Nudi *et al*, 2007). Estudos prévios realizados no laboratório por CLAE/F mostraram a formação do metabólito hidroxifenantreno (OHF), após a exposição dos caranguejos *Ucides cordatus* ao fenantreno (não publicado).

O presente estudo visou a investigação da formação e identificação de metabólitos de fenantreno e seus homólogos alquilados a partir da inoculação de fenantreno, de um óleo do tipo árabe e compostos alquilados de fenantreno (doses únicas) em caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, por cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de fluorescência (CLAE/F) e espectrômetro de massas (CLAE/EM). A vantagem da utilização da urina comparada a outros fluídos biológicos neste tipo de investigação é favorecida pelo fato de não haver necessidade de etapas de extração longas e *clean up*, requerendo apenas diluição e filtração simples para análise por CLAE/F e extração em fase sólida para na álise por CLAE/EM, além disso, não há a necessidade do sacrifício dos organismos.

Devido a pouca informação disponível em relação à metabolização do fenantreno assim como metabolização dos compostos alquilados de uma forma geral, tomou-se como referência os estudos realizados também em outros HPA, principalmente o pireno, composto amplamente estudado (Nudi *et al*, 2010, Nudi *et al*, 2007, Ikenaka *et al*, 2007, Vuorinen *et al*, 2006, Stroomberg *et al*, 2004, Lima, 2001).

Estudos realizados com HPA mostraram que os compostos monohidroxilados, dihidrodíols e epóxidos parecem ser as classes dominantes de produtos do metabolismo na fase I da biotransformação. Na fase II a maioria dos compostos encontrados é apresentada na forma conjugada como glucuronídeos ou glicosídeos e sulfatos (Onyemauwa *et al*, 2009, Nudi *et al*, 2007, Vuorinen *et al*, 2006, Wu *et al*, 2005, Stroomberg *et al*, 2004, Stroomberg, 2002).

Foi necessária a realização de hidrólises enzimáticas com a enzima  $\beta$ -glucuronidase-arilsulfatase para a identificação da formação de metabólitos conjugados devido a ausência de padrões de metabólitos de fenantreno conjugados disponíveis comercialmente.

#### 4.1. Bioensaio 1

Os caranguejos foram mantidos no laboratório para um período de depuração e adaptação, a fim de que eliminassem todos os possíveis compostos que poderiam interferir no trabalho. Não houve sinal de nenhum dos compostos de interesse nas amostras de campo, controle e após a depuração nos cromatogramas por CLAE/F. Este bioensaio preliminar foi realizado em duas etapas, maio e agosto de 2009, com inoculação de óleo e fenantreno. Foram realizadas determinações de HPA individuais por CG/EM nas duas etapas e metabólitos por CLAE/F e ensaio do micronúcleo na segunda etapa (agosto/2009).

Após a inoculação do fenantreno ( $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) observou-se a formação de produtos do metabolismo de fase I, monohidroxi (figura 4.1) a partir de 24 horas de experimento, porém em concentrações abaixo ou muito próximas do limite de quantificação. Não foi possível a realização de reações de hidrólise enzimática para confirmação da presença de metabólitos conjugados devido a pouca quantidade de amostra de urina disponível para as análises.

A ausência de hidroxi fenantreno em concentrações quantificáveis pelo método utilizado nas amostras pode ter sido devida a dose (concentração) utilizada na inoculação. Por tanto o experimento foi repetido no bioensaio III (ver segmento 4.4) quando a concentração de fenantreno inoculado foi aumentada para  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Não existem muitas referências sobre a concentração ideal de inoculação de fenantreno em caranguejos, porém foi observado em hamster chinês por Jacob e colaboradores (1996) a formação de metabólitos a partir da exposição à concentração de 5,34 mg de fenantreno.

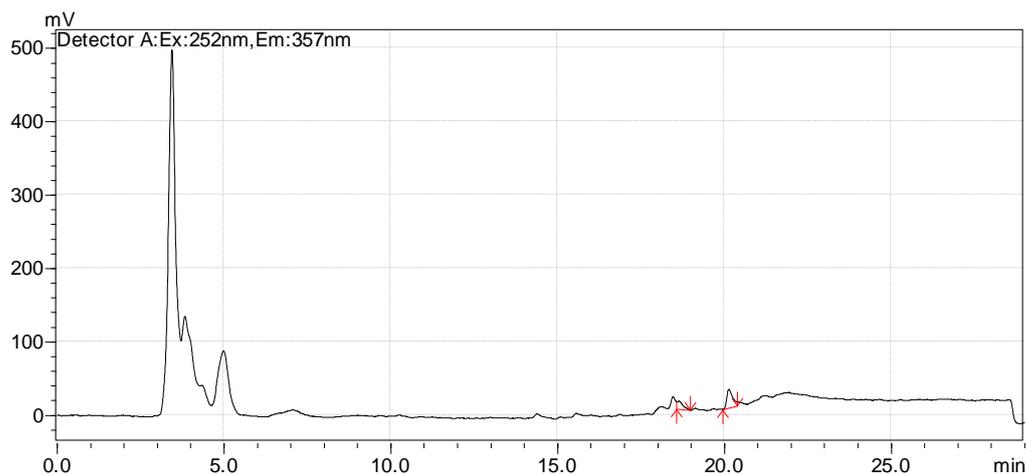


Figura 4. 1 Cromatograma de amostra de urina após 24 horas da inoculação com fenantreno.

A determinação de fenantreno no hepatopâncreas de caranguejos por CG/EM apresentou altas concentrações do composto nesta matriz na etapa do bioensaio realizada em maio de 2009. Tal concentração (figura 4.2) apresentou um aumento nas primeiras 24 horas (observações de 12 e 24 horas) quando alcançou sua concentração máxima decrescendo nas 48 horas seguintes (48 e 72 horas de experimento). Nudi e colaboradores (2010) mostraram que a metabolização do pireno por caranguejo ocorreu gerando conjugados de glicosídeo e sulfato, alcançando o máximo de metabolização em 72 horas para o pireno-glicosídeo e 120 horas para o pireno-sulfato.

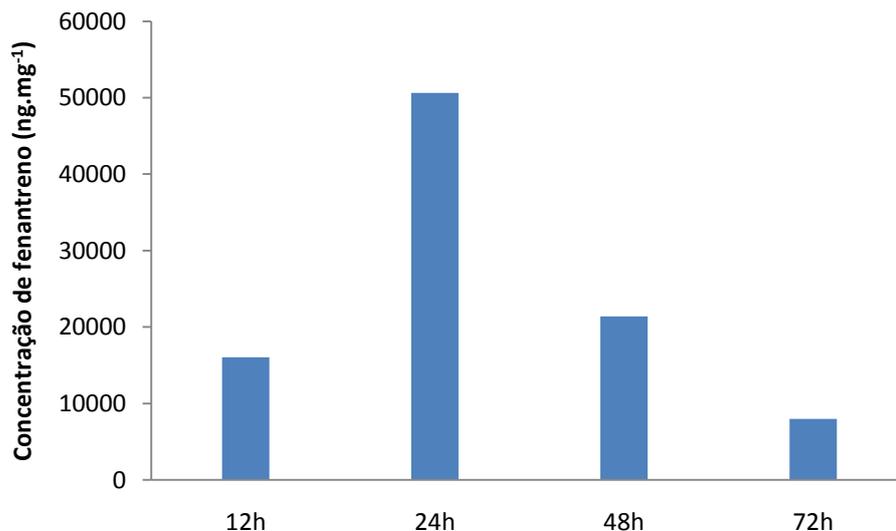


Figura 4. 2 Concentração de fenantreno no hepatopâncreas dos organismos inoculados com fenantreno após 12, 24, 48 e 72 horas da inoculação.

Não foram encontrados metabólitos de fenantreno nos organismos inoculados com óleo árabe (tabela 4.1). Porém foi observado a presença de HPA no hepatopâncreas desse grupo de organismos, principalmente para o naftaleno parental e seus homólogos alquilados e fenantreno parental e C1 fenantreno (figura 4.3 e tabela 4.2). A quantificação desses compostos não foi possível devido a perda de grande parte dos padrões deuterados desses compostos mais leves, naftaleno e fenantreno, utilizados para quantificação, pois esses extratos tiveram que passar por um processo adicional de *clean-up* por GPC devido a interferência dos lipídios na identificação dos compostos.

Tabela 4. 1 Concentrações de fenantreno e homólogos alquilados encontradas no óleo árabe e concentração inoculada nos organismos para o bioensaio

	Conc. óleo (ng.mg <sup>-1</sup> p.s.)	Conc. efetivamente inoculada (ng.mg <sup>-1</sup> de caranguejo)
FENANTRENO	4914,4	9,83
C1 FENANTRENO	8051,6	16,10
C2 FENANTRENO	4921,2	9,84
C3 FENANTRENO	1272,9	2,55
C4 FENANTRENO	259,8	0,52

Possivelmente o tempo de experimento não foi suficiente para melhor avaliar a metabolização dos compostos inoculados através do óleo, ou ainda que o caminho metabólico tenha sido diferente do esperado neste estudo. Há a necessidade da realização de experimentos mais longos e com um maior número de organismos teste para que se obtenham informações mais conclusivas sobre este metabolismo. Com a realização desses novos experimentos utilizando compostos individuais de fenantreno e alquilados e óleo poderemos avaliar comparativamente os possíveis caminhos metabólicos do fenantreno e seus alquilados individualmente ou na presença de outros HPA de fonte petrogênica (quando inoculados com óleo).

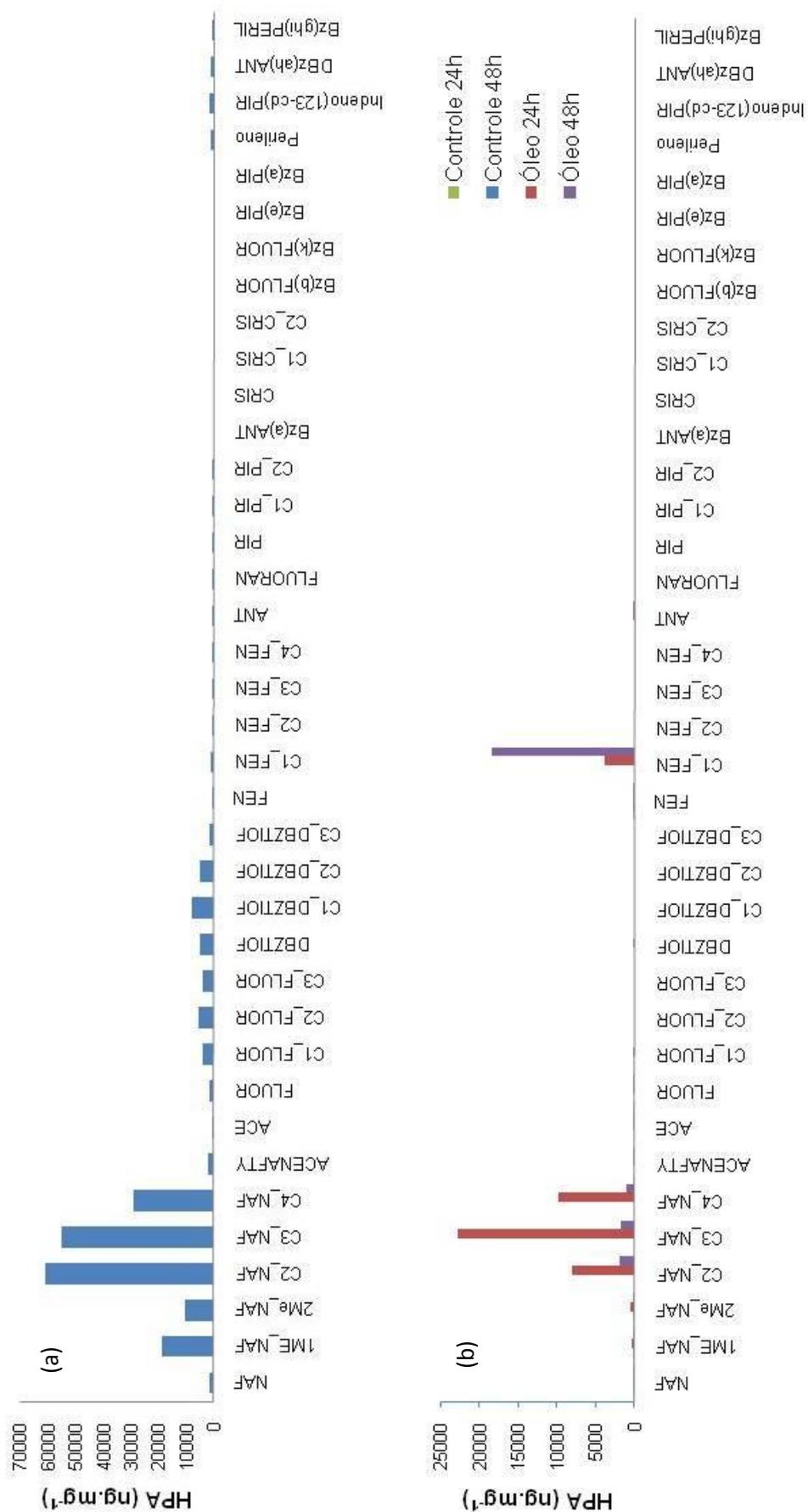


Figura 4. 3 Perfil cromatográfico dos HPA no óleo tipo Árabe (a) e nas amostras de hepatopâncreas de organismos inoculados com o óleo (b)

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.

<b>Amostra</b>	<b>16 HPA</b>	<b>Σ HPA</b>
Controle 24h	121,25	158,34
Controle 48h	65,63	123,90
Óleo 24h	590,39	46281,41
Óleo 48h	474,31	23931,58

#### **4.2. Bioensaio 2**

Após o período de depuração no laboratório, não houve sinal dos compostos de interesse nas amostras controle analisadas por CLAE/F.

Os organismos foram expostos a sedimento proveniente do manguezal de Suruí, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, e não apresentaram formação de metabólitos de fenantreno, assim como qualquer sinal de compostos que florescessem no mesmo comprimento de onda. Foi realizada determinação de HPA individuais no sedimento utilizado no experimento antes e após a exposição dos caranguejos a esta matriz (figura 4.4). Foram encontradas concentrações significativas para a série de alquilados de dibenzotiofeno, fenantreno, pireno e criseno aumentando com o aumento do número de carbonos alquílicos no sedimento inicial. Enquanto que o sedimento analisado após 96 horas de bioensaio apresentou uma redução significativa desses compostos. Portanto esses compostos podem ter sofrido assimilação pelos organismos expostos ao sedimento contaminado, apesar de as concentrações dos compostos individuais e dos somatórios dos HPA (Tabela 4.3) não terem sido suficientes para gerar respostas metabólicas em níveis detectáveis na urina desses organismos por CLAE/F. Pode também ter ocorrido, uma degradação desses compostos ao longo das 96 horas do experimento.

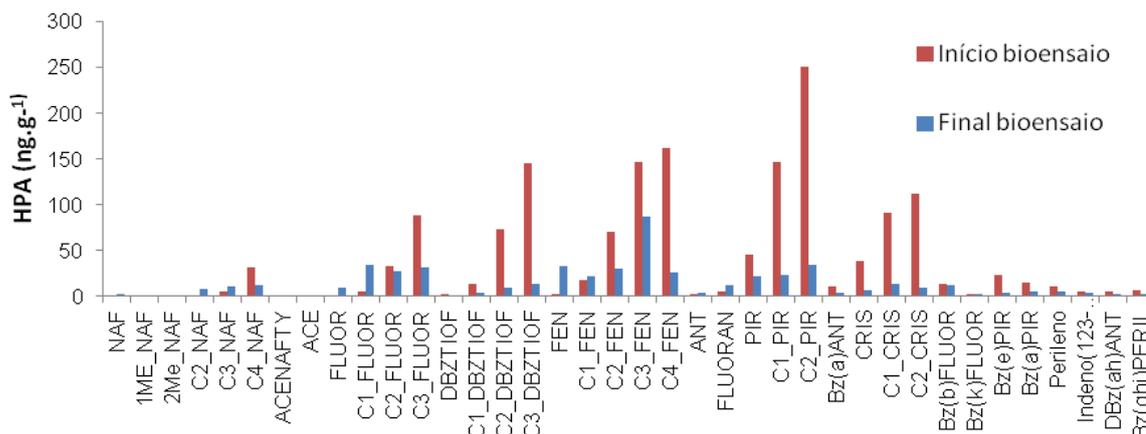


Figura 4. 4 Perfil cromatográfico dos HPA individuais no sedimento de Suruí no início e final (após 96 horas) do bioensaio II (n=5).

Tabela 4. 3 Concentrações do somatório dos 16 HPA (USEPA) e HPA totais em sedimento do bioensaio II.

	$\Sigma$ 16 HPA (mg.kg <sup>-1</sup> )	$\Sigma$ HPA totais (mg.kg <sup>-1</sup> )
Início bioensaio	154,8	1584,9
Final bioensaio	124,8	636,9

As determinações dos HPA em hepatopâncreas dos caranguejos expostos ao sedimento de suruí por 96 horas poderiam sugerir uma absorção não significativa dos HPA presentes no sedimento a que foram expostos pelos organismos durante o bioensaio (figura 4.5). Porém devido ao pequeno número amostral de organismos no experimento não foi possível a amostragem de hepatopâncreas a cada 24 horas deste experimento, o que nos impossibilita testar uma correlação dos mesmos com as concentrações no sedimento. Portanto a dinâmica desses compostos no sedimento e no hepatopâncreas dos organismos a ele exposto não pôde ser avaliada devido à falta de informações entre o início do experimento e as 96 horas que se seguem.

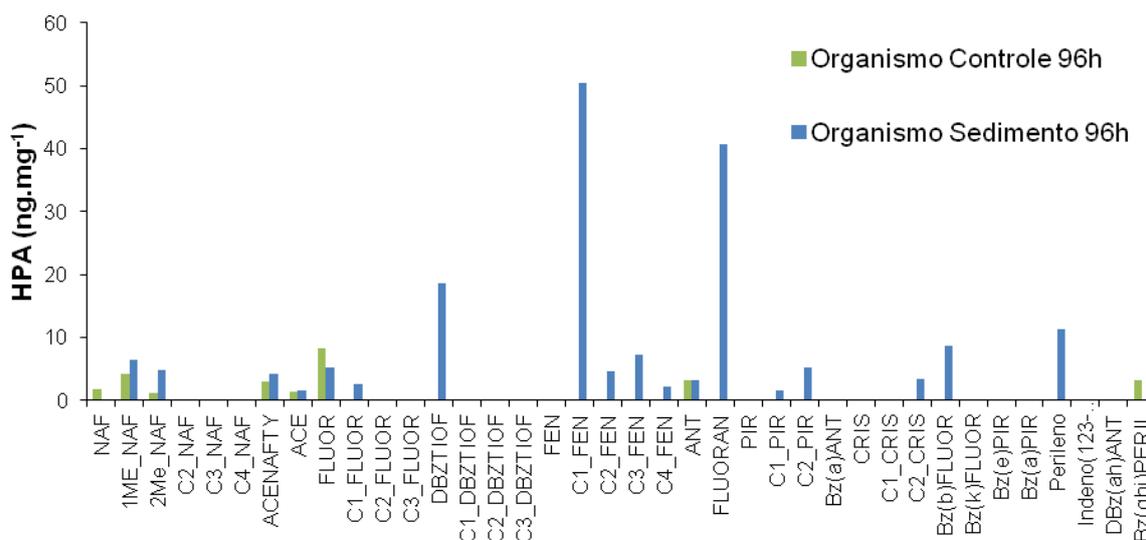


Figura 4. 5 Perfil cromatográfico dos HPA individuais no hepatopâncreas dos indivíduos após 96 horas de exposição ao sedimento de Suruí e dos organismos controle no bioensaio II.

O ensaio do micronúcleo foi testado em hemócitos dos caranguejos *Ucides cordatus* para avaliar a sensibilidade do dano genético nesses invertebrados expostos ao sedimento de matriz complexa. Não foram encontrados micronúcleos nas lâminas preparadas com hemolinfa de organismos controle. O teste apresentou alterações significativas no número de micronúcleos nos caranguejos expostos ao sedimento do manguezal de Suruí (figura 4.6). Porém não podemos afirmar que a genotoxicidade apresentada no experimento é devida a presença dos HPA no sedimento a qual os organismos foram expostos, pois, como citado anteriormente, não há uma avaliação da dinâmica desses compostos nas matrizes avaliadas (sedimento e hepatopâncreas) ao longo do experimento.

Em experimento realizado no campo e em laboratório por Morales-Caselles e colaboradores (2008) expondo crustáceos a sedimento afetado por derramamento de óleo, foi relatado maior toxicidade nos organismos transplantados do que nas exposições em laboratório. Por tanto, trabalhos utilizando matrizes complexas como as amostradas em campo podem sugerir fontes alternativas de stress que não são observadas em bioensaios controlados em laboratório, porém a realização desses ensaios em laboratório é de extrema importância para a identificação das respostas obtidas, tanto por biomarcadores

como metabólitos, fornecendo informações sobre as avaliações de riscos para os compostos de interesse.

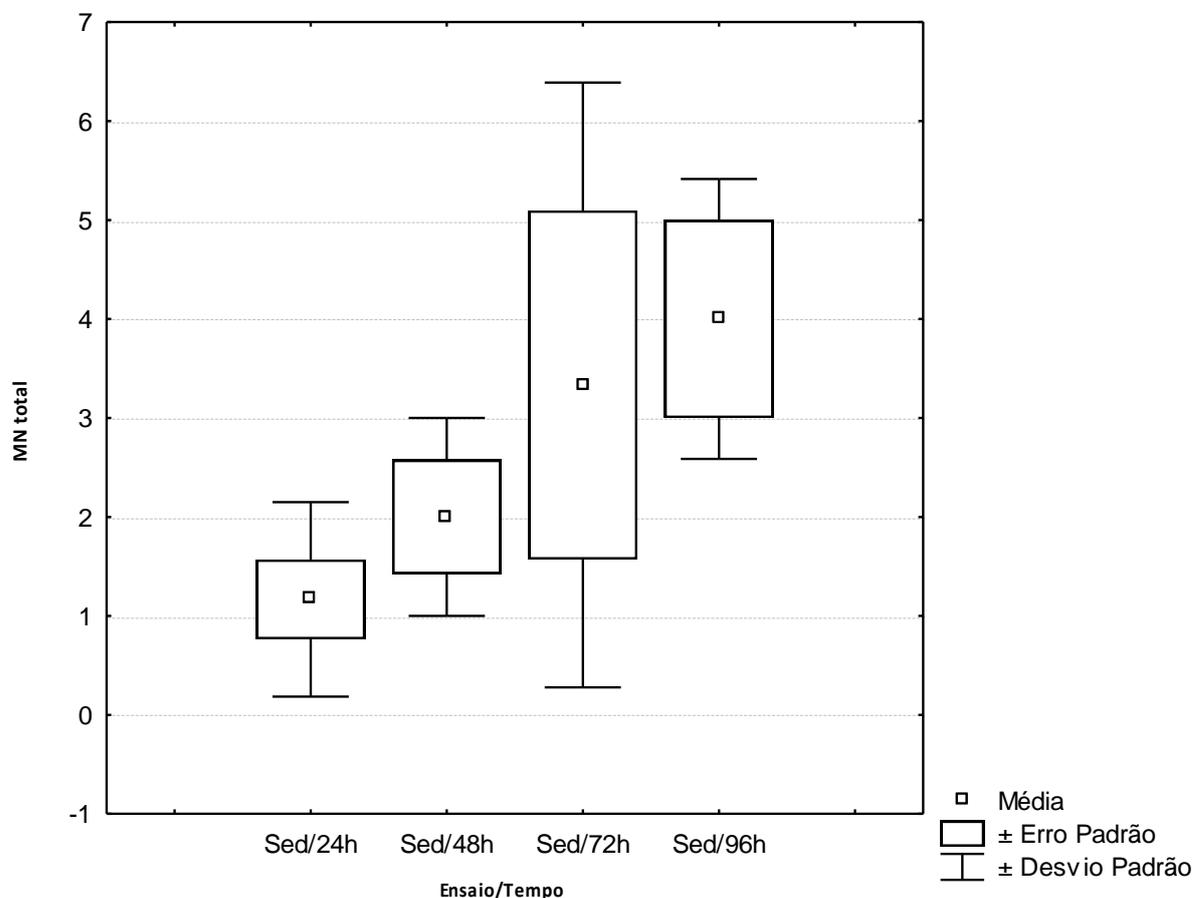


Figura 4. 6 Gráfico de freqüência de MN nos hemócitos de caranguejos expostos ao sedimento proveniente do manguezal de suruí coletados após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

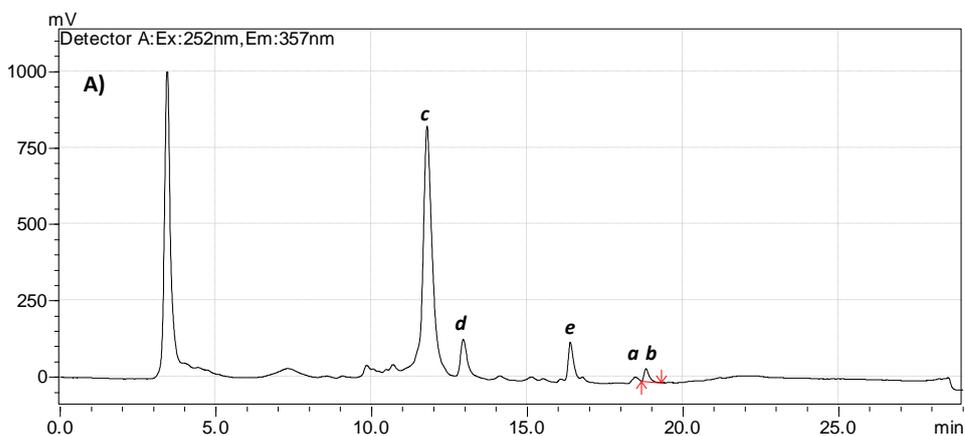
### 4.3. Bioensaio 3

No terceiro bioensaio realizado neste trabalho foi estudada a formação de metabólitos de fenantreno (Fen), 1-metil fenantreno (1-MeF) e 2,6,9-trimetil fenantreno (2,6,9-TriMeF) após a inoculação dos compostos nos organismos ( $3,0$ ;  $1,25 \cdot 10^{-5}$  e  $2,5 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectivamente).

Pôde ser observada, após 24 horas da inoculação de fenantreno ( $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), a formação de fenantrenos hidroxilados na urina dos caranguejos (figura 4.7), os

quais não foram encontrados nas amostras controle, ou seja, em organismos não inoculados com contaminante. Como pode ser observado pelas figuras 4.7 e 4.8, após a reação de hidrólise utilizando a enzima  $\beta$ -glucuronidase-arilsulfatase, houve um aumento na concentração do fenantreno hidroxilado (OHF), pico *b*, resultante da quebra de possíveis metabólitos de fenantreno conjugados representados no cromatograma A pelos picos *c*, *d* e *e*.

A reação de hidrólise realizada neste trabalho gerou um aumento de área do pico *a* (figura 4.7), o qual supõe ser outro metabólito de fenantreno de fase I, visto que comportamento semelhante foi observado por Nudi (2005) após a ação enzimática responsável pela quebra das conjugações de glicosídeos e sulfatos em moléculas de pireno. Testes realizados anteriormente, mostraram que padrões dos metabólitos 1-OHF, 2-OHF, 3-OHF e 9-OHF apresentam tempos de retenção muito próximos no sistema cromatográfico utilizado, sendo eluídos em conjunto com pouca definição durante a corrida, assim como ocorre com os picos *a* e *b* (figura 4.6). A área do pico *a* na amostra após 48 horas da inoculação com fenantreno apresentou-se 17 vezes maior após hidrólise do que na urina antes desta reação enzimática, no entanto a urina colhida após 72 horas da inoculação de fenantreno apresentou concentração baixa de OHF após a reação de hidrólise, sugerindo que o organismo possa ter excretado a maior parte do fenantreno conjugado antes das 72 horas do experimento (figura 4.7). Watson e colaboradores (2004) observaram que caranguejos expostos a concentrações de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  de pireno tinham o máximo de excreção do metabólito 1-OHP nas primeiras 48 horas de experimento, reduzindo bruscamente nos tempos seguintes do experimento.



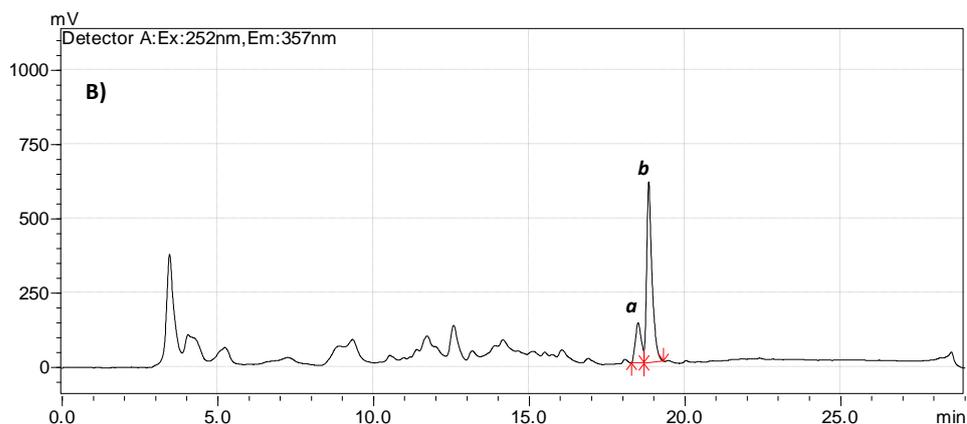


Figura 4. 7 Cromatograma por CLAE/F de amostra de urina do bioensaio III após 48 horas da inoculação de fenantreno ( $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ): (A) urina não hidrolisada e (B) urina hidrolisada com  $\beta$ -glucuronidase-arilsulfatase.

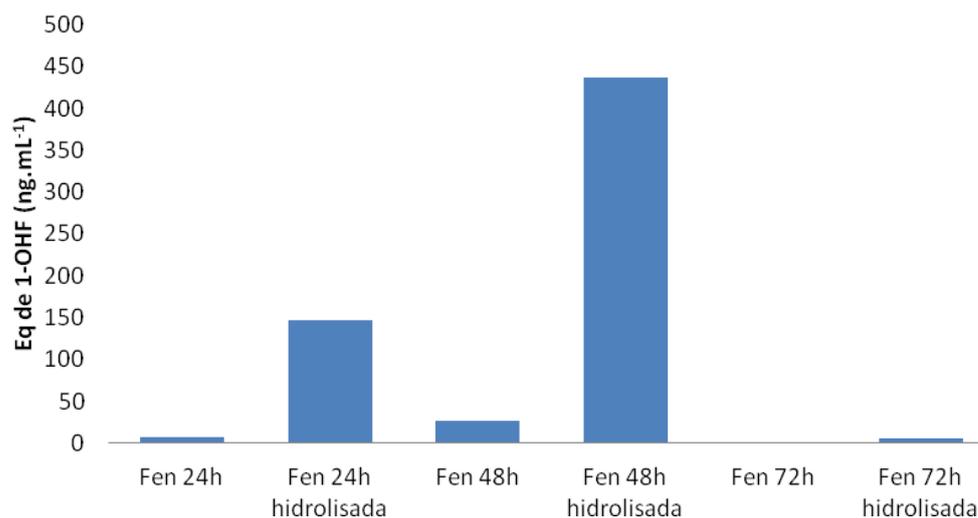


Figura 4. 8 Concentrações de OHF em equivalentes de 1-OH Fenantreno nas amostras de urina de organismos inoculados com fenantreno antes e após hidrolise enzimática com  $\beta$ -glucuronidase

A amostra de urina colhida após 72h da inoculação com fenantreno apresentou um pico (figura 4.9) no mesmo tempo de retenção do padrão de fenantreno ( $\text{TR}=24,47 \text{ min}$ ). O mesmo foi observado na amostra hidrolisada sugerindo ser este um possível produto da metabolização do fenantreno não estando sujeito a quebra pela enzima utilizada nas reações de hidrólise.

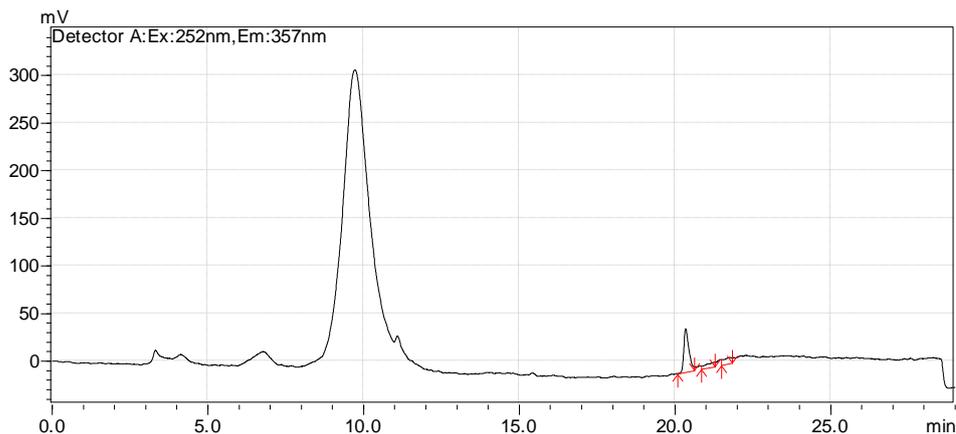


Figura 4. 9 Cromatograma amostra de urina coletada após 72h da inoculação de fenantreno por CLAE/F

Em organismos inoculados com 1-MeF e 2,6,9-TriMeF não foram observados na fluorescência a presença de OHF em concentrações superiores ao limite de quantificação nas amostras de urina, hidrolisadas ou não hidrolisadas. Porém, após a hidrólise, houve formação de novos picos não existentes nas amostras não hidrolisadas (figura 4.10), sugerindo a formação de produtos de metabolismo do fenantreno, diferentes do monohidroxi fenantreno, a partir da quebra de conjugados pela ação da enzima.

As concentrações de C1 fenantreno em amostra de hepatopâncreas dos caranguejos inoculados com 1-MeF não puderam ser determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) pela presença de grande quantidade de lipídios na amostra impossibilitando a identificação e quantificação dos picos de C1 fenantreno apesar da presença do íon de confirmação do mesmo. Já as amostras inoculadas com 2,6,9-TriMeF, apesar de terem sua detecção possível, encontravam-se abaixo do limite de quantificação determinado para as amostras neste método. Vê-se necessária a realização de novos experimentos inoculando concentrações maiores dos compostos a fim de se obter valores quantificáveis no hepatopâncreas dos organismos, que poderão auxiliar na avaliação da correlação destes com os metabólitos encontrados nas urinas.

Devido ao alto teor de lipídio (40% em média) presentes nos hepatopâncreas dos caranguejos da espécie *U. cordatus* e a interferência de hidrocarbonetos de

cadeia longa com 2 ou 3 insaturações que agiram como interferentes nas determinações de HPA por CG/EM vê-se necessária, para trabalhos futuros, etapas de *clean-up* mais minuciosas e repetitivas de forma a eliminar esses interferentes dos extratos amostrais.

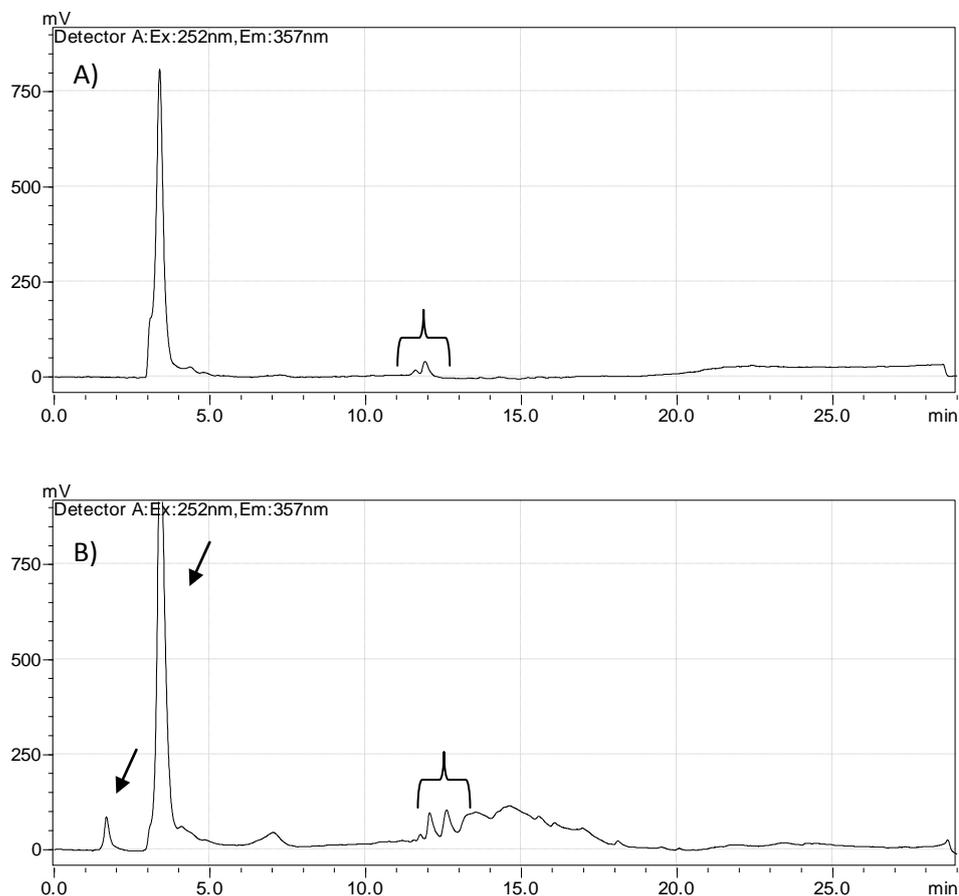


Figura 4. 10 Cromatogramas por CLAE/F de amostra de urina do bioensaio III após 48 horas da inoculação de 1-Metil fenantreno: (A) urina não hidrolizada e (B) urina hidrolizada com  $\beta$ -glucuronidase-arilsulfatase.

Foram realizadas análises qualitativas por CLAE/EM a fim de identificar os possíveis metabólitos dos compostos inoculados, assim como confirmar àqueles resultados obtidos por CLAE/F. Os metabólitos encontrados nas amostras antes e após reação de hidrólise encontram-se nas tabelas 4.4 e 4.5, respectivamente.

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.

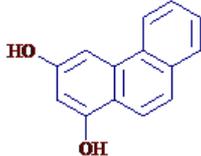
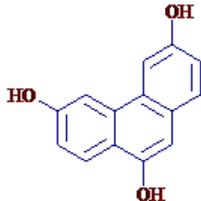
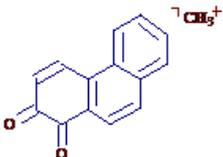
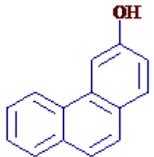
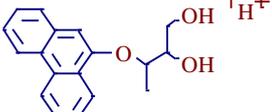
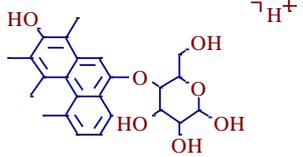
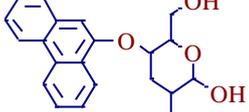
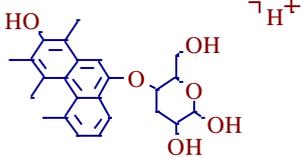
Composto	<i>m/z</i> dos íons de fragmentação	Estrutura sugerida
Fenantreno diol	211, 193, 175, 169	
Trihidroxi fenantreno	227, 213, 209, 195, 177	
Fenantreno ortoquinona	223, 209, 195, 191, 181, 177, 163	
Hidroxi fenantreno	213, 195, 177	
a	341, 340, 339, 321, 297, 265	
b	282, 283	
c	430, 429, 310, 282	
d	340, 339, 338, 320, 321	
w	413, 393, 392, 391, 293, 278	

Tabela 4. 4 (cont.). 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.

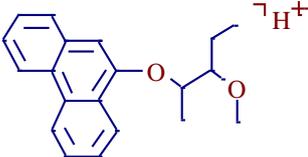
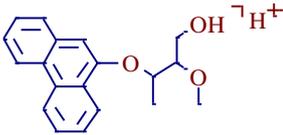
y	295, 282, 269, 263, 245, 237	
z	297, 265, 247	

Tabela 4. 5 Possíveis metabólitos encontrados nas amostras controle e inoculadas com fenantreno, 1-Metil fenantreno e 2,6,9-Trimetil fenantreno hidrolisadas, suas possíveis estruturas moleculares e massas por CLAE/EM.

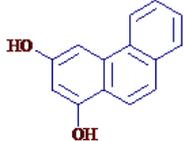
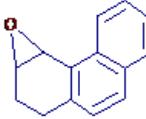
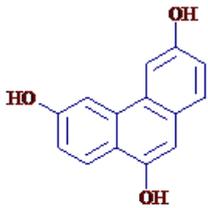
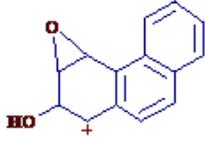
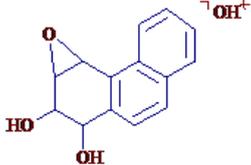
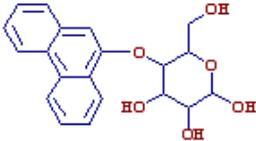
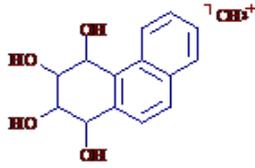
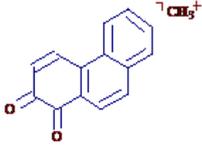
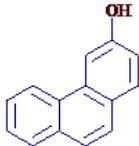
Composto	m/z dos íons de fragmentação	Estrutura sugerida
Fenantreno diol	211, 193, 175, 169	
Fenantreno epoxido	197, 179, 169	
Trihidroxi fenantreno	227, 213, 209, 195, 177	
Fenantreno monolepoxido	213, 211, 194, 183, 169, 155	
Fenantreno diolepoxido	245, 228, 227, 217, 200, 120	
Fenantreno glicosídeo	356, 339, 321, 311, 274	

Tabela 4. 5 (cont.). Possíveis metabólitos encontrados nas amostras controle e inoculadas com fenantreno, 1-Metil fenantreno e 2,6,9-Trimetil fenantreno hidrolisadas, suas possíveis estruturas moleculares e massas por CLAE/EM.

Fenantreno tetrol	261, 247, 229, 215, 211, 175	
Fenantreno ortoquinona	223, 209, 195, 191, 181, 177, 163	
Hidroxi fenantreno	213, 195, 177	

Lisowaska e colaboradores (2006) observaram a formação de fenantrol glicosídeo como produto da metabolização à exposição de fenantreno pelo fungo *Cunninghamella elegans*. A formação de compostos de fenantreno glicosidado foi observada neste trabalho pela presença de possíveis fragmentos deste composto nas amostras de urina inoculadas ou não (figuras 4.11 e 4.12). Tais fragmentos poderiam ser produtos da metabolização do fenantreno pela espécie estudada ou, mais provavelmente, terem sido formados, a partir de um fenantreno glicosidado, na câmara de ionização do equipamento. Estudos complementares, como a sintetização *in vitro* do fenantreno glicosídeo e otimização do método, serão necessários para que se possa avaliar com mais precisão a origem desses fragmentos e controlar melhor o processo de fragmentação.

Nudi (2005) mostrou que, apesar de a enzima  $\beta$ -glucuronidase-arilsulfatase não apresentar especificidade para conjugados de glicosídeo, apresenta atividade suficiente para realizar a quebra do glicosídeo, mesmo que parcial, e de outros conjugados. Nota-se necessária a realização de novas reações de hidrólise utilizando uma enzima mais específica, como a  $\beta$ -glicosidase, a fim de melhor avaliar a especificidade destas enzimas para fenantrenos conjugados, assim como obter uma melhor compreensão da metabolização e excreção desses compostos e da interferência do processo de ionização da amostra pelo sistema de CLAE/EM nas estruturas moleculares encontradas.

Estudos realizados a partir da exposição de invertebrados ao pireno mostraram a conjugação principal por grupos sulfatos, porém também apresentaram produtos de glicosídeo. As análises realizada neste trabalho por CLAE/EM a partir da inoculação de Fen, 1-MeF e 2,6,9-TriMeF em *U. cordatus* não apresentaram estruturas de fenantreno sulfato, sugerindo a glicosidação como principal rota de metabolização de conjugação, diferentemente da metabolização deste composto por fungos mostrada por Casillas e colaboradores (1996), onde a formação de conjugados de glicosídeo se dá em menor escala do que formação de conjugado de sulfato.

Os fragmentos de fenantreno glicosídeo *a*, *b*, *c*, *d* foram encontrados tanto nas amostras controle quanto na maioria das amostras inoculadas, enquanto que os picos *w*, *y*, *z* foram encontrados apenas em algumas amostras inoculadas. Foi observada a intensidade das áreas dos picos (anexos 1, 2, 3 e 4) presentes tanto nas amostras controle quanto nas inoculadas a fim de avaliar quais os metabólitos gerados a partir da inoculação dos compostos Fen, 1-MeF e 2,6,9-TriMeF. A presença de metabólitos de fenantreno nas amostras controle pode ser considerada aceitável, visto que se trata de um contaminante comumente encontrado em todos os ambientes.

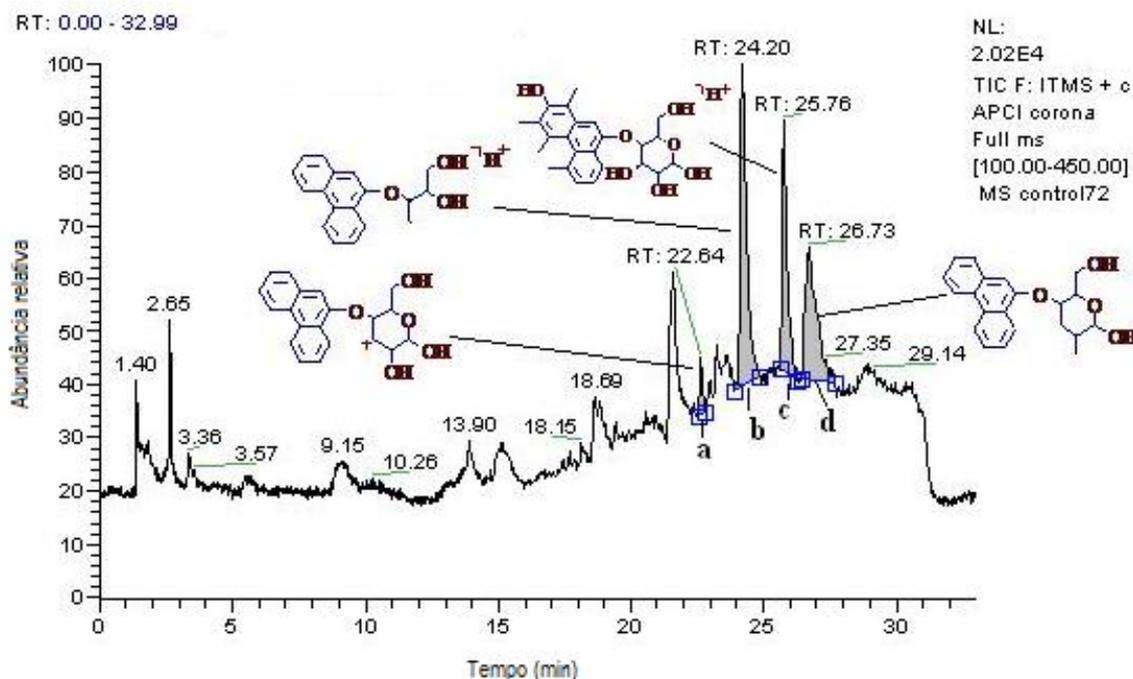


Figura 4. 11 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina controle 72h não hidrolisada

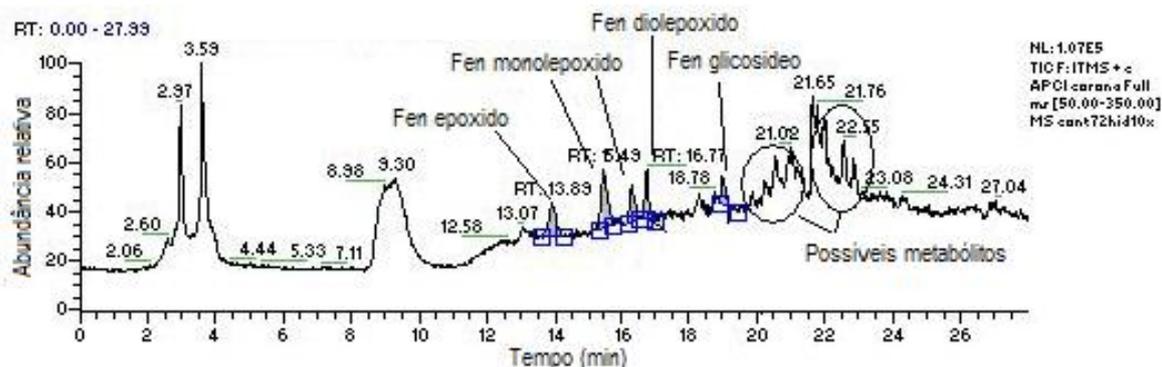


Figura 4. 12 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina controle 72h hidrolisada

As amostras de urina de organismos inoculados com fenantreno após 48 e 72 horas (figura 4.13 e 4.14) apresentaram as áreas dos fragmentos *a*, *b*, *c*, *d* de 2 a 25 vezes maiores do que àquelas encontradas nas amostras controle enquanto que a urina coletada após 24 horas da inoculação de fenantreno apresentou áreas desses compostos similares àquelas das amostras controle, o que poderia indicar que a conjugação desses compostos não deve ocorrer de forma significativa nas primeiras 24 horas do processo de metabolização deste contaminante pela espécie estudada. A partir da determinação de fenantreno no hepatopâncreas dos organismos ao longo do experimento (figura 4.14A) pode-se observar que, como já era esperada, a concentração deste composto no hepatopâncreas se dá de forma inversa à presença de conjugados de glicosídeo nas urinas (figura 4.14B), ou seja a eliminação de compostos glicosilados aumenta à medida que a concentração de fenantreno reduz no hepatopâncreas. As concentrações dos HPA individuais encontrados nos hepatopâncreas dos organismos inoculados e controle estão reportados nos anexos.

Estudo realizado por O'Connoe & Squibb (1989 *apud* Neff, 2002) caranguejos azuis mostram rápida assimilação e metabolização do fenantreno, tendo sido assimilada 70% da concentração a que foi exposto nas primeiras três horas. E a concentração máxima de fenantreno no hepatopâncreas alcançada em seis horas de exposição. Esses autores mostraram também a baixa acumulação desse composto em tecidos não hepático e acumulação de metabólitos no hepatopâncreas. A determinação desses metabólitos em hepatopâncreas de *U.*

*cordatus* em trabalho futuro será de grande importância, pois poderá nos mostrar a possível tendência de acumulação desses compostos no tecido hepático, visto que alguns desses metabólitos podem ser potencialmente tóxicos por reagirem com macromoléculas celulares para formarem adutos (Rappaport *et al*,2005).

Após a reação de hidrólise das amostras de urina inoculadas com fenantreno houve a formação de metabólitos como fenantreno epoxido, fenantreno monolepoxido e fenantreno diolepoxido, porém não houve variação significativa da área dos picos nestas amostras em relação a controle, o que nos leva acreditar que as concentrações inoculadas não foram suficientes para alterar o nível de contaminação já existente no organismo teste. A formação desses metabólitos dentro do caminho de metabolização do fenantreno é descrita em esquema proposto por Onyemauwa e colaboradores (2009) baseados em dados *in vitro* e *in vivo* disponíveis.

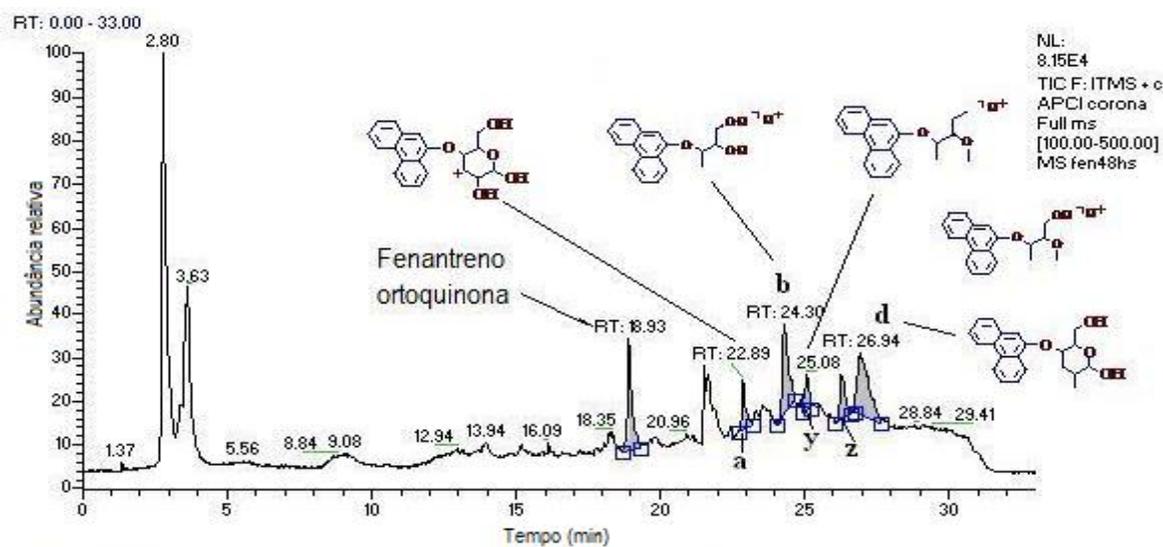


Figura 4. 13 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 48h não hidrolisada destacando os metabólitos encontrados e suas possíveis estruturas.

A amostra fenantreno 48 horas foi a única a mostrar os picos y e z (figura 4.13), apresentando também ortoquinona, metabólito reportado como um dos produtos finais da metabolização de fase 1 do fenantreno e outros HPA por humanos (Onyemauwa *et al*, 2009, Wu *et al*, 2005). Foi observado um aumento

nas áreas dos picos *b*, *c* e *d* ao longo do experimento, mostrando um máximo da conjugação do glicosídeo a partir de 72 horas da inoculação do fenantreno para a espécie estudada (figura 4.13).

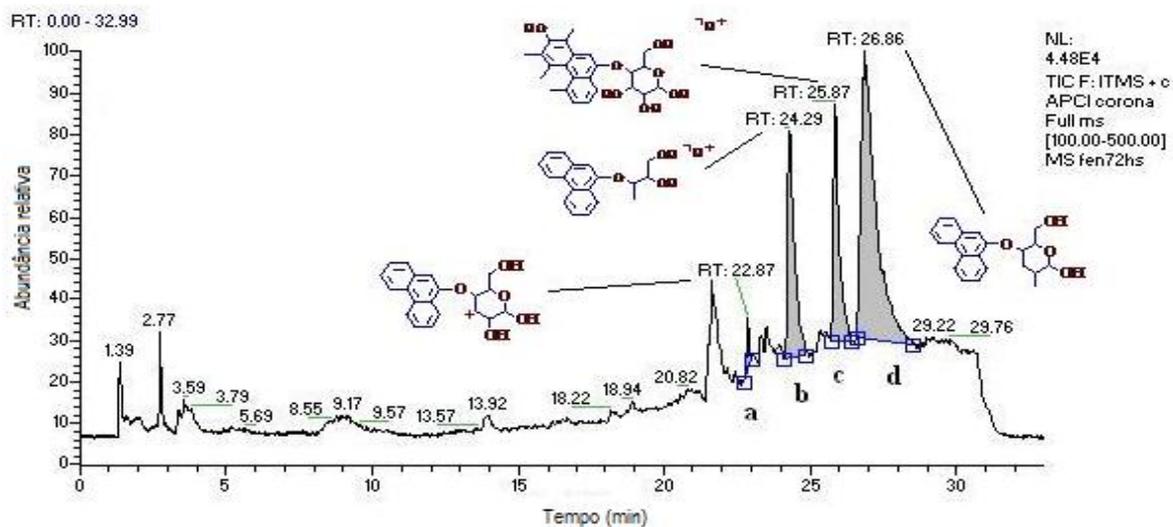


Figura 4. 14 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 72h não hidrolisada

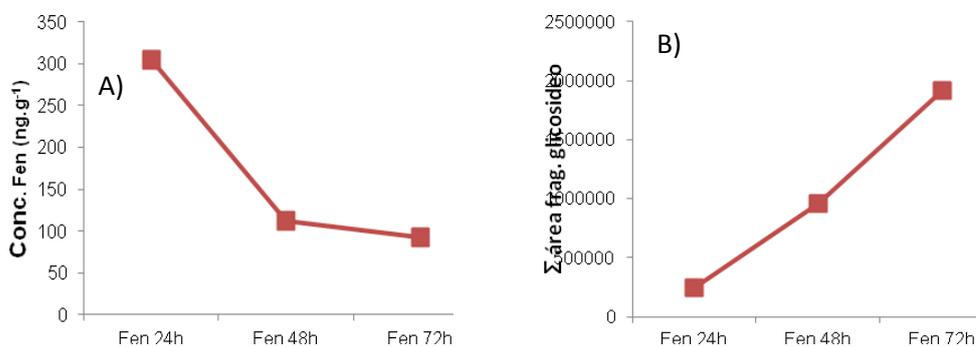


Figura 4. 15 (A) Concentração de fenantreno no hepatopâncreas e (B) somatório das áreas de fragmentos de glicosídeo ao longo do experimento nas amostras de urina não hidrolisadas dos caranguejos inoculados com fenantreno

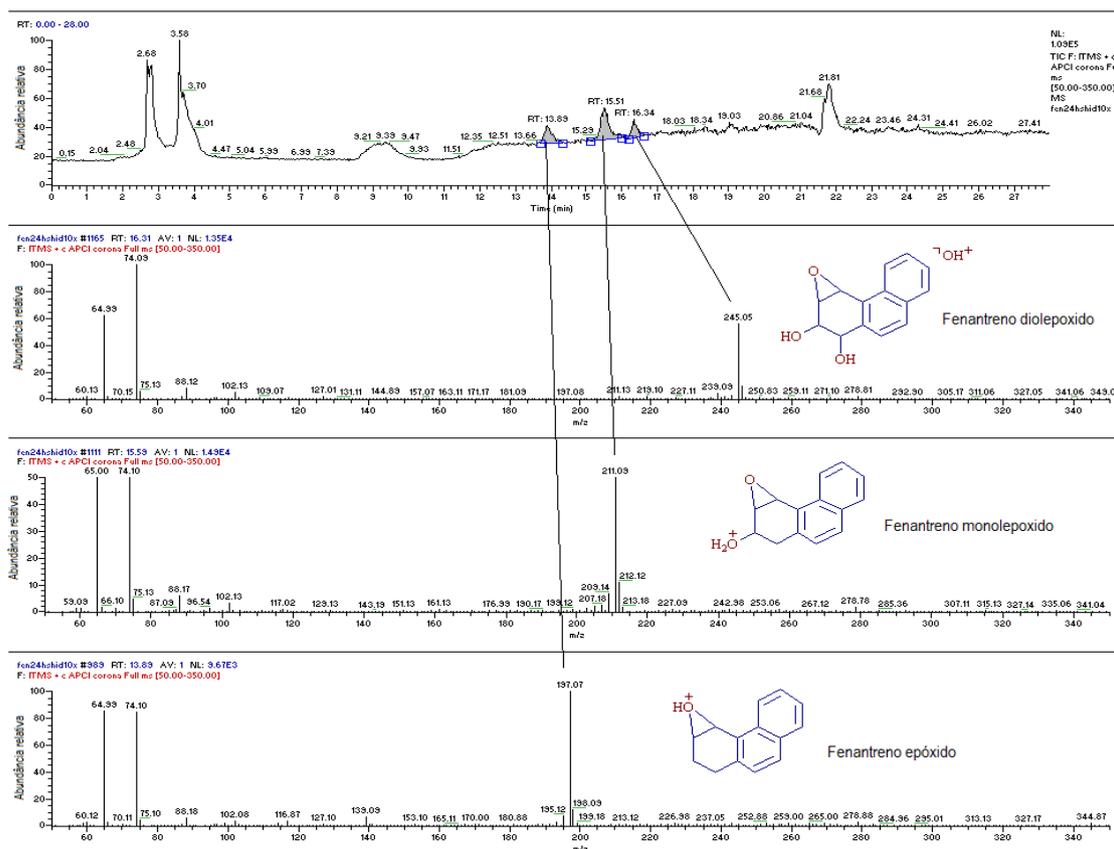


Figura 4. 16 Cromatograma obtido por CLAE/EM da amostra de urina fenantreno 24h após hidrólise destacando os metabólitos e seus espectros de massas.

As amostras de urina inoculadas com 1-MeF analisadas por CLAE/EM mostraram a presença de fragmentos de fenantreno conjugado com glicosídeo, aumentando as áreas dos seus picos ao longo do experimento, exceto para amostra de 48 horas. Apesar da amostra de 1-MeF 48h não ter apresentado os mesmos picos encontrados nas outras amostras inoculadas com esse composto, ela apresentou um único pico (*w*), possivelmente, um outro fragmento de conjugado de glicosídeo, contendo uma área cinco vezes maior do que as demais amostras de urina. Tal fato pode ser resultado de processo de degradação do conjugado de glicosídeo presente na amostra devido a reações químicas externas. As três amostras inoculadas com 1-MeF (24, 48 e 72 h) apresentaram fenantreno ortoquinona após realizada reação de hidrólise, aumentando suas áreas ao longo do experimento (figura 4.16). O mesmo composto pode ser visualizado na amostra 1-MeF 96h não hidrolisada. Tal amostra não foi analisada após a hidrólise impossibilitando avaliação da hidrólise para esta amostra. Não há registros na

bibliografia consultada da formação de conjugados a partir de ortoquinonas, portanto, este composto poderia ser formado a partir de uma reação de oxidação da uma molécula de fenantreno diol, possível produto da quebra do conjugado de glicosídeo (figura 4.17).

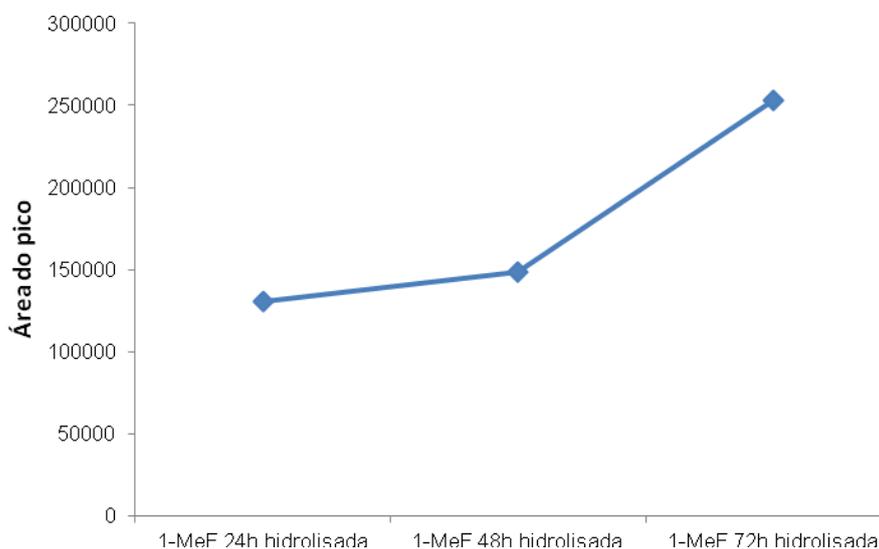


Figura 4. 17 Gráfico representando as áreas encontradas para o metabólito fenantreno ortoquinona nas amostras de 1-MeF hidrolisadas

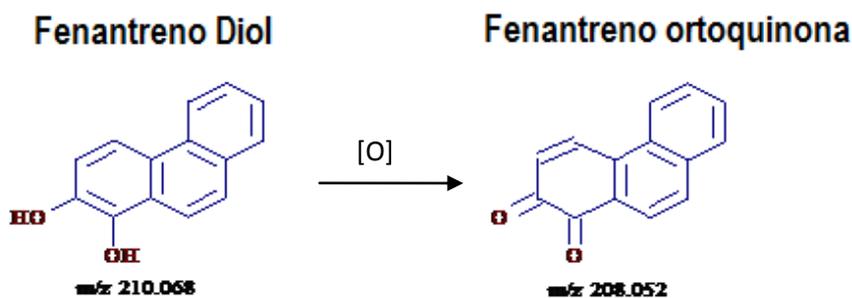


Figura 4. 18 Transformação metabólica proposta para formação de fenantreno ortoquinona

A análise das urinas hidrolisadas coletadas após 48 horas da inoculação de 1-MeF mostrou a formação de fenantreno tetrol e outro metabólito ainda não identificado (TR=21,07 min), não apresentados nas outras amostra de 1-MeF, sugerindo serem produtos da quebra do pico *w* pela reação de hidrólise. A

formação de compostos tetrol, pode se dar pela conversão de diolepidos através da ação da enzima epóxido hidroxilase (Yang *et al apud* Onyemauwa *et al*, 2009).

Avaliando as amostras de urina inoculadas com 2,6,9-TriMeF pode-se observar a presença dos compostos identificados como fragmentos de fenantreno glicosídeo, além de um pico ainda não identificado (TR=18,71 min). A urina de 2,6,9-TriMeF 48 horas também apresentou fenantreno ortoquinona co-eluído com o composto não identificado. Já a amostra 2,6,9-TriMeF 72 horas mostrou a presença de fenantrenos mono-, di- e tri-hidroxilados. Nas análises realizadas por fluorescência não foi identificada a presença de OHF nesta amostra.

Após a reação de hidrólise a amostra TriMeF 72h apresentou novamente mono-, di- e tri-hidroxi fenantreno, além de fenantreno monolepoxido e dois picos ainda não identificados (TR=14,86 e 15,05 min) presentes apenas nesta amostra hidrolisada.

Foi aplicado ensaio do micronúcleo nas amostras inoculadas do bioensaio III, porém os resultados não foram significativos devido ao pequeno número amostral (N = 2-5), gerando poucas lâminas a serem analisadas. A tabela 4.6 mostra as médias e desvio padrão do número de células micronucleadas encontradas em cada lâmina que representava um único indivíduo. Para uma melhor avaliação da possível genotoxicidade do fenantreno e seus metabólitos será necessária a execução de um bioensaio com um maior número de organismos por grupo a fim de se obter um N amostral significativo.

Tabela 4. 6 Células micronucleadas nos organismos do bioensaio 3

	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>	<b>N</b>
Controle 24h	0	0	2
Controle 72h	0	0	2
Fen 24h	0	0	5
Fen 48h	1,7	2,9	2
Fen 72h	0	0	2
1-MeF 24h	0,4	0,5	5
1-MeF 48h	0,4	0	4
1-MeF 72h	0	0	2
TriMeF 24h	0,4	0,7	4
TriMeF 48h	0	0,7	2
TriMeF 72h	0	0	2