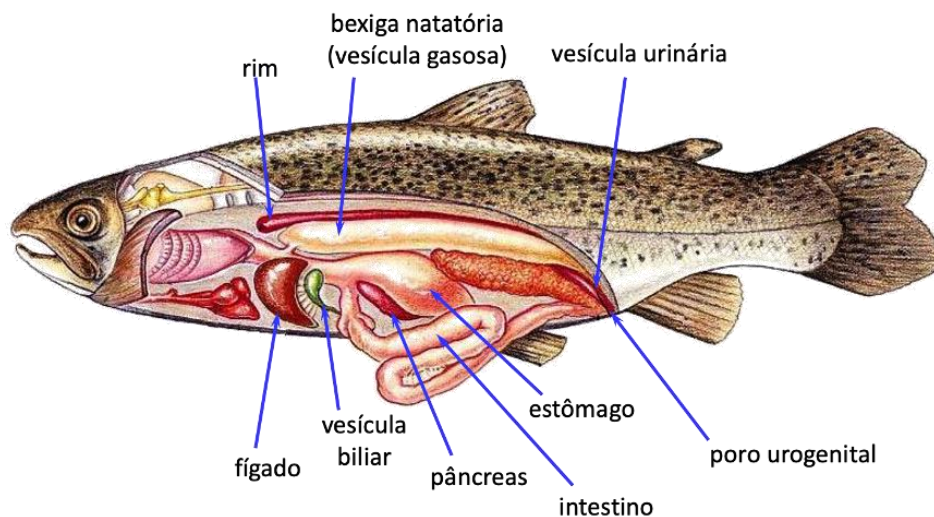


PROTOCOLO DE OPERAÇÃO PADRÃO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE METABÓLITOS BILIARES

Identificação e retirada de líquido biliar

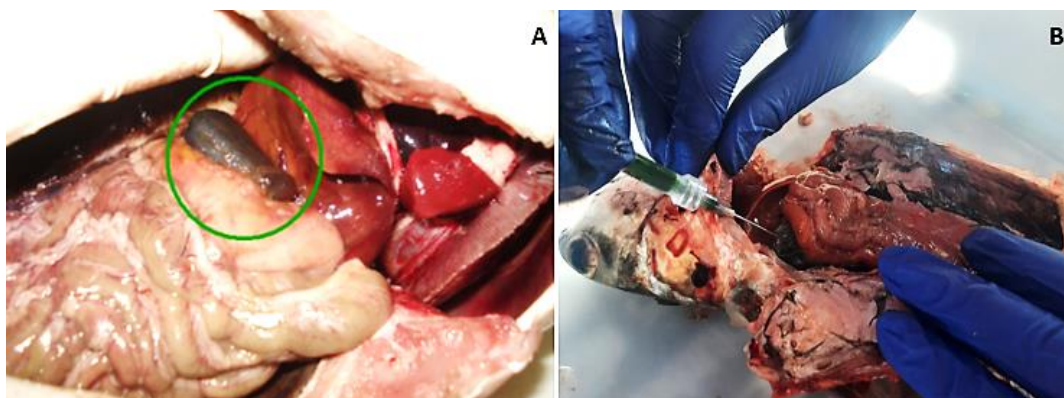
A **vesícula biliar** é um saco contrátil com parede delgada, com a **função** de armazenamento temporário da bile, localizada abaixo do lobo direito. A bile é drenada do fígado por túbulos até a vesícula biliar, que, por sua vez, se abre através de vários ductos no duodeno na região dos cecos pilóricos (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 pendendorf 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 μ L.
- Ponteiras de 1000, 100 e 10 μ 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 μ m

1.2 Reagentes

- 220 μ L de água grau HPLC
- 5 μ L de solução de β -glucuronidase/arilsulfatase (30/60 U/ml)
- 750 μ 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%.

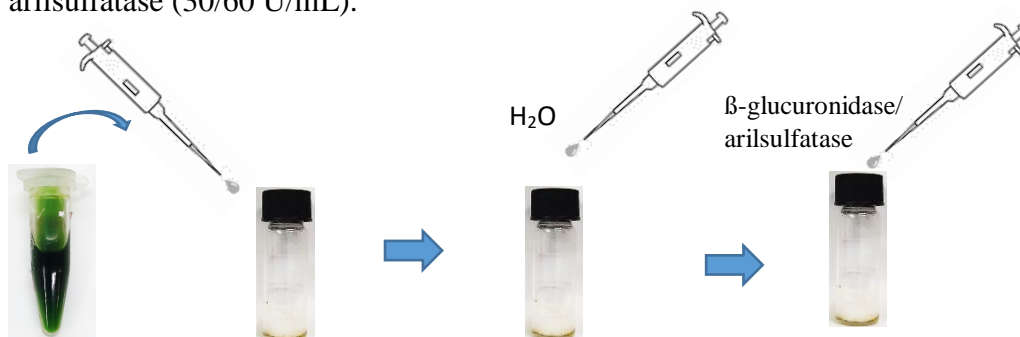
Após enxaguar, deve-se passar a solução básica de hidróxido de potássio a 10%, as vidrarias devem ser lavadas com água corrente por cerca de 10 vezes para garantir a remoção da solução básica (resquícios de solução básica na vidraria podem formar sabão em contato com a gordura de algumas amostras).

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.

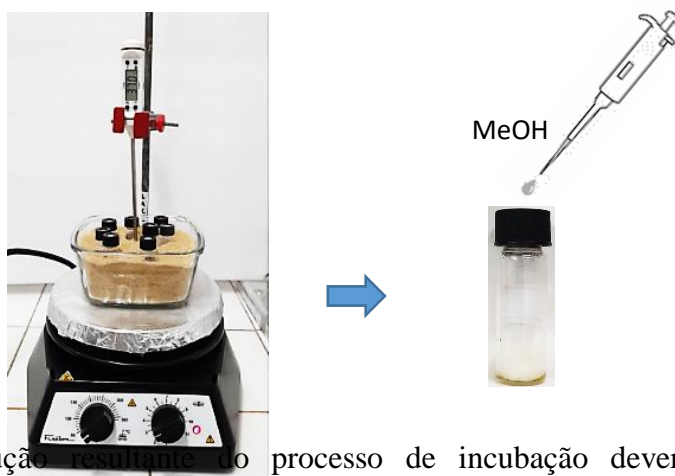
2.2 Hidrólise enzimática ou deconjugação enzimática

Retiradas as amostras do ultra freezer e descongelar naturalmente.

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



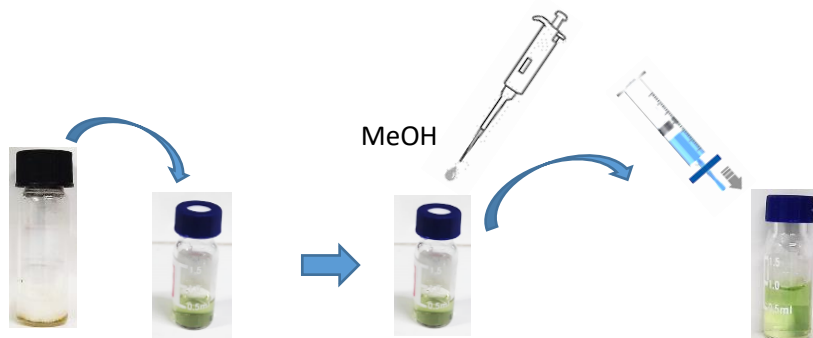
A mistura deverá ficar incubada por 2 horas a 37°C em agitador magnético aquecido, onde ocorrerá a quebra da estrutura conjugada hidrofílica dos metabólitos, formando metabólitos livres eletrofílicos. Após a conclusão do período de incubação, interromper a reação enzimática com adição de 250 μ L de metanol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



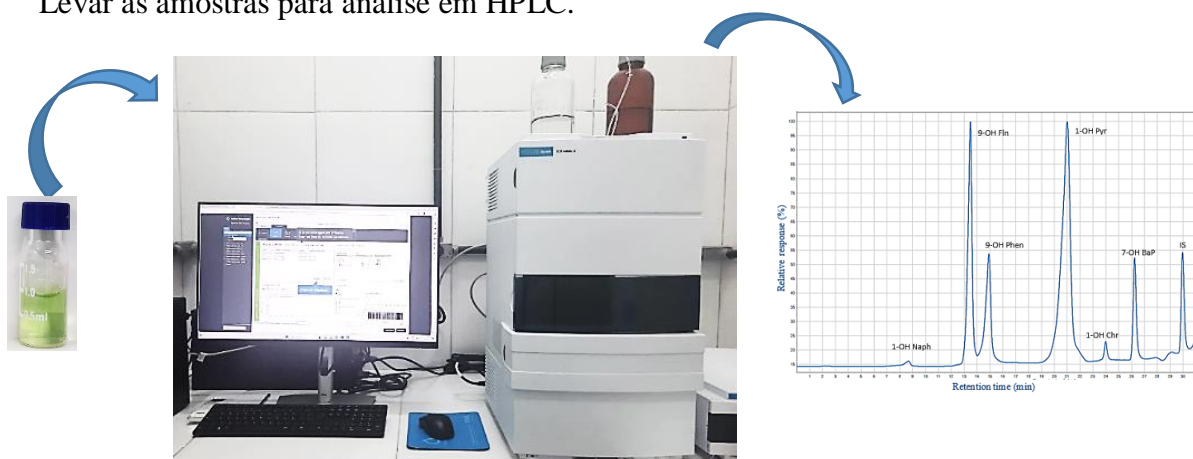
A solução resultante do processo de incubação deverá ser submetida a centrifugação por 5 minutos a 2500rpm, para separar os aglomerados de enzima do sobrenadante contendo os metabólitos livres e outros compostos hidrofílicos.



Retirar o sobrenadante contendo os metabólitos e transferir para um vial de 2mL, adicionar 500 µL 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