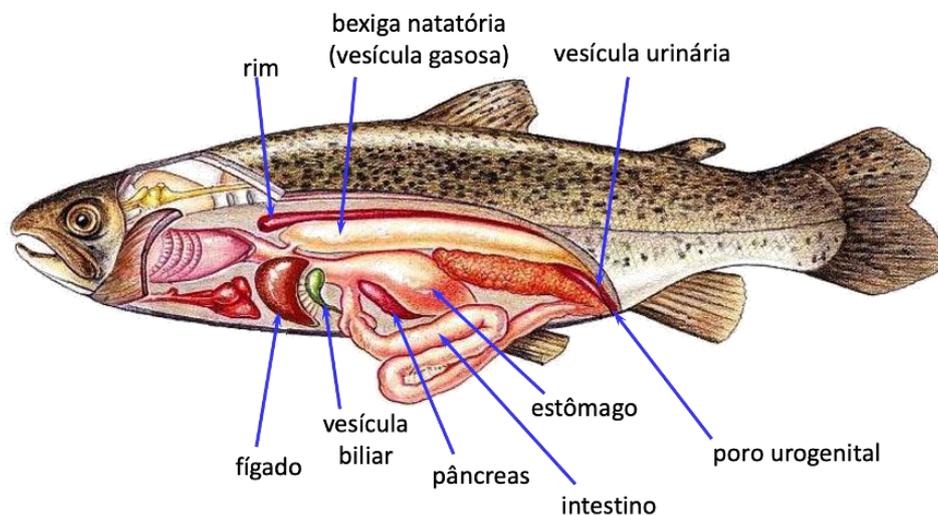


## PROTOCOLO DE OPERAÇÃO PADRÃO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE METABÓLITOS BILIARES

### Identificação e retirada de líquido biliar

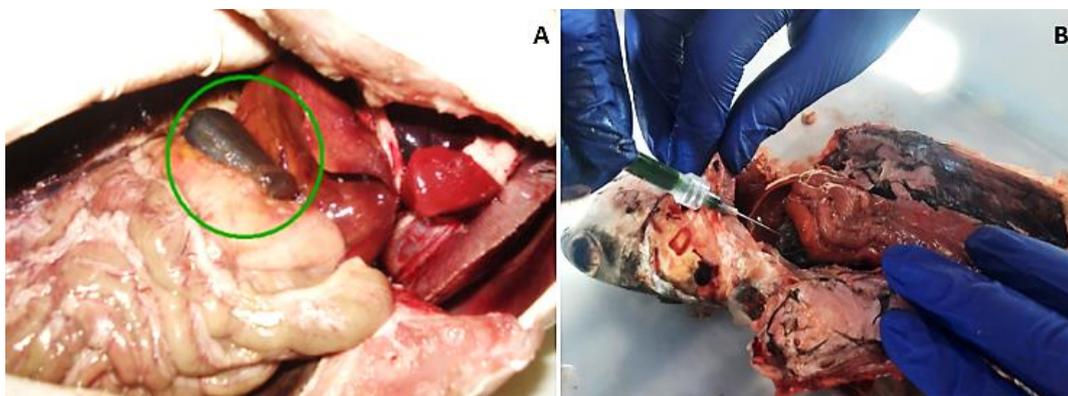
A **vesícula biliar** é um saco contrátil com parede delgada, com a **função** de armazenamento temporário da bile, localizada abaixo do lobo direito. A bile é drenada do fígado por túbulos até a vesícula biliar, que, por sua vez, se abre através de vários ductos no duodeno na região dos cecos pilóricos (Figura 1).

Figura 1 – Anatomia interna de peixes ósseos



A obtenção da amostra será realizada abrindo-se o peixe partindo do poro urogenital até a cavidade branquial (Figura 2 (A)), em seguida o líquido biliar (bile) será retirado da vesícula, por intermédio de uma seringa descartável de 3 mL (Figura 2 (B)). A amostra deverá ser armazenada em eppendorf estéril a -80° C até análise.

Figura 2 – (A) Localização da vesícula biliar e (B) retirada do líquido biliar (bile)



## **1. Materiais e reagentes**

### **1.1 Materiais**

- Tesoura
- Etiquetas
- Lápis grafite entre 2B e 6B
- Papel toalha / Papel alumínio
- Pipeta analítica de 1000, 100 e 10 $\mu$ L.
- Ponteiras de 1000, 100 e 10 $\mu$ L.
- Vials de 4 mL
- Vials de 2 mL
- Centrífuga
- Suporte universal + garra
- Agitador magnético com aquecimento
- Barras magnéticas para vials de 4 mL
- Pegador de barra magnética
- Recipiente com areia
- Termômetro
- Seringa de vidro de 1 ou 5mL
- Filtro para seringa de 0,45 $\mu$ m

### **1.2 Reagentes**

- 220  $\mu$ L de água grau HPLC
- 5 $\mu$ L de solução de  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase (30/60 U/ml)
- 750  $\mu$ L de metanol

## **2. Procedimentos experimentais**

### **2.1 Lavagem das vidrarias**

As vidrarias devem ser todas lavadas com detergente especial para lavagem de vidrarias em concentração de 3%.

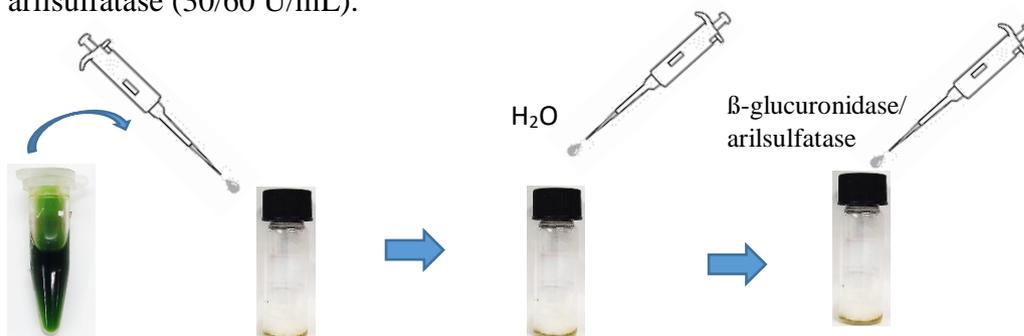
Após enxaguar, deve-se passar a solução básica de hidróxido de potássio a 10%, as vidrarias devem ser lavadas com água corrente por cerca de 10 vezes para garantir a remoção da solução básica (resquícios de solução básica na vidraria podem formar sabão em contato com a gordura de algumas amostras).

Posteriormente as vidrarias devem ser lavadas com solução de ácido acético a 10% e depois lavadas com água corrente em torno de 10 vezes. Após a remoção do ácido, lava-se as vidrarias com água destilada e coloca-se na estufa a 150°C para a secagem.

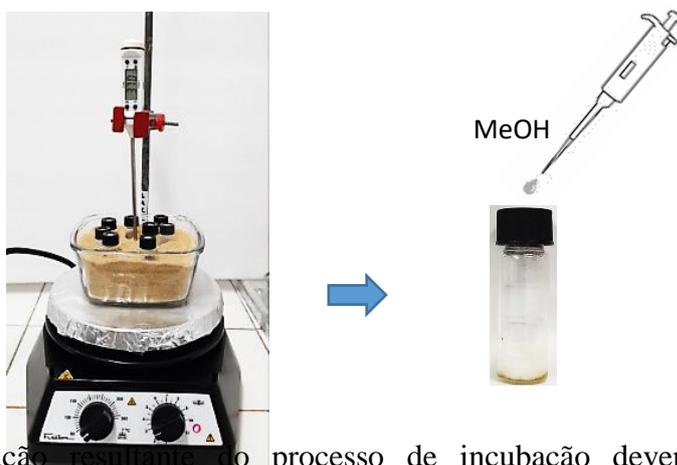
## 2.2 Hidrólise enzimática ou deconjugação enzimática

Retiradas as amostras do ultra freezer e descongelar naturalmente.

Com auxílio de uma pipeta analítica de 100 $\mu$ L, transfira 25 $\mu$ L de bile para um vial de 4mL, em seguida com auxílio de uma pipeta analítica de 1000 $\mu$ L adicione com 220 $\mu$ L de água, e com uma pipeta analítica de 10 $\mu$ L adicione 5 $\mu$ L de solução de  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase (30/60 U/mL).



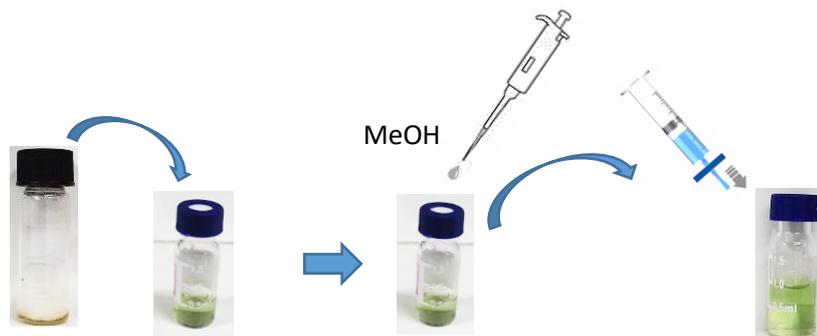
A mistura deverá ficar incubada por 2 horas a 37°C em agitador magnético aquecido, onde ocorrerá a quebra da estrutura conjugada hidrofílica dos metabólitos, formando metabólitos livres eletrofílicos. Após a conclusão do período de incubação, interromper a reação enzimática com adição de 250  $\mu$ L de metanol gelado, resultando em um fator de multiplicação de 20x.



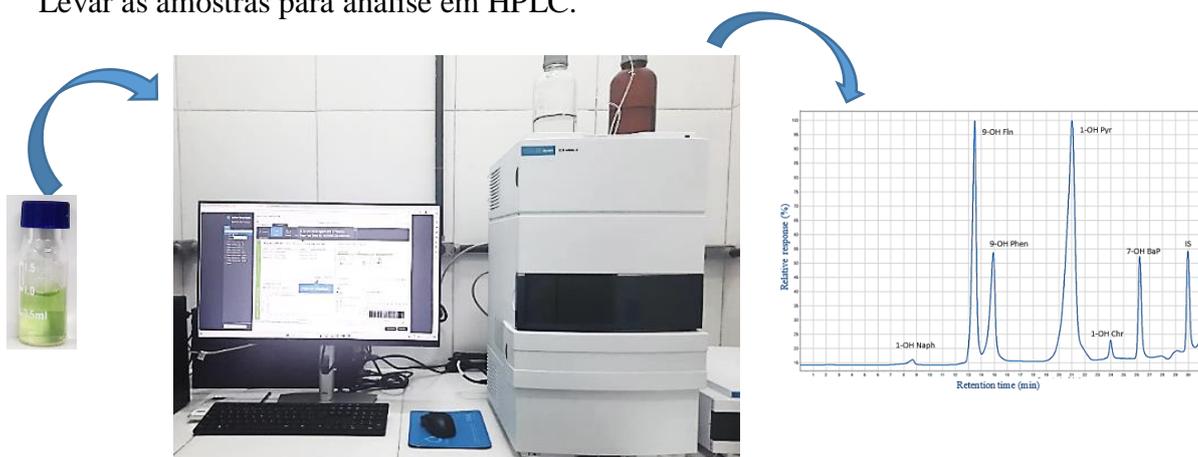
A solução resultante do processo de incubação deverá ser submetida a centrifugação por 5 minutos a 2500rpm, para separar os aglomerados de enzima do sobrenadante contendo os metabólitos livres e outros compostos hidrofílicos.



Retirar o sobrenadante contendo os metabólitos e transferir para um vial de 2mL, adicionar 500  $\mu$ L de metanol (fator de multiplicação de 40x), em seguida filtrar as amostras com auxílio de seringa e filtro específicos.



Levar as amostras para análise em HPLC.



## Referências

Krahn MM, Myers MS, Burrows DG, Malins DC (1984). Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica* 14:633–646.

Kammann, U (2007) PAH metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*) spatial distribution and seasonal changes. *Environ Sci Pollut Res* 14:102–108

Kammann et al. 2014. PAH metabolites, GST and EROD in European eel (*Anguilla anguilla*) as possible indicators for eel habitat quality in German rivers. *Environ Sci Pollut Res* 21:2519–2530 DOI 10.1007/s11356-013-2121-z