

# **UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE ENGENHARIA E DE RECURSOS NATURAIS

## **Sub-produtos de desinfecção da água: síntese e caracterização espectroscópica, implementação de metodologias analíticas e estudo da actividade genotóxica**

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOLÓGICA

**Marlene da Conceição Calça Rebola**

Faro

2008

# UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA E DE RECURSOS NATURAIS

## **Sub-produtos de desinfeção da água: síntese e caracterização espectroscópica, implementação de metodologias analíticas e estudo da actividade genotóxica**

Dissertação para a obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biológica

Dissertação orientada por:

Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Cardoso

Dr.<sup>a</sup> Alexandra Antunes

Dr.<sup>a</sup> Maria João Silva

Dr.<sup>a</sup> Maria Graça Miguel

Júri:

Dr.<sup>a</sup> Ana Rosa

Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Cardoso

Dr.<sup>a</sup> Alexandra Antunes

Dr.<sup>a</sup> Maria João Silva

Dr.<sup>a</sup> Maria Graça Miguel

**Marlene da Conceição Calça Rebola**

Faro

2008



À minha família

Ao Pedro



## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia Cardoso, Dr.<sup>a</sup> Alexandra Antunes, Dr.<sup>a</sup> Maria João Silva e Dr.<sup>a</sup> Maria Graça Miguel pela excelente orientação científica e os conhecimentos que me transmitiram. A todas um agradecimento especial, pelo apoio e disponibilidade demonstrados ao longo deste estágio.

Deixo o meu apreço, a todos os colegas e colaboradores com quem tive o prazer de trabalhar, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pelo auxílio prestado a nível de laboratorial.

Agradeço à minha família, nomeadamente aos meus pais e irmãs, pelo apoio e incentivo constante, mas principalmente por terem estado sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Ao Pedro pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos agradeço a permanente troca de experiências de aprendizagem.



## Resumo

Desenvolveu-se um método sintético para a preparação de um padrão clorado do benzo[a]pireno, num sistema bifásico (água e *n*-hexano) utilizando como agente de cloração NaOCl na presença de um catalisador de transferência de fase em meio ácido, com um rendimento de 96%. Paralelamente, recorreu-se a um método que envolveu a utilização de CuCl<sub>2</sub> em CCl<sub>4</sub>, permitindo isolar o produto com um rendimento de 82%. Ambos os métodos conduziram à formação do 6-Cl-BaP, caracterizado por espectrometria de massa, espectroscopia de UV e fluorescência e <sup>1</sup>H-NMR, tendo-se recorrido a espectros de correlação homonuclear de próton (COSY) para a atribuição de sinais. Aos compostos, benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno, aplicaram-se os mesmos métodos de síntese, mas não foi possível preparar nenhum derivado clorado, possivelmente devido à elevada estabilidade química destes compostos.

A estabilidade do 6-Cl-BaP em solução estudada a 37°C por RLC e <sup>1</sup>H-NMR, parecem indicar a presença momentânea de uma nova espécie química que poderá resultar de alterações conformacionais ou electrónicas.

Aplicou-se a metodologia SPE-RLC-FLD para quantificar o composto 6-Cl-BaP em soluções aquosas. A validação da metodologia foi efectuada através do estudo da linearidade das curvas de calibração, determinação da percentagem de recuperação, e limites de detecção e de quantificação. A percentagem de recuperação da técnica SPE foi de 84,4% e o CV (%) de 12,3%. O LDM calculado foi 0,003µg/L e o LQM foi de 0,0097 µg/L.

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos do 6-Cl-BaP e BaP foram avaliados em células HepG2 através do teste do vermelho neutro e do ensaio do cometa em condições alcalinas, respectivamente. O ensaio do cometa permitiu identificar lesões no DNA provocadas pelo 6-Cl-BaP para as concentrações 100 e 125 µM. Comparações entre concentrações equimolares dos dois agentes permitem verificar que o derivado clorado apresenta maior efeito genotóxico que o HAP não substituído, para 100 e 125 µM.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; água; sub-produtos de cloração; síntese; genotoxicidade; metodologias analíticas



# **Disinfection by-products of water: synthesis and spectroscopic characterization, implementation of methodologies and genotoxicity characterization**

## **Abstract**

It was developed a new synthetic method for preparation of chlorinated derivatives of benzo[a]pyrene, a biphasic system (water and *n*-hexane) as an agent of chlorination using sodium hypochlorite in the presence of a phase transfer catalyst in acidic medium with a yield of 96%. In parallel, using methods already described in the literature, which involves the use of copper dichloride in carbon tetrachloride allowing to isolate 6-Cl-BaP with an yield of 82%. Both methods led to the formation of the 6-Cl-BaP which was characterized by mass spectrometry, UV spectroscopy and fluorescence and nuclear magnetic resonance. The assignment of all signals was based on correlations observed in the COSY spectrum.

The stability of 6-Cl-BaP in aqueous solutions was studied at 37°C for RLC, GC / MS and <sup>1</sup>H-NMR. The results obtained by RLC and <sup>1</sup>H-NMR seem to indicate the possible presence of a new chemical specie, although momentary.

It was applied the methodology SPE-RLC-FLD in order to quantify the compound 6-Cl-BaP in aqueous solutions. The validation of the methodology was conducted by the study of the calibration curves linearity. The percentage of recovery and limits of detection and quantification was determinate. The recovery percentage of the solid phase extraction was 84.4% and CV (%) of 12.3%. The detection limit of the method calculated was 0,003µg/L and the limit of quantification was 0,0097µg/L.

The cytotoxic and genotoxic effects of 6-Cl-BaP and BaP were evaluated in HepG2 cells through the test of neutral red and the comet assay under alkaline conditions, respectively. The comet assay identified lesions in DNA caused by 6-Cl-BaP from concentrations greater than or equal to 100µM. Comparisons between equimolar concentrations of both agents show that the chlorinated derivative has more genotoxic effects that the unsubstitute PAH.

**Keywords:** Drinking water, Polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorination by-products, preparation, analytical methodologies, genotoxicity



## Lista de abreviaturas e simbologias

<b>[M<sup>+</sup>]</b>	Ião molecular
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Ressonância magnética nuclear de próton
<b>6-Cl-BaP</b>	6-cloro-benzo[a]pireno
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATSDR</b>	Agency for Toxic Substances and Diseases Registry
<b>BaP</b>	Benzo[a]pireno
<b>BbF</b>	Benzo[b]fluoranteno
<b>BghiP</b>	Benzo[ghi]perileno
<b>BkF</b>	Benzo[k]fluoranteno
<b>Cl-HAPs</b>	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados
<b>COSY</b>	Espectro de correlação homonuclear
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>d</b>	Dupleto
<b>DI</b>	Diâmetro Interno
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ER</b>	Receptor endócrino
<b>ETAs</b>	Estações de Tratamento de Águas
<b>FEmS</b>	Espectro de fluorescência de emissão
<b>FexS</b>	Espectro de excitação por fluorescência
<b>FLD</b>	Detector de fluorescência
<b>GC/MS (EI)</b>	Cromatografia gasosa/Espectroscopia de massa por impacto electrónico
<b>GC-FID</b>	Cromatografia gasosa com detector fotoionizante

<b>HAPs</b>	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
<b>IARC</b>	Agência internacional de investigação em cancro
<b>IcdP</b>	Indeno[1,2,3-cd]pireno
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>LLE</b>	Extracção líquido-líquido
<b>LPME</b>	Microextracção em fase líquida
<b>m</b>	Multipeto
<b>m/z</b>	Razão massa carga (espectrometria de massa)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>RLC-FLD</b>	Cromatografia líquida de fase reversa com detector de fluorescência
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RP</b>	Fase reversa
<b>SPCAL</b>	Solução padrão de calibração
<b>SPE</b>	Extracção da fase sólida
<b>SPME</b>	Microextracção em fase sólida
<b>TLC</b>	Cromatografia de camada fina
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>US EPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>δ</b>	Desvio químico
<b>λ</b>	Comprimento de onda

# Índice de Tabelas

Tabela 1.1. - Propriedades químicas de HAP referidos pela OMS (1998) <sup>1</sup> .....	3
Tabela 2.1. - Concentrações de 6-Cl-BaP utilizadas para elaboração da curva de calibração. ....	21
Tabela 3.1. - Áreas de integração do 6-Cl-BaP ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm). .	33
Tabela 3.2. - Áreas de integração do 6- Cl-BaP ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm).	33
Tabela 3.3. - Áreas de integração dos picos obtidos para as soluções de 6-Cl-BaP, nos pontos extremos da curva de calibração, 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm) (n=9). ....	34
Tabela 3.4. - Áreas de integração dos picos obtidos para as soluções de 6-Cl-BaP, nos pontos extremos da curva de calibração, 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm) (n=11). ....	34
Tabela 3.5. - Tratamento estatístico do teste F para os pontos extremos da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm).....	34
Tabela 3.6. - Tratamento estatístico do teste F para os pontos extremos da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm). ....	34
Tabela 3.7. - Dados de estatística de regressão de primeira ordem dos 10 pontos experimentais analisados a 420 nm. ....	36
Tabela 3.8. - Dados de estatística de regressão de primeira ordem dos 10 pontos experimentais analisados a 440 nm. ....	36
Tabela 3.9. - Dados da estatística de regressão de segunda ordem dos 10 pontos analisados a 420 nm.....	36
Tabela 3.10. - Dados da estatística de regressão de segunda ordem dos 10 pontos analisados a 440 nm.....	36
Tabela 3.11. - Tratamento estatístico do estudo de linearidade para ambos os comprimentos de onda.....	36

Tabela 3.12. - Estudo da sensibilidade do método e critérios de aceitação da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm).....	37
Tabela 3.13. - Estudo da sensibilidade do método e critérios de aceitação da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm).....	37
Tabela 3.14. - Cálculo da percentagem de recuperação média do método (% $R_m$ ) e coeficiente de variação (CV).....	38
Tabela 3.15. - Limite de detecção (LDM) e quantificação (LQM) da metodologia SPE-RLC-FLD.....	39
Tabela 3.16. - Cálculo da percentagem de erro e coeficiente de variação para testar o limite de quantificação.....	40
Tabela 3.17. - Limite de detecção e quantificação do método (LDM e LQM), obtidos pela recta de calibração.....	40
Tabela 3.18. - Resultados do ensaio do cometa (valor médio da percentagem de DNA na cauda) e da análise estatística dos dados (teste $t$ de Student). ....	44
Tabela 3.19. - Resultados do ensaio do cometa: valor médio do comprimento da cauda ( $\mu\text{m}$ ) após tratamento de células HepG2 com doses equimolares de 6-Cl-BaP (13) e BaP (3).....	48

# Índice de Figuras

Figura 1.1. - Estrutura do BbF (1), BkF (2), BaP (3), BghiP (4) e IcdP (5).....	2
Figura 1.2. - Representação esquemática da activação metabólica do BaP (3). ....	6
Figura 3.1. - Estrutura do 6-Cl-BaP .....	23
Figura 3.2. - Espectro <sup>1</sup> H-NMR do BaP e 6-Cl-BaP.....	29
Figura 3.3. - Estudo da estabilidade térmica do 6-Cl-BaP a 18°C ao longo de 8 horas, por RLC-FLD ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$ nm ; $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm). ....	30
Figura 3.4. - Estudo da estabilidade térmica do 6-Cl-BaP, em acetonitrilo, a 37°C ao longo de 4 horas, por RLC-FLD ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$ nm ; $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm). ....	31
Figura 3.5. - Estudo da estabilidade térmica do 6-Cl-BaP, em acetato de etilo, a 37°C ao longo de 4 horas, por GC/MS. ....	31
Figura 3.6. - Curva de calibração linear e respectiva linha de tendência ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm).....	35
Figura 3.7. - Curva de calibração linear e respectiva linha de tendência ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm).....	35
Figura 3.8. - Viabilidade celular expressa como valor médio ( $\pm$ desvio padrão) em função das concentrações de BaP e 6-Cl-BaP testadas, relativamente à viabilidade celular determinada para os respectivos controlos negativos. ....	42
Figura 3.9. - Percentagem de DNA na cauda obtida após tratamento de células HepG2 com BaP (3) e 6-Cl-BaP (13).....	45
Figura 3.10. - Proporção de cometas em cada classe de frequências para o BaP (3). ....	46
Figura 3.11. - Proporção de cometas em cada classe de frequências para o 6-Cl-BaP (13). ....	46
Figura 3.12. - Comprimento da cauda dos cometas obtidos (valores médios de três experiências independentes) após tratamento com concentrações equimolares de BaP (3) e 6-Cl-BaP (13). ....	49



# Índice de conteúdos

1. Introdução.....	1
1.1.Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos .....	1
1.1.1.Considerações gerais .....	1
1.1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos estudados no projecto.....	4
1.1.2.1.Benzo(a)pireno .....	4
1.1.2.2.Benzo(b)fluoranteno .....	7
1.1.2.3.Benzo(k)fluoranteno .....	7
1.1.3. Metodologias de quantificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos .....	8
1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados .....	9
1.3.Metodologias de avaliação de efeitos citotóxicos e genotóxicos .....	12
1.4. Objectivos.....	13
2. Procedimento experimental .....	15
2.1. Reagentes e solventes.....	15
2.2.1.Ressonância magnética nuclear de protão.....	16
2.2.2.Espectrometria de massa .....	16
2.2.3.Cromatografia.....	17
2.2.3.1. Cromatografia de camada fina (TLC) .....	17
2.2.3.2.Cromatografia líquida de fase reversa (RLC).....	17
2.2.4. Extração em fase sólida .....	18
2.3. Preparação e caracterização de padrões de Cl-HAPs .....	18
2.3.1.Método geral A .....	18
2.3.1.1. Reacção com o benzo[a]pireno.....	18
2.3.1.2. Reacção com o benzo[b]fluoranteno.....	19
2.3.1.2. Reacção com o benzo[k]fluoranteno.....	19

2.3.2. Método geral B .....	19
2.3.2.1. Reacção com o benzo[a]pireno.....	19
2.3.2.2. Reacção com o benzo[b]fluoranteno.....	19
2.3.2.3. Reacção com o benzo[k]fluoranteno.....	20
2.4. Ensaio de estabilidade térmica .....	20
2.4.1. Estabilidade do 6-cloro-benzo[a]pireno por <sup>1</sup> H-NMR.....	20
2.4.2. Estabilidade do 6-Cl-BaP por GC/MS.....	20
2.4.3. Estabilidade do 6-Cl-BaP por RLC-FLD.....	20
2.5. Validação da metodologia SPE-RLC-FLD.....	21
2.5.1. Estudo da linearidade das curvas de calibração (SPE-RLC-FLD).....	21
2.5.1.1. Injecção de soluções de calibração SPCAL1 a SPCAL 10.....	21
2.5.1.2. Estudo da gama de trabalho.....	22
2.5.2. Determinação da percentagem de recuperação, limite de detecção e de quantificação .....	22
2.5.2.1. Procedimento geral .....	22
2.5.2.2. Determinação da percentagem de recuperação.....	22
2.5.2.3. Determinação do limite de detecção .....	23
2.5.2.4. Determinação do limite de quantificação .....	23
2.6. Caracterização da potencial actividade genotóxica de Cl-HAPs.....	23
2.6.1. Linha celular .....	23
2.6.2. Manutenção celular .....	23
2.6.3. Exposição das células ao 6-cloro-benzo[a]pireno e ao benzo[a]pireno ....	24
2.6.4. Avaliação de viabilidade celular pelo azul tripano .....	24
2.6.5. Avaliação de citotoxicidade pelo vermelho neutro.....	25
2.6.6. Ensaio do cometa em condições alcalinas.....	25
3. Resultados e discussão .....	27
3.1. Preparação e caracterização de padrões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados.....	27

3.1.1. Preparação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados .....	27
3.1.2. Caracterização do 6-cloro-benzo[a]pireno e estudos de estabilidade .....	29
3.2. Validação da metodologia SPE-RLC-FLD para quantificação do 6-cloro-benzo[a]pireno em águas destinadas ao consumo humano .....	32
3.2.1. Estudo da linearidade .....	32
3.2.2. Determinação das percentagens de recuperação, limite de detecção e de quantificação da metodologia SPE-RLC-FLD.....	37
3.3. Caracterização da potencial actividade genotóxica de 6-cloro-benzo[a]pireno ...	41
3.3.1. Testes de citotoxicidade .....	41
3.3.2. Ensaio do cometa em condições alcalinas.....	43
4. Conclusões.....	53
5. Bibliografia.....	57
6. Anexos	

# 1. Introdução

A qualidade da água para consumo humano é cada vez mais uma preocupação mundial. Actualmente, a legislação nacional (Decreto-lei 306/2007) e internacional (Directiva 98/83/EC) decreta os parâmetros que definem a qualidade da água. De acordo com esses parâmetros, as Estações de Tratamento de Águas procuram remover os contaminantes, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de forma eficiente com altas concentrações de agentes de cloração, baixo pH e elevadas temperaturas (Harrison *et al*, 1976). Contudo estas condições parecem dar origem a sub-produtos de desinfecção, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados (Cl-HAPs), entre outros (Schwartz *et al*, 1979; Oyler *et al*, 1982).

## 1.1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

### 1.1.1. Considerações gerais

Os HAPs são um grupo de compostos que resultam de processos de combustão incompleta de madeiras, óleos e outras substâncias orgânicas como o fumo do tabaco e tráfico automóvel (Mahadevan *et al*, 2004; Mastral *et al*, 2000; OMS, 1998; Thorsen *et al*, 2004). Existem mais de 100 HAPs diferentes e normalmente não aparecem isolados. Podem aparecer no ar, água e solo, associados a partículas de pó. Podemos encontrá-los em vegetais frescos, frutas e cereais devido à deposição por via aérea (OMS, 1998).

Quimicamente, pertencem a uma classe de compostos orgânicos que contêm dois ou mais anéis aromáticos. Possuem uma baixa solubilidade em água e grande afinidade para as partículas o que faz com que sejam detectados em quantidades muito pequenas na água (Wolska *et al*, 2006; OMS, 1998). São indicadores de poluição, lentamente degradados no ambiente e pouco hidrolisáveis podendo, por isso, ser muito persistentes (OMS, 1998). Por estes motivos, não são detectados em quantidades significativas na água (Wolska *et al*, 2006).

Uma das principais fontes de contaminação das águas para consumo humano por HAPs é o revestimento das condutas de abastecimento, apesar de compostos formados

durante o processo de cloração e a infiltração de químicos poluentes nos sistemas de abastecimento também contribuirão para o efeito (Schwartz *et al*, 1979). O fluoranteno é o HAP mais comum em águas para consumo (OMS, 1998). Os HAPs podem ser degradados por adição de cloro, dióxido de cloro ou hipoclorito de sódio. No caso do hipoclorito de sódio, verificou-se que a degradação de HAPs era dependente da concentração inicial de agente de cloração e HAP, pH e temperatura (Harrison *et al*, 1976).

A exposição a HAPs tem de ser encarada como uma exposição a uma mistura de compostos, seja ela, de origem ambiental ou ocupacional. Existem estudos que associam o desenvolvimento de certas formas de cancro a exposições a HAP nomeadamente a nível dos pulmões e pele devido, respectivamente, a exposição por inalação e a exposições dérmicas. Vários HAPs como o benzo[b]fluoranteno (BbF) (1), benzo[k]fluoranteno (BkF) (2), benzo[a]pireno (BaP) (3), benzo[ghi]perileno (BghiP) (4), indeno [1,2,3-c,d]pireno (IcdP) (5), benzo[a]antraceno (BaA), benzo[j]fluoranteno (BjF) e dibenzo[a,h] antraceno (DBahA), são tumorigénicos em testes laboratoriais *in vivo*, como testes de exposição dérmica e injeção subcutânea (OMS, 1998). As estruturas dos compostos referidos na legislação portuguesa encontram-se na Figura 1.1.

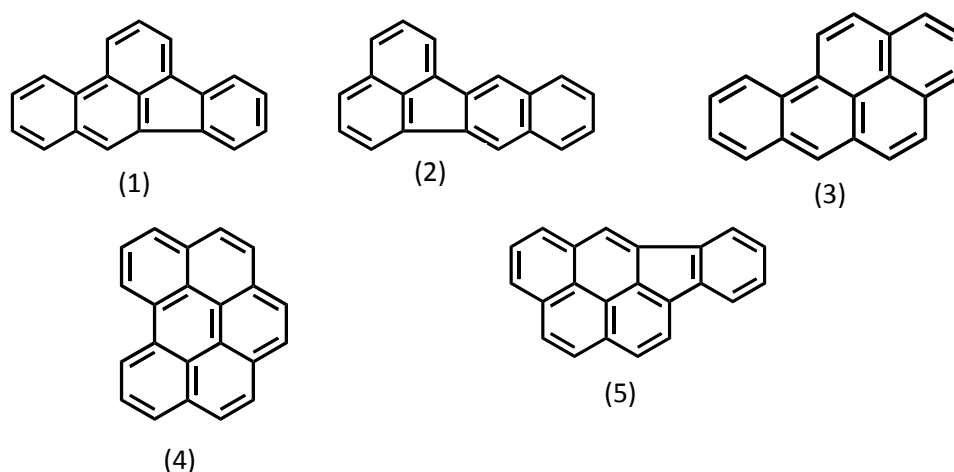


Figura 1.1. – Estrutura do BbF (1), BkF (2), BaP (3), BghiP (4) e IcdP (5).

Devido ao potencial genotóxico e mutagénico demonstrado pelos HAPs (OMS, 1998; ATSDR, 1990), a Organização Mundial de Saúde (OMS) possui legislação referente à determinação de alguns HAPs, escolhidos com base na persistência em águas superficiais e sua classificação como carcinogénicos. São eles: fluoranteno (FA),

pireno (PY), benzo[a]antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbF) (1), benzo[j]fluoranteno (BjF), benzo[k]fluoranteno (BkF) (2), benzo[a]pireno (BaP) (3), dibenzo[a,h]antraceno (DBahA), benzo[g,h,i]perileno (BghiP) (4) e indeno[1,2,3-cd]pireno (IcdP) (5). As descrições de algumas das suas propriedades químicas encontram-se na Tabela 1.1.

Tabela 1. 1. - Propriedades químicas de HAP referidos pela OMS (1998)<sup>1</sup>.

Composto	Fórmula molecular	Nº anéis aromáticos	P <sub>eb</sub> (°C)	Solubilidade em água (25°C) (µg/L)	Constante de Henry (25°C) (kPa m <sup>3</sup> /mol)	Coefficiente de partição n-octanol/água (K <sub>ow</sub> )
<b>Fluoranteno</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	375	260	6.5x10 <sup>-4</sup>	5.22
<b>Pireno</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	393	135	61.1x10 <sup>-3</sup>	5.18
<b>Benzo[a]antraceno</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	4	400	14	a	5.61
<b>Benzo[b]fluoranteno (1)</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	481	1.2	5.1x10 <sup>-5</sup>	6.12
<b>Benzo[j]fluoranteno</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	480	2.5	4.4x10 <sup>-4</sup>	6.12
<b>Benzo[k]fluoranteno (2)</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	480	0.76	a	6.84
<b>Benzo[a]pireno (3)</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	496	3.8	3.4x10 <sup>-5</sup>	6.50
<b>Dibenzo[a,h]antraceno</b>	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	5	524	0.5	7x10 <sup>-6</sup>	6.50
<b>Benzo[ghi]perileno (4)</b>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	545	0.26	2.7x10 <sup>-5</sup>	7.10
<b>Indeno[1,2,3 cd]-pireno (5)</b>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	536	62	2.9x10 <sup>-5</sup>	6.58

a-sem dados

<sup>1</sup> Adaptado de OMS Guidelines for drinking-water quality (vol.2).

As características apresentadas, como a baixa solubilidade em água, baixas constantes de Henry e elevado coeficiente de partição explicam a afinidade destes compostos com a matéria orgânica.

O BaP (3) é um dos HAPs mais carcinogénico (OMS, 1998; ATSDR, 1990). Por se encontrar em águas de abastecimento público, o valor máximo permitido foi estimado em 0,7 µg/L e o limite de detecção em 0,01 µg/L, por GC/MS e RLC-FLD (OMS, 2006). Na legislação portuguesa, o decreto-lei nº 306/2007 apresenta os valores paramétricos para o BbF(1), BkF (2), BaP (3), BghiP (4) e IcdP (5) em águas para consumo humano pois dos dez HAPs mencionados pela OMS, estes são os que apresentam maior número de anéis aromáticos. Para o BaP (3) a concentração máxima permitida é de 0,01 µg/L enquanto para os restantes HAPs é de 0,10 µg/L para a soma das suas concentrações.

Além de classificados como agentes genotóxicos, mutagénicos e carcinogénicos (IARC, 1998) os HAP podem ainda ser mencionados como desreguladores endócrinos pois interagem com os receptores endócrinos, ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Charles *et al*, 2000; Murk, 2002; van Lipzig *et al*, 2005). Os HAP são, em geral, pré-mutagénicos, isto é, precisam de ser metabolizados para expressarem as suas propriedades tóxicas (ATSDR, 1990; Colmsjo *et al*, 1984; Shimada *et al*, 2004).

De facto, muitos dos metabolitos de HAPs reagem covalentemente com o DNA e outras macromoléculas (Kim *et al*, 1998; van Lipzig *et al*, 2005). Portanto torna-se necessário avaliar o potencial genotóxico destes sub-produtos de desinfecção de água para consumo humano. Os HAPs podem actuar como inibidores, substratos e indutores enzimáticos (Spink *et al*, 2007). No caso do BaP (3), por exemplo, os seus metabolitos são capazes de se ligar ao receptor do estrogénio agindo como desregulador endócrino (Charles *et al*, 2000; Kim *et al*, 1998; van Lipzig *et al*, 2005).

Dado que os metabolitos de HAP são, em geral, mais reactivos que o próprio composto (Colmsjo *et al*, 1984), os ensaios de mutagénese realizados em microrganismos impõem a adição de sistemas exógenos de activação metabólica, normalmente o sistema S9. As linhas celulares como HepG2, linha celular de hepatocarcinoma humano, surgem como alternativas válidas porque retêm actividade de enzimas de fase I e II que desempenham um papel crucial na activação de procarcinogénicos genotóxicos e reproduzem de forma mais eficiente o comportamento *in vivo* do que modelos experimentais com células metabolicamente incompetentes ou com sistema de activação exógenos (Knasmuller *et al*, 1998; 2004; Uhl *et al*, 2000).

Alguns parâmetros que podem ser determinantes na obtenção de resultados fiáveis em testes de genotoxicidade, como o ensaio do cometa ou o ensaio de micronúcleos, são o tipo de célula, a sua capacidade de recuperação, a fase do ciclo celular, a genotoxina a estudar, duração entre exposição e o tempo que medeia entre o final da exposição e a análise do parâmetro em estudo (Valentin-Severin *et al*, 2003).

## **1.1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos estudados no projecto**

### **1.1.2.1. Benzo(a)pireno**

O BaP (3) apresenta cinco anéis aromáticos e é também conhecido como 3,4-benzopireno, 6,7-benzopireno ou benzo[d,e,f]criseno (US EPA). Estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, como a exposição dérmica e injeções subcutâneas,

realizados com o BaP (3) permitem classificá-lo como agente genotóxico e carcinogénico (ATSDR, 1990; Kim *et al*, 1998; OMS, 1998; 2006). Além disso o IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) classifica-o no grupo 2A, como provável carcinogénico para o Homem (IARC 1998).

O BaP (3) é um pré-mutagénico portanto necessita ser metabolizado para que adquira as suas propriedades cancerígenas e mutagénicas. A sua bioactivação só ocorre na presença das enzimas do citocromo P450, particularmente CYP1A1 e CYP3A4 (Figura 1.2.) (ATSDR, 1990; Shimada *et al*, 2004; Valentin-Severin *et al*, 2003; van Lipzig *et al*, 2005).

A biotransformação dos HAPs envolve diversos tipos de enzimas que catalizam reacções de oxidação, redução e hidrólise como as enzimas do citocromo P450 e enzimas que catalizam reacções de conjugação (Netto *et al*, 2000). As enzimas do citocromo P450A1 (CYP1A1) responsáveis pela activação metabólica de HAPs, como o BaP (3), actuam numa zona de elevada densidade electrónica originando epóxidos (BaP- epóxidos) (6a-6c) que por sua vez podem formar fenóis (7) ou até mesmo di-hidrodióis (8) por acção de epóxido hidrolases. Esses fenóis podem sofrer oxidação e originar quinonas ou produzir epóxidos secundários (9). Estes últimos, embora instáveis, são as formas mais reactivas com o DNA pois o carbono benzílico destes compostos pode criar ligações com o DNA (BaP-macromoléculas) (10) e iniciar um processo mutagénico. Os di-hidrodiolépóxidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolizados a tetróis (11), cuja formação pode ser utilizada como bioindicador da formação de diolépóxidos. Os epóxidos (6a-6c) podem também sofrer conjugação e formar BaP- glutatos (12).

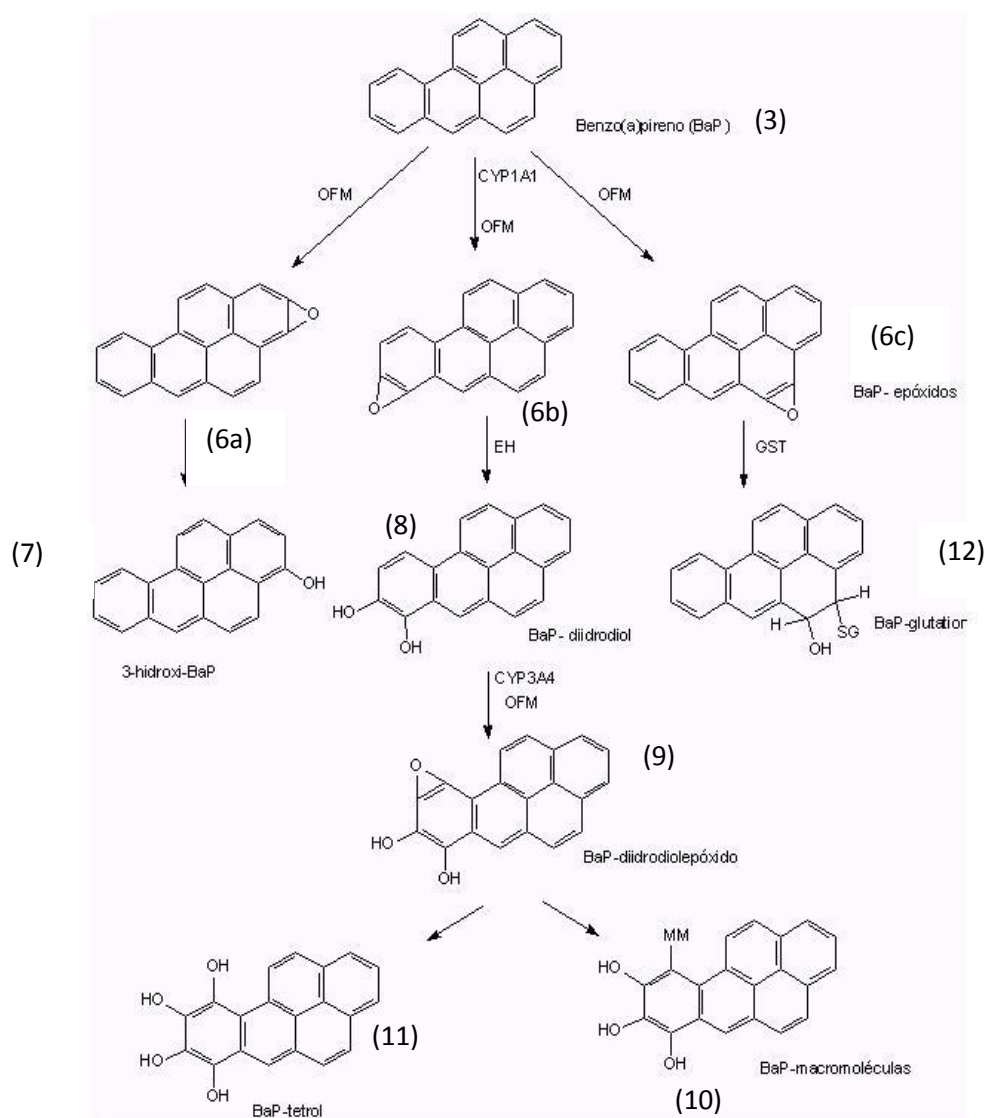


Figura 1.2.– Representação esquemática da ativação metabólica do BaP (3) ( Neto *et al*, 2000).

O BaP (3) é o HAP mais bem estudado relativamente à sua genotoxicidade e carcinogenicidade (ATSDR, 1990; Dietrich *et al*, 2008, OMS, 1998; Staal *et al*, 2006). Realizaram-se diversos testes sobre os efeitos genotóxicos desta e outras substâncias utilizando o ensaio do cometa. É um método rápido e apresenta elevada sensibilidade e especificidade (Tice *et al*, 2000). Utilizando este método, diversos autores (Uhl *et al*, 1999,2000; Valentin-Severin *et al*, 2003) descreveram que soluções de BaP (3) acima de 25  $\mu\text{M}$  apresentam efeitos genotóxicos significativos. Uma vez que diversos estudos já foram realizados, este é muitas vezes usado como controlo positivo em alguns ensaios de genotoxicidade (Uhl *et al*, 1999, 2000; Valentin-Severin *et al*, 2003)

### 1.1.2.2. Benzo(b)fluoranteno

O BbF (1) é um HAP com quatro anéis aromáticos. É conhecido como BbF (1) mas tem outros sinónimos como 2,3-benzofluoranteno, 3,4-benzofluoranteno, benzo[e]fluoranteno, benz[e]acefenantrileno, entre outros (US EPA) e pertence ao grupo 2B (possível carcinogénico para humanos), de acordo com a classificação do IARC. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que o BbF (1) induz efeitos genotóxicos (OMS, 1998).

De acordo com alguns estudos, o BbF (1) é metabolizado por oxidases originando di-hidrodióis, sendo consistente com o metabolismo de activação dos HAPs (Amin *et al*, 1985). A bioactivação deste composto ocorre através do citocromo CYP1A1 e 1A2. Os metabolitos do BbF identificados são: 12-hidroxiBbF, BbF-1,2-diol, BbF-11,12-diol, BbF-9,10-diol, 5- e 6-hidroxiBbF-9,10-diol, BbF-9,10,11,12-tetraol, BbF-9,10-diol-11,12-epóxido, 1-hidroxiBbF, 5-hidroxiBbF e 6-hidroxiBbF. O metabolito BbF 9,10-diol evidenciou actividade carcinogénica em testes realizados em epiderme de ratinhos (Geddie *et al*, 1987).

O BbF (1) induz a formação de tumores em ratinhos em testes de exposição dérmica e injeções subcutâneas. A dose mais baixa para estes testes é pelo menos dez vezes menor do que para o BaP (3), contudo não existem dados de estudos realizados em seres humanos (IARC, 1998). Porém, o BbF(1) é um componente de misturas, como o fumo de cigarro, que estão associadas a cancro humano (US EPA, 1990).

Estudos realizados por exposição dérmica de ratinhos permitiram avaliar a carcinogénese do BbF(1) durante 14 meses. Verificou -se que doses elevadas de BbF(1) (0,5% de BbF em acetona) induzem 90% de carcinomas em 8 meses e doses médias (0,1% de BbF em acetona) produzem 65% de carcinomas em ratinhos em 12 meses. Verificou-se também que houve aumento de animais com tumores e do número de tumores por animal (LaVoie *et al*, 1982). Estudos semelhantes também revelaram uma forte incidência de tumores (Amin *et al*, 1985).

### 1.1.2.3. Benzo(k)fluoranteno

O BkF (2) possui quatro anéis e designa-se também pelos nomes de 11,12-benzo[k]fluoranteno, 8,9-benzofluoranteno, dibenzo[b,jk]fluoreno, entre outros (US

EPA) e pertence ao grupo 2B (possível carcinogénico para humanos) de acordo com a classificação do IARC (1998).

Tal como os outros HAPs, o BkF (2) é metabolizado pelo citocromo P450. Tal como o BaP (3), estudos recentes evidenciam que o BkF (2) é capaz de influenciar a ligação ao receptor de estrogénio pois dados referem que a baixas concentrações os metabolitos do BkF aumentam a produção do 17 $\beta$ -estradiol, enquanto concentrações mais elevadas inibem este mecanismo.

Os metabolitos identificados do BkF são BkF-2,3-diol, BkF-8,9-diol e 3-,8- e 9-OHBkF. Estes estudos referem ainda que os efeitos indutivos destes metabolitos no CYP1A1 são possivelmente um factor importante nas interacções HAP-CYP que definem a toxicidade e carcinogenicidade dos HAPs (Spink *et al*, 2007).

Estudos *in vivo* com ratinhos, não revelam que o BkF (2) apresente uma actividade tumorigénica significativa (OMS, 1998) contudo estudos testes de mutagénese realizados em bactérias, na presença de um sistema exógeno de activação metabólica, apresentaram resultados positivos (US EPA).

Tal como o BbF(1), não existem dados sobre a carcinogénese do BkF(2) no Homem. No entanto existem alguns estudos realizados em ratinhos, em que se verificou uma relação dose-resposta sendo que as concentrações mais elevadas apresentaram mais animais com tumores e com maior número de tumores por animal (LaVoie *et al*, 1982; Amin *et al*, 1985).

### **1.1.3. Metodologias de quantificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**

Existem vários métodos para a análise de HAPs em amostras de água, sendo as mais comuns, RLC-UV, RLC-FLD, RLC-DAD, GC/MS e GC-FID (Martinez *et al*, 2004; El-Beqqali *et al*, 2006; Petterson *et al*, 2004; León *et al*, 2003; Doong *et al*, 2000; Djozan *et al*, 1999; Liu *et al*, 1997; Manodori *et al*, 2006; Anyakora *et al*, 2005; Rezaee *et al*, 2006).

A extracção e pré-concentração de HAPs são normalmente realizadas através de técnicas como extracção líquido-líquido (LLE) e extracção em fase sólida (SPE), frequentemente utilizadas por vários autores (Urbe *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2006; Liu *et al*, 1997; Manodori *et al*, 2006; Anyakora *et al*, 2005). Estudos recentes utilizam

também a microextração em fase sólida (SPME) ou microextração em fase líquida (LPME) (Hou *et al*, 2002; Chen *et al*, 2004).

A metodologia SPE aplicada aos HAPs utiliza cartuchos com fase reversa C<sub>18</sub> para a remoção desses compostos da solução aquosa. As amostras aquosas passam através desses cartuchos, a uma velocidade máxima, para que os HAPs fiquem retidos na fase do cartucho. Os cartuchos secam sob o fluxo de azoto e remove-se o HAP adsorvido no cartucho com um solvente orgânico, por exemplo, o *n*-hexano. A amostra é depois concentrada e adiciona-se o solvente apropriado para a análise por cromatografia líquida de fase reversa que se seguirá, para quantificar o HAP.

A técnica de cromatografia líquida pode ser associada a um detector de fluorescência (FLD) ou de ultra-violeta (UV). O detector de fluorescência é muito específico, uma vez que tem que se seleccionar o comprimento de onda de excitação e emissão e por isso é muitas vezes escolhido para a detecção deste tipo de composto (Wolska *et al*, 2006; Titato *et al*, 2006).

A metodologia de SPE é uma forma simples, rápida e económica de determinar os HAPs presentes na água para consumo humano sem interferência de outros contaminantes químicos (Garcia-Falcon *et al*, 2004). Esta técnica permite evitar os problemas associados à extração líquido-líquido como a separação incompleta de fases, baixa percentagem de recuperação, utilização de material de vidro dispendioso e necessidade de grandes quantidades de solventes (Supelco Co. (Guide)).

## 1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados

Os Cl-HAPs são derivados clorados de HAPs. Apresentam dois ou mais anéis aromáticos e um ou mais átomos de cloro associados aos anéis aromáticos. Tal como os HAPs, podem encontrar-se no ar, solo e água. Derivados clorados como o 6-cloro-benzo[a]pireno (6-Cl-BaP) (13) encontram-se presentes no ar durante todo o ano enquanto outros variam com as estações do ano (Kitawaza *et al*, 2006).

A existência de derivados clorados de HAPs em águas para consumo humano formados devido ao processo de desinfecção por cloro tem sido demonstrada por alguns autores (Oyler *et al*, 1982,1983; Shiraishi *et al*, 1985; Hu *et al*, 2006).

Em alguns estudos, foram encontrados derivados monoclorados do naftaleno, dibenzofurano, fluoreno, fluorenona, fenantreno e fluoranteno, e diclorados do

naftaleno, fenantreno e fluoranteno em amostras de água. Verificou-se também a presença de derivados oxigenados (Shiraishi *et al*, 1985).

Oyler *et al* (1982,1983), verificou que a desinfecção de águas de abastecimento público a pH <6 origina produtos oxigenados (quinonas) e clorados enquanto a pH > 6 os produtos obtidos são apenas oxigenados (epóxidos, fenóis, quinonas, etc). Verifica-se o aumento da reactividade do cloro e formação do ácido hipocloroso com a diminuição do pH (Oyler *et al*, 1978).

As espécies predominantes em soluções aquosas com cloro são HOCl, OCl<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Cl<sub>2</sub> e Cl<sub>3</sub><sup>-</sup> (Oyler *et al*, 1982). A relação entre as espécies é descrita nas equações (1), (2) e (3).



Estas relações permitem verificar que a pH ácido a concentração do ácido hipocloroso é significativa. De acordo com estas considerações, a concentração de ácido hipocloroso formado, devido à adição de hipoclorito de sódio em águas de abastecimento público, vai condicionar o aparecimento de Cl-HAPs (Harrison *et al*, 1976; Oyler *et al*, 1978). Assim a pH > 6 não se originam produtos clorados devido à ausência de concentrações de ácido hipocloroso significativas (Oyler *et al*, 1982).

Além do pH, outros factores são considerados responsáveis pelo aparecimento dos Cl-HAPs, nomeadamente a concentração do agente de cloração que normalmente é o hipoclorito de sódio nas ETAs, a concentração dos HAPs presentes na água e a temperatura (Harrison *et al*, 1976; Oyler *et al*, 1978).

Um estudo desenvolvido por Hu *et al* (2006) demonstrou que o pireno quando submetido, em água, a um processo de desinfecção de água pelo cloro dá origem a diversos produtos clorados. Na ausência do ião brometo verificou-se que o produto principal é o 1-cloro-pireno (1-Cl-PY) enquanto na presença do ião referido os produtos obtidos foram o di-bromo-pireno (di-Br-PY) e o 1-bromo-pireno (1-Br-PY) (Hu *et al*, 2006).

A toxicidade destes compostos depende do número de substituições e da posição do cloro (Kitawaza *et al*, 2006). Testes de mutagénesse mostraram que alguns derivados clorados dos HAPs eram mais mutagénicos do que dos respectivos HAP não

substituídos (Lofroth *et al*, 1984), nomeadamente o antraceno, fenantreno, benzo[a]antraceno, pireno, criseno utilizando o teste de Ames. Nesse estudo é referido que os efeitos mutagénicos dependem da estrutura química e da adição de um sistema exógeno de activação metabólica, ou seja necessitam de ser metabolizados, como é o caso do 1-cloro-pireno (Lofroth *et al*, 1984; Colmsjo *et al*, 1984).

Num outro estudo mostrou-se que águas sujeitas a cloração induziram um aumento de aberrações cromossómicas dez vezes superior a águas tratadas com outro agente de desinfecção (Itoh *et al*, 1996).

Estudos recentes indicam também que os derivados clorados, tal como os HAPs, interferem com a actividade do receptor de estrogénios activando o receptor de hidrocarbonetos arilos, responsável por diversas respostas antiestrogénicas. Verifica-se também que a resposta aos derivados clorados é ligeiramente superior à dos HAPs (Hu *et al*, 2006).

Dos HAPs em estudo, apenas o derivado clorado do BaP (3), o 6-Cl-BaP (13), se encontra presente no ambiente, nomeadamente no ar (Kitawaza *et al*, 2006).

Apesar de outros estudos terem demonstrado que a toxicidade dos derivados Cl-HAPs é maior que a dos respectivos precursores e de igualmente se ter demonstrado que este tipo de derivados podem ser encontrados em águas de abastecimento, sobre o 6-Cl-BaP (13) não existem estudos efectuados. Para o BbF (1) e BkF (2) não existe qualquer registo de preparação de derivados clorados e consequentemente de estudos genotóxicos sobre os mesmos.

Diversos métodos de síntese de Cl-HAP são apresentados na literatura (Dewhurst *et al*, 2003; Dyker *et al*, 2003; Nakamura *et al*, 2007). Nos estudos de Dewhurst *et al* (2003) e Dyker *et al* (2003), os métodos de síntese recorreram a agentes de cloração como *N*-cloro-succinimida e dicloreto de cobre dissolvidos em carbonato de propileno e tetracloreto de carbono, respectivamente. Ambas as sínteses apresentam rendimentos satisfatórios contudo são procedimentos morosos, nomeadamente no método de síntese com dicloreto de cobre em tetracloreto de carbono que demora cerca de 24 horas.

Nakamura *et al* (2007) utiliza o hipoclorito de sódio como agente de cloração diluído em metanol para preparar derivados clorados do pireno (PY). Este método apresenta-se como uma alternativa à utilização de solventes carcinogénicos para a síntese de Cl-HAPs, contudo têm o inconveniente de utilizar um solvente pouco indicado para alguns HAPs, nomeadamente o BaP (3), que é pouco solúvel em metanol.

### 1.3. Metodologias de avaliação de efeitos citotóxicos e genotóxicos

Das metodologias utilizadas para determinar a presença de efeitos citotóxicos de genotoxinas em estudos *in vitro*, o teste do vermelho neutro é um dos mais utilizados. De acordo com Boreunfreund *et al* (1985), o teste do vermelho neutro (*Neutral Red*) baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem este corante nos lisossomas.

Tal facto ocorre porque o corante é um catiónico fraco que entra através da membrana celular e fica retido nos lisossomas devido à acidez dos mesmos. Caso a membrana não esteja danificada, a incorporação do corante será maior, permitindo distinguir células viáveis de não viáveis, através da intensidade do sinal espectrofotométrico.

Quando se procede à avaliação de efeitos genotóxicos, é sempre importante ter em atenção que os efeitos demonstrados podem depender, além da genotoxicidade do agente, da citotoxicidade do mesmo ou até do efeito de solventes. Assim torna-se essencial estudar os efeitos citotóxicos sempre que se pretende avaliar efeitos genotóxicos de um agente, para evitar falsos resultados positivos (Tice *et al*, 2000).

A presença de lesões no DNA, nomeadamente quebras de cadeia na molécula de DNA, quebras e rearranjos cromossómicos, provoca instabilidade genómica que, se sabe estar associada ao processo de carcinogénese (Tice *et al*, 2000).

Neste contexto, têm sido utilizadas diversas técnicas na detecção de danos no DNA para avaliar a actividade genotóxica, como por exemplo o ensaio de electroforesede célula única em gel ou ensaio do cometa (Tice *et al*, 2000) e o ensaio dos micronúcleos (Fenech, 2006). Nas últimas duas décadas, recorreu-se ao ensaio do cometa, comparativamente a outras técnicas, por apresentar várias vantagens como a uma boa sensibilidade na detecção de baixos níveis de lesões no DNA, a necessidade de um número reduzido de células por amostra, baixos custos, facilidade de aplicação, utilização de pequenas quantidades de genotoxina a testar e a rapidez com que se obtêm os resultados (Tice *et al*, 2000).

A versatilidade de aplicações deste ensaio também tem contribuído para a sua utilização face a outras técnicas. Esta metodologia pode ser utilizada para realizar ensaios de genotoxicidade, identificando possíveis agentes mutagénicos e carcinogénicos, mas também pode ser usado para monitorização ecológica e estudos de reparação de DNA (Collins, 2004).

O ensaio do cometa permite detectar lesões no DNA em células individuais. Consiste essencialmente na lise de células, após exposição ao agente genotóxico, incorporadas numa camada de gel de agarose sobre uma lâmina, permitindo a remoção de membranas, citoplasma e nucleoplasma (Collins, 2004). Após o período de lise, apenas o DNA, RNA e proteínas ficam imobilizados na lâmina. Estes nucleóides são depois incubados numa solução alcalina ( $\text{pH} > 13$ ), conduzindo à desnaturação e desenrolamento do DNA. As lâminas são depois sujeitas a electroforese em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) (Tice *et al*, 2000) onde o DNA fragmentado das células lesadas migra em direcção ao ânodo, dando origem a estruturas semelhantes a cometas, com um núcleo constituído por DNA intacto e uma cauda constituída por DNA fragmentado (Collins, 2004).

Após a neutralização do microgel e coloração com um fluorocromo apropriado, normalmente o brometo de etídio, os cometas são visualizados por microscópio de fluorescência (Tice *et al*, 2000). A extensão da cauda depende do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos e a intensidade da cauda do cometa, relativamente à do núcleo, indica o nível de lesões no DNA (Collins, 2004).

#### **1.4. Objectivos**

A informação disponível revela a formação de derivados clorados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos durante o processo de cloração de águas de abastecimento (Hu *et al*, 2006; Oyler *et al*, 1983). Uma vez que derivam de compostos potencialmente mutagénicos e carcinogénicos para o Homem (IARC, 1998), torna-se indispensável o estudo dos efeitos genotóxicos na saúde humana dos sub-produtos gerados pela associação de cloro, presente nas águas de abastecimento durante a desinfecção.

No âmbito deste estágio são alvos de estudo alguns derivados clorados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos referidos na legislação portuguesa e internacional, nomeadamente o BbF (1), BkF (2) e BaP (3).

Este estudo visa três objectivos específicos:

1. Sintetizar e caracterizar os derivados clorados do benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno;

2. Implementar metodologias analíticas para aplicação futura na identificação e quantificação de derivados clorados de HAPs em águas destinadas ao consumo humano;
3. Avaliar o potencial genotóxico dos derivados clorados de HAPs sintetizados em 1.

## 2. Procedimento experimental

No decorrer de todas as fases do trabalho experimental foram tomadas as devidas precauções de segurança. Assim devido à toxicidade dos reagentes manipulados recorreu-se ao uso de bata, luvas, máscara e óculos de protecção tendo-se operado sempre em *hotte*.

### 2.1. Reagentes e solventes

O BaP (3) (98%) (CAS 50-32-8) foi obtido comercialmente (Sigma, Saint Louis, USA) tal como o sal de transferência de fase, Aliquat ® 336 (Cognis corporation Ion-Transfer Technology, Tucson, USA). O BbF (1) (99,5%) (CAS 205-99-2) e o BkF (2) (99,5%) (CAS 207-08-9) são da marca Dr.Ehrenstorfer GmbH, Alemanha.

Os solventes *n*-hexano (Suprasolv) e acetato de etilo foram adquiridos através da Merck. O acetonitrilo (99,9%) utilizado é da marca Carlo Erba reagenti (Rodano. MI, Itália) e a água ultra-pura foi obtida por um sistema Milli-Q (Milli-Q Corp., USA). O azoto utilizado é Premier- X50S da Gasin.

Todos os solventes foram, sempre que necessário, purificados e secos por métodos padronizados (Perrin *et al*, 1988).

Os reagentes necessários para a preparação de lâminas, microgel e soluções de lise, neutralização e electroforese utilizados no ensaio do cometa foram fornecidos pela marca Sigma Aldrich®, Inc. (USA). O meio celular e os suplementos necessários foram adquiridos através da Invitrogen Corporation (USA).

Os HAPs utilizados foram guardados ao abrigo da luz e as soluções preparadas com 6-Cl-BaP (13) foram colocadas em frascos de vidro âmbar a 4°C.

## 2.2. Instrumentação

### 2.2.1. Ressonância magnética nuclear de próton

Os espectros de ressonância magnética nuclear (NMR), foram adquiridos num espectrómetro Brüker, modelo ARX 400 (400 MHz), em CD<sub>3</sub>CN a 18°C. Os desvios são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). Utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os resultados encontram-se indicados pela seguinte ordem:

Núcleo (solvente): desvio químico ( $\delta$ , ppm)[intensidade relativa (nH, como número de prótons), multiplicidade do sinal (d-duplete, m-multiplete), constante de acoplamento (J, Hz), atribuição na molécula].

### 2.2.2. Espectrometria de massa

Os espectros de massa obtidos, para caracterização do 6-Cl-BaP (13), por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC/MS), foram adquiridos num aparelho GC 6000-Carlo Erba Veja Series 2, MS QMD1000 Carlo Erba, numa coluna DB-5, 30m x 2mm DI, 0,25 $\mu$ m de filme (Agilent, USA). Utilizou-se o programa de temperatura seguinte: temperatura inicial 60°C durante 3 min e uma rampa de 10°C/min até 250°C seguida de outra rampa de 20°C/min até 300°C, mantendo-se a esta temperatura por 13 min. A fonte iónica e a interface foram mantidas a 200°C e 320°C respectivamente. Para a análise e processamento dos resultados utilizou-se o software Masslynks (Micromass, Reino Unido Ltd.).

O estudo da estabilidade térmica utilizou-se num aparelho de cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa (GC/MS) (Varian 4000 GC/MS) numa coluna VF-5ms, 30m x 0,32mm DI, 0,25 $\mu$ m de filme (Varian, Alemanha). O programa de análise é o seguinte: temperatura inicial de 50°C durante 1 min, e uma rampa de 20°C/min até 60°C durante 30 segundos, seguida de outra rampa de 20°C/min até 200°C. Sucede-se outra rampa de 10°C/min até 290°C mantendo-se esta temperatura por 5 minutos. A fonte iónica e a interface foram mantidas a 240°C e 280°C respectivamente. Para a análise e processamento dos resultados utilizou-se o software Workstation (Varian, Alemanha).

### 2.2.3. Cromatografia

#### 2.2.3.1. Cromatografia de camada fina (TLC)

As cromatografias em camada fina foram efectuadas em placas de sílica Merck Kiesegel GF254 com 0,2 mm de espessura. A detecção dos compostos foi efectuada por irradiação de luz ultravioleta (UV) a 254 nm e/ou 366 nm.

#### 2.2.3.2. Cromatografia líquida de fase reversa (RLC)

A análise e purificação das misturas reaccionais foram efectuadas por cromatografia líquida de fase reversa com detecção de ultra-violeta (RLC-UV). Efectuou-se uma eluição isocrática, em acetonitrilo (100%), e a detecção foi efectuada a um comprimento de onda de  $\lambda=254$  nm. As análises foram realizadas com uma coluna analítica Luna RP18 (25 cm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, *Phenomenex Luna*®, Torrance, CA), com um volume de injeção de 10  $\mu$ L, operando a 1 mL/min durante 20 minutos. A purificação por RLC semi-preparativo foi realizada com uma coluna semi preparativa Luna RP 18 (25 cm x 21,20 mm, 10  $\mu$ m, *Phenomenex Luna*®, Torrance, CA) operando a 3 mL/min durante 25 minutos. O aparelho de cromatografia foi o LC 10 (Shimadzu, Alemanha) com detector de UV/visível (UV/vis) e o software correspondente é o CLASS M10A.

Na metodologia SPE-RLC-FLD para a quantificação do 6-Cl-BaP em amostras de água utilizou-se um aparelho de cromatografia da marca Agilent 1100 Series com detector de fluorescência. A coluna utilizada é uma coluna C18 ChromSepHPLC column SS 25cmx4,6mm equipada com uma pré-coluna ChromSep Guard Column SS 10x3mm (Varian, Alemanha). Efectuou-se uma eluição isocrática em acetonitrilo (100%) a um fluxo de 2 mL/min durante 20 minutos. O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L para o estudo da estabilidade a 18°C e 37°C e de 50  $\mu$ L para os restantes ensaios. Os comprimentos de onda do detector utilizados foram  $\lambda_{\text{excitação}} = 295$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}} = 420$  nm, 440nm. O software utilizado é o ChemStation.

### 2.2.4. Extração em fase sólida

O sistema de extração em fase sólida é da marca Teknokroma (Espanha) com doze posições. Os cartuchos utilizados C<sub>18</sub> (500 mg, 6mL) Bond elut são da marca Varian (Alemanha).

## 2.3. Preparação e caracterização de padrões de Cl-HAPs

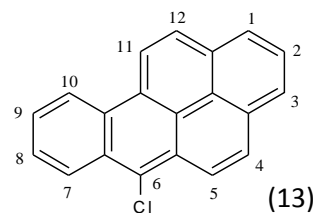
### 2.3.1. Método geral A

Num balão volumétrico preparou-se uma solução de HAP (1,98 mmol) em *n*-hexano (2,5 mL), à qual se adicionou uma solução de aliquat 336 (0,8 mg; 0,198 mmol), hipoclorito de sódio (200 µL; 1,98 mmol) e HCl 0,1 M (200µL) em água (1 mL). O sistema bifásico resultante foi agitado durante 10 min, após os quais se separaram as fases. A fase orgânica foi destilada a pressão reduzida, num evaporador rotativo, e posteriormente redissolveu-se em acetonitrilo (3 mL). A solução resultante foi purificada por RLC-UV/vis semi-preparativo.

#### 2.3.1.1. Reacção com o benzo[a]pireno

Na reacção efectuada na presença de BaP (3) (21,6 mg; 8,56 mmol), segundo o método geral descrito em 2.3.1., isolou-se o produto 6-Cl-BaP (13), sólido amarelo com um rendimento de 96% (20,7 mg).

**6-Cl-BaP (13)** : <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 9.23-9.16 (2H, m, H10 + H11), 8.87-8.84 (1H, m, H7), 8.55 (1H, d, *J* = 9.5, H5), 8.44 (1H, d, *J* = 9.0, H12), 8.37 (1H, d, *J* = 7.4, H1), 8.24 (1H, d, *J* = 7.2, H3), 8.17 (1H, d, *J* = 9.6, H4), 8.09-



8.06 (1H, m, H2), 7.98-7.97 (2H, m, H9 + H8); GC-MS (EI): *m/z* (%): 286 (100) [M<sup>+</sup>], 250 (30) [M<sup>+</sup>-HCl], 143 (7), 125 (16); FExS (λ<sub>max</sub>, nm): 242, 266, 288, 306, 323, 340, 359, 381; FEmS (λ<sub>max</sub>, nm): 343, 359, 417, 441, 481.

### **2.3.1.2. Reacção com o benzo[b]fluoranteno**

Na reacção efectuada com BbF (1), segundo método descrito em 2.3.1., não se detectou por RLC-UV/vis a formação de qualquer produto.

### **2.3.1.2. Reacção com o benzo[k]fluoranteno**

Na reacção efectuada com BkF (2), segundo método descrito em 2.3.1., não se detectou por RLC-UV/vis a formação de qualquer produto.

### **2.3.2. Método geral B**

Preparou-se uma solução de HAP (20,1 mmol) em tetracloreto de carbono anidro (3mL) à qual se adicionou dicloreto de cobre (62,2 mg, 46,2 mmol). A mistura resultante foi refluxada, sob atmosfera de azoto, durante 24 horas. O sólido em suspensão foi removido por filtração a quente e adicionou-se tetracloreto de carbono (4 mL) e dicloreto de cobre (27 mg, 5 mmol), tendo-se novamente refluxado durante 8 horas. Após remoção do sólido por filtração quente, a solução foi destilada a pressão reduzida. O resíduo obtido foi re-dissolvido em acetonitrilo e purificado por RLC-UV/vis semi-preparativo.

#### **2.3.2.1. Reacção com o benzo[a]pireno**

Na reacção efectuada segundo o procedimento geral descrito em 2.3.2, na presença de BaP (3) (50,8 mg; 20,1mmol) foi isolado o 6-Cl-BaP (13) com um rendimento de 82% (41,7 mg). O produto apresenta as mesmas características espectroscópicas do produto descrito em 2.3.1.1.

#### **2.3.2.2. Reacção com o benzo[b]fluoranteno**

Não se detectou, por RLC-UV/vis, a formação de qualquer produto na reacção efectuada com BbF (1), segundo método descrito em 2.3.2.

### **2.3.2.3. Reacção com o benzo[k]fluoranteno**

Não se detectou, por RLC-UV/vis, a formação de qualquer produto na reacção efectuada com BkF (2), segundo método descrito em 2.3.2.

## **2.4. Ensaio de estabilidade térmica**

### **2.4.1. Estabilidade do 6-cloro-benzo[a]pireno por <sup>1</sup>H-NMR**

Preparou-se uma solução de 6-Cl-BaP (13) em CD<sub>3</sub>CN (1 mg/L). Os espectros de <sup>1</sup>H-NMR foram adquiridos a 37°C de 10 em 10 minutos ao longo de 4 horas.

### **2.4.2. Estabilidade do 6-Cl-BaP por GC/MS**

Preparou-se uma solução de 6-Cl-BaP (13) (10 mg/L) a partir da dissolução de 0,8 mg de 6-Cl-BaP (13) em 1 mL de acetato de etilo e posterior diluição de 12 µL em 988 µL de acetato de etilo. Colocou-se a solução num banho de água a 37°C e realizaram-se análises de 30 em 30 minutos ao longo de 4 horas usando o programa de temperatura descrito em 2.2.2.

### **2.4.3. Estabilidade do 6-Cl-BaP por RLC-FLD**

Preparou-se uma solução de 6-Cl-BaP (13) (1 mg/L), preparada pela dissolução de 0,1 mg em 1 mL de acetonitrilo e posterior diluição de 10 µl em 990 µL de acetonitrilo. Colocaram-se 300 µL de solução, num frasco de 2 mL, num banho de água a 37°C e realizaram-se análises de 30 em 30 minutos ao longo de 4 horas usando o programa de temperatura descrito em 2.2.2.

Simultaneamente, colocaram-se 300 µL de solução, num frasco de 2 mL, numa sala com temperatura ambiente de 18°C e efectuaram-se análises por RLC-FLD de 30 em 30 minutos ao longo de 8 horas.

## 2.5. Validação da metodologia SPE-RLC-FLD

### 2.5.1. Estudo da linearidade das curvas de calibração (SPE-RLC-FLD)

O estudo da linearidade das curvas de calibração foi realizado de acordo com as normas ISO 8466-1, -2 e guia Relacre 13.

#### 2.5.1.1. Injeção de soluções de calibração SPCAL1 a SPCAL 10

A solução mãe foi obtida pela dissolução de 1,1 mg de 6-Cl-BaP (13) em acetonitrilo num balão volumétrico de 10 mL. Seguidamente diluiu-se a solução de forma a obter uma solução (solução filha 1) com a concentração de 0,44 mg/L (10 µL da solução mãe em acetonitrilo num balão volumétrico de 5 mL).

As soluções seguintes foram preparadas diluindo a solução filha 1 (0,44mg/L) com acetonitrilo, num balão volumétrico de 5mL. Para tal retiraram-se os volumes da solução filha 1 descritos na tabela 2.1.

Tabela 2. 1 - Concentrações de 6-Cl-BaP utilizadas para elaboração da curva de calibração.

Solução a preparar	Concentração final (µg/L)	Volume retirado (µL)
SPCAL 1	1	11,4
SPCAL 2	2	22,7
SPCAL 3	3	34,1
SPCAL 4	4	45,4
SPCAL 5	5	56,8
SPCAL 6	6	68,2
SPCAL 7	7	79,6
SPCAL 8	8	90,9
SPCAL 9	9	102
SPCAL 10	10	114

SPCAL – solução padrão de calibração

As soluções preparadas foram analisadas por RLC-FLD, de acordo com o descrito em 2.2.3.2.

### **2.5.1.2. Estudo da gama de trabalho**

Prepararam-se dez soluções de 6-Cl-BaP (13) a partir da solução filha 1 (0,44 mg/L) e diluídas em acetonitrilo num balão volumétrico de 5 mL. Retiraram-se 11,4 µL e 114 µL da solução referida para obter a concentração final de 1 e 10 µg/L, respectivamente. As análises foram realizadas por RLC-FLD, conforme descrito em 2.2.3.2.

O procedimento foi realizado em dois dias consecutivos por um operador.

### **2.5.2. Determinação da percentagem de recuperação, limite de detecção e de quantificação**

#### **2.5.2.1. Procedimento geral**

Prepararam-se soluções com 250 mL de água ultra-pura, 75 mL de acetonitrilo e uma quantidade variável de amostra, dependendo da determinação que se pretende efectuar. Seguidamente, procedeu-se ao condicionamento dos cartuchos C<sub>18</sub> de SPE (500 mg, 6 mL) com 7 mL de acetonitrilo e 14 mL de água ultra-pura, sem que os cartuchos secassem. Fez-se passar a solução preparada anteriormente à velocidade máxima possível, com o auxílio de uma bomba de vácuo, e lavou-se o frasco com uma solução de lavagem (acetonitrilo: água ultra-pura (30:100)). Secou-se o cartucho com fluxo de azoto durante 20 minutos. A amostra foi depois eluída com 12 mL de *n*-hexano, de forma repartida (5+5+2). Por fim, concentrou-se os volumes para 1 mL com fluxo de azoto e adicionou-se 2 mL de acetonitrilo. Finalmente, deixou-se concentrar até obter um volume de 1 mL e quantificou-se por RLC-FLD, conforme descrito em 2.2.3.2.

#### **2.5.2.2. Determinação da percentagem de recuperação**

Prepararam-se seis soluções aquosas com acetonitrilo sem amostra (branco) e seis com 250 µL da solução filha 2 (0,01 mg/L), preparada através da diluição de 456 µL da solução filha 1 em acetonitrilo num balão volumétrico de 20 mL. Seguidamente procedeu-se conforme descrito em 2.5.2.1.

O procedimento foi realizado em dois dias consecutivos por um operador.

### **2.5.2.3. Determinação do limite de detecção**

Prepararam-se seis soluções aquosas com acetonitrilo e 35 µL da solução filha 2 (concentração final em água 0,0014 µg/L). Seguidamente procedeu-se conforme descrito em 2.5.2.1. O procedimento foi realizado por dois operadores em dois dias consecutivos.

### **2.5.2.4. Determinação do limite de quantificação**

Prepararam-se seis soluções aquosas com acetonitrilo e 113 µL da solução filha 2 (concentração final em água 0,00452 µg/L). Seguidamente procedeu-se conforme descrito em 2.5.2.1. O procedimento foi realizado por dois operadores em dois dias consecutivos.

## **2.6. Caracterização da potencial actividade genotóxica de Cl-HAPs**

### **2.6.1. Linha celular**

Para este estudo utilizaram-se células metabolicamente competentes, células HepG2 (ATCC 180, Braunschweig, Alemanha), derivadas de hepatocarcinoma humano. Os testes foram realizados quando as células se encontravam entre a passagem 10 e 33. Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar Kojair, modelo KBS-125, classe II B em condições de esterilidade.

### **2.6.2. Manutenção celular**

As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) com Glutamax I, ao qual se adicionou 2,5 % tampão HEPES, 1,5 % penicilina/streptomicina, 1% fungizona e 15 % soro bovino fetal inactivado. As células foram mantidas na estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em frascos de cultura médios (75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Roskilde, Dinamarca).

A subcultura e propagação das células HepG2 foi efectuada duas vezes por semana e a diluição utilizada foi 1/2 ou 1/3, dependendo do estado de confluência da cultura celular.

Assim para a subcultura, as células foram lavadas, tripsinizadas com uma solução tripsina-EDTA a 25% (Invitrogen Corporation, California, USA) e incubadas à temperatura de 37°C até que as células se destacassem da superfície de crescimento. A tripsina foi inativada por adição de 4,5 mL de meio de cultura seguindo-se uma centrifugação (301×g, 5 min). As células foram depois ressuspensas e distribuídas de acordo com a diluição desejada em frascos de cultura. Para evitar stress celular, provocado pela diferença de temperatura, todos os reagentes eram pré-aquecidos a 37°C.

### **2.6.3. Exposição das células ao 6-cloro-benzo[a]pireno e ao benzo[a]pireno**

A amostra de 6-Cl-BaP (13) utilizada para preparar as soluções seguintes apresentou um grau de pureza de 96%. Prepararam-se duas soluções mãe de 6-Cl-BaP (13) em acetonitrilo com concentrações de 0,9 g/L (p/v) e 30 mg/L (p/v) e a partir destas prepararam-se as soluções em meio de cultura com a concentração a testar. Prepararam-se, também, duas soluções de BaP (3) em dimetilsulfóxido (DMSO) com concentrações de 3 g/L (p/v) e 50 mg/L (p/v).

Para controlo positivo, preparou-se a solução de etilmetilsulfonato (EMS) (20 mM) em meio de cultura, na altura do ensaio. Como controlos negativos prepararam-se soluções com o volume máximo utilizado dos solventes do 6-Cl-BaP (13) e BaP (3), respectivamente, 199 µL de acetonitrilo e 52 µL de DMSO em 5 mL de meio de cultura.

As concentrações de 6-Cl-BaP (13) e BaP (3) testadas foram 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM e 125 µM, ao longo de 24 horas. Como controlos negativos utilizaram-se os solventes do 6-Cl-BaP (13) e BaP (3), respectivamente, acetonitrilo e DMSO.

### **2.6.4. Avaliação de viabilidade celular pelo azul tripano**

O ensaio de viabilidade celular utilizado foi o ensaio de azul tripano. Este baseia-se na capacidade de células não viáveis incorporarem o corante, permitindo a sua distinção de células viáveis pela coloração azul, em microscopia óptica.

Este ensaio permite calcular a viabilidade celular após o tratamento das células a inocular quer no teste de citotoxicidade quer no ensaio do cometa. Neste último caso, foi realizado antes e depois da exposição celular às concentrações testadas. Para tal

retiraram-se 50 µL da suspensão celular e adicionaram-se 50 µL de uma solução de azul de tripano (0,1%).

Seguidamente contou-se o número de células viáveis (transparentes) e inviáveis (azuis) num hemacitómetro e calculou-se o número de células viáveis por mL, considerando a diluição efectuada, pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

### **2.6.5. Avaliação de citotoxicidade pelo vermelho neutro**

O teste do vermelho neutro utilizado foi efectuado com o descrito por *Boreunfreund et al* (1985). Inocularam-se  $2 \times 10^4$  células numa placa de 96 placas (Nunc) com 100 µL de meio de cultura. As células foram incubadas na estufa a 37°C com 5%CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Seguidamente substituiu-se o meio de cultura por meio de cultura com 6-Cl-BaP nas concentrações a testar. O tempo de exposição escolhido foi de 24 horas. Passado esse tempo removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 10 µL de solução aquosa de vermelho neutro (0,5 mg/mL) e 90 µL de meio de cultura a cada um dos poços, para uma concentração final de 50 µg/mL, e deixou-se a incubar por 3 horas (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) para incorporação do corante. Lavou-se depois com PBS e extraiu-se o corante com 100 µL de uma mistura de etanol: ácido acético: água (50:1:49). Procedeu-se, por fim, à leitura da absorvância a 540 nm num espectrofotómetro (Multiscan Ascent, LabSystems, Helsínquia, Finlândia).

### **2.6.6. Ensaio do cometa em condições alcalinas**

O ensaio do cometa realizou-se de acordo com o descrito em *Tice et al* (2000). A preparação das soluções, lâminas e microgel encontram-se no Anexo I.

Procedeu-se à inoculação de  $5 \times 10^5$  células em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e incubaram-se durante 24 horas a 37°C com 5%CO<sub>2</sub>, para que as células se encontrassem na fase exponencial de crescimento na altura do ensaio.

Vinte e quatro horas após a inoculação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS e tripsinizadas para se destacarem da superfície de crescimento. Uma vez em suspensão, adicionou-se 4,5 mL de meio de cultura. Após ressuspensão, as células

foram centrifugadas (301 x g, 5min). Ressuspenderam-se novamente em 10 mL de meio de cultura.

Seguiu-se o tratamento das células com as soluções a testar. O tempo de exposição foi sempre de 24 horas. As concentrações de 6- Cl-BaP (13) e BaP (3) testadas foram de 0,1  $\mu\text{M}$  a 125  $\mu\text{M}$  (descritas em 2.6.3.). Como controlo positivo, utilizou-se o EMS (20 mM), durante uma hora.

Terminado o tempo de exposição, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura. Posteriormente centrifugaram-se as células (301 x g, 5 min), desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensado em 1,2 mL de meio de cultura. Testou-se a viabilidade celular (com azul de tripano) e procedeu-se a uma diluição de  $7 \times 10^4$  células em PBS. As células foram novamente centrifugadas (301xg, 10 min) e o pellet foi ressuspensado em 80  $\mu\text{L}$  de gel de agarose de baixo ponto de fusão (0,7%) que foi utilizado para preparar dois microgéis sobre as lâminas previamente revestidas com agarose (1%).

Para preparação do microgel depositaram-se 40  $\mu\text{L}$  de suspensão celular em gel sobre a lâmina e rapidamente colocou-se uma lamela quadrada e deixou-se no frigorífico durante 10 minutos. A lamela foi retirada e as lâminas foram mergulhadas na solução de lise durante, pelo menos, 1 hora.

Seguidamente as lâminas foram sujeitas a tratamento alcalino (20 min, 4°C) e findo esse tempo, efectuou-se a electroforese em condições alcalinas a 25 V durante 20 minutos a 4°C. As lâminas foram em seguida lavadas com tampão de neutralização, 3 vezes, durante 5 minutos. Por fim removeu-se o tampão e adicionaram-se 16  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (0,125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e colocou-se uma lamela sobre o gel. As lâminas foram guardadas em caixa fechada com atmosfera húmida envolvida em folha de alumínio durante a noite.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Axioplan, Zeiss) por um programa apropriado Comet Imager 1.2.12 (MetaSystems, GmbH) a uma ampliação 200x e com filtro de emissão no vermelho.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Preparação e caracterização de padrões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados

#### 3.1.1. Preparação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos clorados

O objectivo inicial do trabalho envolveu na preparação de padrões de derivados clorados de HAP. O 6-Cl-BaP (13) foi inicialmente preparado pelo método descrito por Mulder *et al.* (1993), que envolve a reacção do BaP (3) com dicloreto de cobre em tetracloreto de carbono (2.3.2. Método geral B).

Uma vez que o hipoclorito de sódio é um dos reagentes utilizados no tratamento de água para consumo humano para eliminar HAPs (Shiraishi *et al.*, 1985), desenvolveu-se um método de síntese, que recorre a este agente de cloração, utilizando um sistema bifásico de água e *n*-hexano, em meio ácido na presença de um catalisador de transferência de fase (Aliquat 336) (2.3.1. Método geral A.).

Estudos recentes apresentam outras formas de síntese de derivados clorados em condições semelhantes às utilizadas nas ETA's. Nakamura *et al.* (2007), por exemplo, descreve um método em que sintetiza derivados halogenados de HAPs em metanol através do uso de soluções de hipoclorito de sódio como agente de cloração. Esta metodologia foi aplicada a HAPs como o pireno, fluoreno, 9-fluorenona e fluoranteno, contudo não é exequível para HAPs insolúveis ou pouco solúveis em metanol, como o BaP (3), pois implicaria a utilização de soluções muito diluídas dificultando o processo de purificação. Neste contexto, o sistema bifásico surge como uma boa alternativa de síntese pois permite testar as condições de tratamento de água para consumo na presença de um solvente adequado aos HAPs a testar, utilizando pequenas quantidades de solvente.

Neste sistema de duas fases, a síntese implicou a utilização de um catalisador de transferência de fase, permitindo que o produto formado na fase aquosa fosse transferido para a fase orgânica. O sal de transferência de fase é normalmente utilizado para transferir aniões inorgânicos para a fase orgânica (Starks *et al.*, 1994). Estudos

indicam que a presença de sais de amónio quaternários consegue transferir o hipoclorito de sódio para a fase orgânica (Lee *et al*, 1976).

Estudos preliminares evidenciam que a reacção para a preparação de padrões de HAPs não ocorria em pH neutro. De acordo com Oyler *et al* (1978), na ausência de pH ácido, a reacção não ocorre uma vez que o ácido hipocloroso não se encontra em concentrações significativas necessárias para que haja formação de derivados clorados de HAPs.

Assim as condições de síntese foram definidas de forma a favorecer a formação de derivados clorados (pH ácido). Segundo Oyler *et al* (1982), pH superiores a 6 induzem ao aparecimento de derivados oxigenados e pH inferiores favorecem a formação de derivados oxigenados e clorados.

Embora se tenha obtido o 6-Cl-BaP (13) por ambos os métodos, o método desenvolvido tem a vantagem de possibilitar a preparação do produto com um elevado grau de pureza e com um rendimento elevado de forma rápida evitando o uso de solventes carcinogénicos como o tetracloreto de carbono.

As misturas reaccionais foram analisadas por cromatografia de camada fina (TLC), com eluição por *n*-hexano, e por RLC. Na reacção de cloração efectuada com hipoclorito de sódio, o cromatograma obtido após 10 minutos de reacção mostra a ausência do sinal correspondente ao material de partida ( $t_r = 6\text{min}$ ) e mostra um produto maioritário ( $t_r = 10\text{min}$ ) correspondente ao 6-Cl-BaP (13). Este produto foi isolado por RLC semi-preparativo com um rendimento de 96%. A pureza do produto isolado (96%) foi calculada por RLC com base nas áreas de integração dos picos do cromatograma.

A análise e purificação da mistura reaccional após a reacção do BaP (3) com o dicloreto de cobre foi efectuada de forma análoga ao descrito anteriormente tendo o 6-Cl-BaP (13) sido obtido com um rendimento de 82% e um grau de pureza de 70%.

Testou-se a aplicação destes dois métodos, com dicloreto de cobre e com hipoclorito de sódio, para a cloração do BbF (1) e o BkF (2). No entanto, em qualquer dos casos, não se detectou quer por RLC quer por TLC a formação de qualquer produto de reacção. No caso do método de cloração com hipoclorito de sódio, a reacção foi monitorizada durante três dias. Após este tempo de reacção apenas se observaram no cromatograma sinais correspondentes a produtos de degradação do material de partida.

Estudos realizados parecem indicar que o BbF (1) apresenta uma estabilidade elevada face a alguns HAPs, nomeadamente o BaP (3). No mesmo estudo, discute-se o facto do BkF (2) também possuir uma elevada estabilidade (Aubin *et al*, 2000). Embora

as condições analisadas por este autor sejam diferentes das apresentadas neste estudo, a estabilidade dos compostos referidos pode ser o principal responsável pela ausência de reacção.

### 3.1.2. Caracterização do 6-cloro-benzo[a]pireno e estudos de estabilidade

Evidências para a formação do 6-Cl-BaP (13) (Figura 3.1) foram inicialmente obtidas por  $^1\text{H-NMR}$  (Figura 3.2.B). O espectro obtido apresenta, relativamente ao espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do BaP (3) (Figura 3.2.A), a ausência do singuleto (8,82 ppm) correspondente ao protão da posição 6 e o desvio para campo mais baixo dos sinais correspondentes a H7 e H5.

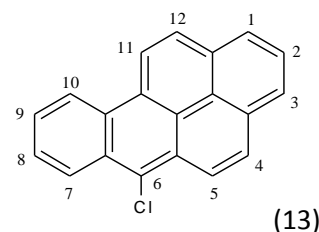


Figura 3. 1 – Estrutura do 6-Cl-BaP.

Estas observações são inteiramente consistentes com a presença de um átomo de cloro na posição 6 do anel aromático policíclico. A atribuição dos sinais de  $^1\text{H-NMR}$  foi efectuada tendo como base as correlações observadas no espectro bidimensional de correlação homonuclear H-H (COSY).

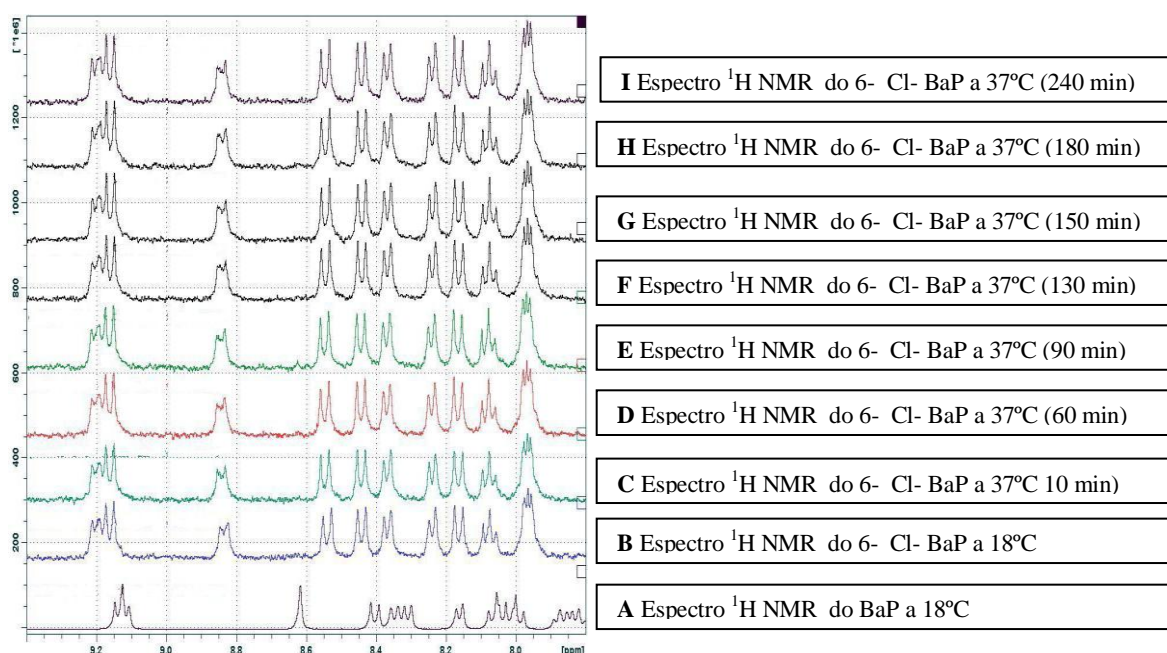


Figura 3. 2. – Espectro  $^1\text{H-NMR}$  do BaP e 6-Cl-BaP.

A presença de cloro na molécula é ainda confirmada por espectrometria de massa, uma vez que o espectro obtido por impacto electrónico apresenta um íão

molecular  $m/z$  286 e um pico com um terço da intensidade do ião molecular a  $m/z$  288, característico do  $^{37}\text{Cl}$ -BaP. O espectro de massa apresenta ainda um pico a  $m/z$  250 correspondente à perda de HCl a partir do ião molecular.

Para o estudo da estabilidade térmica por  $^1\text{H-NMR}$ , preparou-se uma solução de 6-Cl-BaP (13) em acetonitrilo deuterado e adquiriram-se espectros a  $37^\circ\text{C}$  de dez em dez minutos, durante quatro horas (Figura 3.2.C-I). Tal como pode ser observado na figura, nas condições da experiência, não são observadas mudanças efectivas na estrutura do composto, uma vez que não se observa o aparecimento de qualquer sinal novo e os valores de desvios e integração dos sinais não sofrem qualquer alteração ao longo da experiência. Verificam-se apenas pequenas variações na forma de alguns sinais (nomeadamente o sinal correspondente ao protão H7) sugerindo alguma alteração conformacional ou electrónica.

Os estudos realizados a  $18^\circ\text{C}$  e seguidos por RLC-FLD durante 8 horas não evidenciaram qualquer variação das áreas de integração (Figura 3.3) permitindo verificar que a estabilidade do composto não é colocada em causa a esta temperatura.

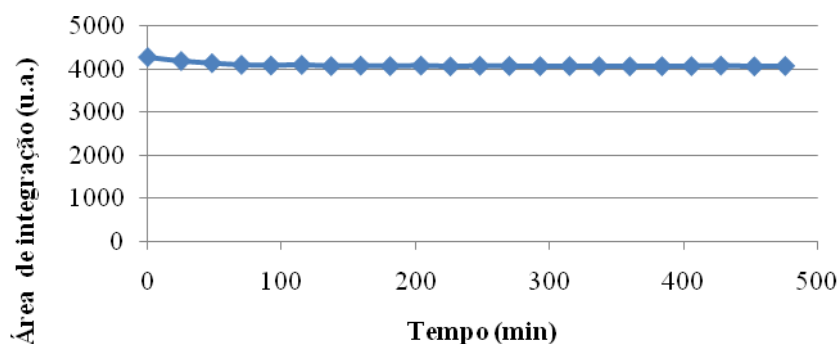


Figura 3. 3. – Estudo da estabilidade térmica do 6-Cl-BaP a  $18^\circ\text{C}$  ao longo de 8 horas, por RLC-FLD ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$  nm ;  $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm).

A estabilidade térmica também foi estudada por GC/MS e RLC-FLD a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas, em acetato de etilo e acetonitrilo, respectivamente. Verificou-se uma elevada variação das áreas de integração obtidas por RLC-FLD (Figura 3.4), o que sugere a presença de uma espécie química que se converte, novamente, no 6-Cl-BaP (13). O estudo realizado por GC/MS não revelou alterações nas áreas de integração

significativas (Figura 3.5). Observou-se apenas um ligeiro aumento das áreas de integração, muito possivelmente causado pela evaporação do solvente durante a análise.

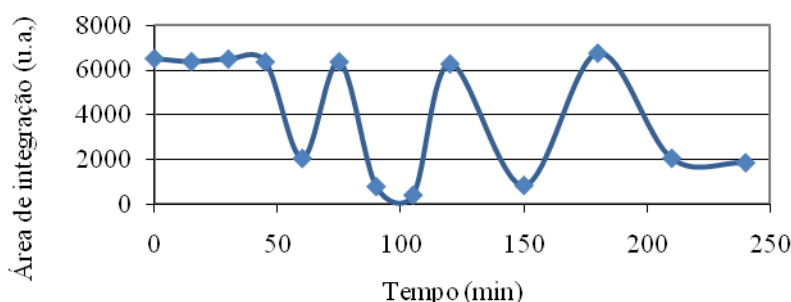


Figura 3. 4. - Estudo da estabilidade térmica do 6-Cl-BaP, em acetonitrilo, a 37°C ao longo de 4 horas, por RLC-FLD ( $\lambda_{\text{excitação}}=295 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{emissão}}=440 \text{ nm}$ ).

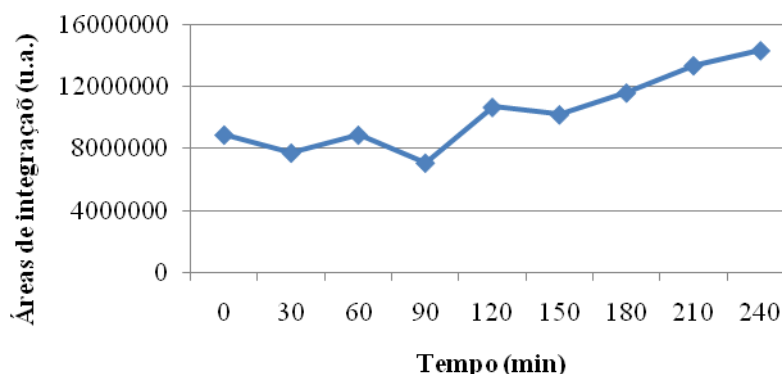


Figura 3. 5. – Estudo da estabilidade térmica do 6-CL-BaP, em acetato de etilo, a 37°C ao longo de 4 horas, por GC/MS.

Embora inicialmente pareçam discordantes, estas análises parecem sugerir a existência de uma espécie química desconhecida em soluções de 6-Cl-BaP (13), a 37°C. Perante a hipótese de modificações conformacionais ou electrónicas do 6-Cl-BaP (13), pode supor-se que as alterações induzidas pela temperatura não permitam a detecção da espécie formada nos comprimentos de onda analisados. Assim, é compreensível que a concentração de 6-Cl-BaP (13) diminua e logo de seguida aumente. Nas análises por GC/MS não se observam grandes variações das áreas de integração, pois não é possível a detecção desta espécie pois deverá manter a mesma massa molecular.

Novos estudos terão que ser realizados, de forma a concluir qual o tipo de alteração envolvido nestas experiências, conformacional, electrónica ou outro.

## **3.2. Validação da metodologia SPE-RLC-FLD para quantificação do 6-cloro-benzo[a]pireno em águas destinadas ao consumo humano**

### **3.2.1. Estudo da linearidade**

Para validar a metodologia SPE-RLC-FLD efectuou-se em primeiro lugar o estudo de linearidade através da injeção directa de soluções aquosas de 6-Cl-BaP (13) em acetonitrilo no sistema RLC-FLD. Esta técnica foi seleccionada em vez do sistema GC/MS porque se encontra melhor descrita na literatura. (Titato et al, 2006; Cardoso et al, 2000)

A linearidade foi estudada de acordo com o descrito pela norma ISO 8466-1 e guia RELACRE 13 que definem a forma como a avaliação dos métodos analíticos deve ser conduzido para assegurar um controlo eficaz da qualidade da água. Este estudo permite obter a recta de calibração que melhor satisfaz todos os pontos da recta e verificar a sua linearidade para dois comprimentos de onda de emissão, 420 e 440 nm ( $\lambda_{\text{excitação}}=295$  nm) definidos no FLD.

Inicialmente efectuou-se o estudo da gama de trabalho, seguindo-se a verificação da linearidade das rectas através do cálculo da razão entre a diferença de variâncias da regressão de primeira e segunda ordem e o erro padrão da função de calibração de segunda ordem (razão PG). Calculou-se ainda a sensibilidade do método analítico e os critérios de aceitação da curva de calibração, nomeadamente o desvio padrão do método e o coeficiente de variação (CV). Considerou-se que as rectas de calibração são aceitáveis para CV inferior a 15%.

Os dados das áreas das várias soluções de 6-Cl-BaP (13) analisadas por RLC-FLD (sinal a 17,5 minutos), encontram-se na Tabela 3.1. e 3.2. para  $\lambda_{\text{emissão}}=420$ nm e 440nm, respectivamente. As soluções padrão de calibração dos extremos, 1 e 10  $\mu\text{g/L}$  respectivamente, apresentam valores médios porque englobam as áreas de integração das soluções preparadas para o estudo da gama de trabalho.

Tabela 3.1.– Áreas de integração do 6-Cl-BaP  
( $\lambda_{\text{excitação}}=295$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm).

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Área 6-Cl-BaP
SPCAL1	1	25,92*
SPCAL2	2	42,68
SPCAL3	3	72,41
SPCAL4	4	97,68
SPCAL5	5	121,84
SPCAL6	6	134,15
SPCAL7	7	146,07
SPCAL8	8	184,91
SPCAL9	9	222,82
SPCAL10	10	247,79*

\*áreas médias

Tabela 3.2. – Áreas de integração do 6- Cl-BaP  
( $\lambda_{\text{excitação}}=295$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm).

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Área 6-Cl-BaP
SPCAL1	1	16,84*
SPCAL2	2	29,18
SPCAL3	3	47,81
SPCAL4	4	64,91
SPCAL5	5	78,58
SPCAL6	6	89,13
SPCAL7	7	102,01
SPCAL8	8	124,93
SPCAL9	9	147,36
SPCAL10	10	166,58*

\*áreas médias

### ➤ Estudo da gama de trabalho

Para o estudo da gama de trabalho analisaram-se 11 soluções com concentração de 1  $\mu\text{g/L}$  e de 10  $\mu\text{g/L}$ . Os resultados das áreas de integração (Tabela 3.3. e 3.4.) foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o teste de homogeneidade de variâncias, o teste F (Tabela 3.5 e 3.6.). Para o comprimento de onda de emissão 420 nm, foram utilizados apenas nove dos onze pontos obtidos pois foi necessário rejeitar dois pontos para que a gama de trabalho fosse considerada correcta, de acordo com os critérios da norma ISO 8466-1.

Tabela 3.3.- Áreas de integração dos picos obtidos para as soluções de 6-Cl-BaP, nos pontos extremos da curva de calibração, 1 e 10 µg/L ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm) (n=9).

Área 6-Cl-BaP	
SPCAL1 (1µg/L)	SPCAL10 (10 µg/L)
25,23	248,02
25,73	247,34
28,93	245,81
27,47	247,21
25,86	244,34
28,34	251,62
27,20	248,65
21,72	245,74
23,47	249,22

Tabela 3.4.- Áreas de integração dos picos obtidos para as soluções de 6-Cl-BaP, nos pontos extremos da curva de calibração, 1 e 10 µg/L ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm) (n=11).

Área 6-Cl-BaP	
SPCAL1 (1µg/L)	SPCAL10 (10 µg/L)
19,34	172,42
15,94	160,97
16,93	165,54
15,48	165,24
19,44	165,95
19,15	167,52
17,23	164,43
14,76	168,44
15,68	167,07
14,75	164,65
16,51	170,18

O teste de homogeneidade de variâncias (Tabela 3.5 e 3.6.) aplicado aos pontos extremos da curva de calibração permite verificar, com uma confiança de 99%, se a gama de trabalho escolhida é a mais indicada para o estudo de linearidade em ambos os comprimentos de onda definidos inicialmente.

Tabela 3.5. – Tratamento estatístico do teste F para os pontos extremos da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm).

	SPCAL 1	SPCAL 10
<b>Média</b>	25,99	247,55
<b>Variância</b>	5,35	4,70
<b>Observações (n)</b>	9,00	9,00
<b>Graus de liberdade</b>	8,00	8,00
<b>F</b>		1,14
<b>P(F&lt;=f) uni-caudal</b>		0,43
<b>F crítico uni-caudal</b>		3,44

Tabela 3.6. – Tratamento estatístico do teste F para os pontos extremos da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$ nm).

	SPCAL 1	SPCAL 10
<b>Média</b>	16,84	166,58
<b>Variância</b>	3,13	9,47
<b>Observações (n)</b>	11,00	11,00
<b>Graus de liberdade</b>	10,00	10,00
<b>F</b>		0,33
<b>P(F&lt;=f) uni-caudal</b>		0,048
<b>F crítico uni-caudal</b>		0,34

Após o tratamento estatístico para ambos os comprimentos de onda verificou-se que a gama de trabalho definida é correcta pois  $F < F_{\text{crítico}}$  ( $\lambda_{\text{emissão}}=420\text{nm}: 1,14 < 3,44$ ;  $\lambda_{\text{emissão}}=440\text{nm}: 0,33 < 0,34$ ). Como a gama de trabalho escolhida é indicada para este estudo, procedeu-se à avaliação da linearidade.

### ➤ Cálculo de PG, sensibilidade e coeficiente de variação

Para verificar a linearidade, calcularam-se as curvas de calibração de primeira e segunda ordem e verificou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de cada uma através da obtenção dos dados estatísticos de regressão. As curvas de calibração de primeira ordem para  $\lambda_{\text{emissão}}=420$  e  $440$  nm estão apresentadas nos gráficos seguintes (Figura 3.6 e 3.7). As curvas de calibração são acompanhadas das linhas de tendência e equações que melhor descrevem os resultados obtidos.

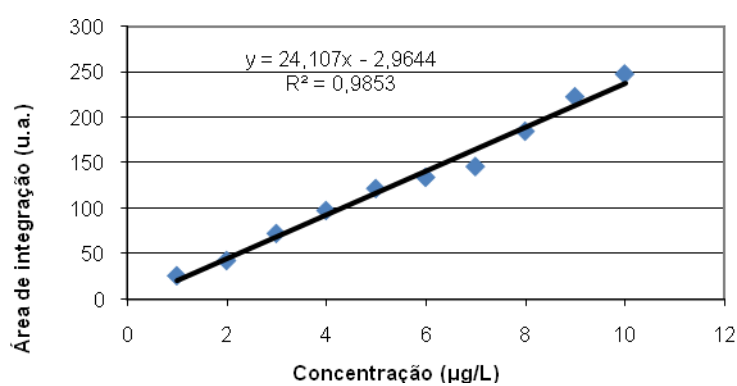


Figura 3. 6.–Curva de calibração linear e respectiva linha de tendência ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm).

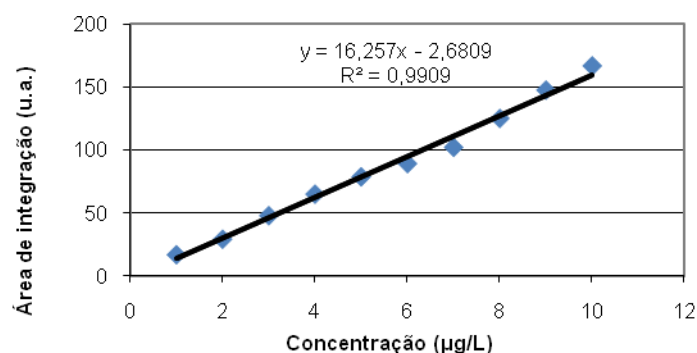


Figura 3. 7.–Curva de calibração linear e respectiva linha de tendência ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm).

A estatística de regressão realizada engloba o cálculo de  $R^2$  e dos desvios padrão de primeira ordem ( $s_{y1}$ ) das curvas de calibração obtidas a  $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm e  $440$  nm (Tabelas 3.7. e 3.8, respectivamente). O desvio padrão de segunda ordem ( $s_{y2}$ ) das curvas de calibração obtidas para o  $\lambda=420$  nm e  $440$  nm são apresentados nas Tabelas 3.9 e 3.10.

Tabela 3.7.– Dados de estatística de regressão de primeira ordem dos 10 pontos experimentais analisados a 420 nm.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9926
Quadrado de R	0,9853
Quadrado de R ajustado	0,9835
Erro-padrão ( $s_{y1}$ )	9,4387
Observações (n)	10,0000
n- número de pontos	

Tabela 3.8. - Dados de estatística de regressão de primeira ordem dos 10 pontos experimentais analisados a 440 nm.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9954
Quadrado de R	0,9909
Quadrado de R ajustado	0,9897
Erro-padrão ( $s_{y1}$ )	5,0147
Observações (n)	10,0000
n-número de pontos	

Tabela 3. 9.– Dados da estatística de regressão de segunda ordem dos 10 pontos analisados a 420 nm.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9946
Quadrado de R	0,9893
Quadrado de R ajustado	0,9863
Erro-padrão ( $s_{y2}$ )	8,6145
Observações	10,0000
n-número de pontos	

Tabela 3. 10. – Dados da estatística de regressão de segunda ordem dos 10 pontos analisados a 440 nm.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9975
Quadrado de R	0,9950
Quadrado de R ajustado	0,9935
Erro-padrão ( $s_{y2}$ )	3,9775
Observações	10,0000
n- número de pontos	

Os erros padrão obtidos permitiram o cálculo da diferença de variâncias ( $DS^2=(N-2)s_{y1}^2 - (N-3) s_{y2}^2$ ). Com este valor determinou-se PG e comparou-se com o valor de F crítico (F com significância a 99%). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.11.

Tabela 3. 11.- Tratamento estatístico do estudo de linearidade para ambos os comprimentos de onda.

Parâmetros estatísticos	420 nm	440 nm
Diferença de variâncias ( $DS^2$ )	193,24	90,43
PG	2,60	5,72
F crítico	12,25	13,75

Os parâmetros avaliados permitem concluir que a função de calibração é linear para ambos os comprimentos de onda definidos porque  $PG < F_{crítico}$ , com um intervalo de confiança de 99% nos dois casos apresentados.

A sensibilidade, desvio padrão e coeficiente de variação da metodologia adotada foram avaliados para os dois comprimentos de onda utilizados (tabelas 3.12 e 3.13).

Tabela 3.12. – Estudo da sensibilidade do método e critérios de aceitação da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm).

Parâmetros	Valor
Sensibilidade (m)	24,09
Desvio padrão do método	0,39
Coefficiente de variação (%)	7,12

Tabela 3.13. – Estudo da sensibilidade do método e critérios de aceitação da curva de calibração ( $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm).

Parâmetros	Valor
Sensibilidade (m)	16,26
Desvio padrão do método	0,31
Coefficiente de variação (%)	5,61

Os dados obtidos para a sensibilidade do método são obtidos pelo declive da recta de calibração e os critérios de avaliação da curva de calibração são analisados pelo desvio padrão do método e coeficiente de variação, que avaliam a sua performance. Estes resultados evidenciam que a metodologia escolhida apresenta uma sensibilidade superior para  $\lambda_{\text{emissão}}=420$  nm, mas uma precisão superior para  $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm, comprovado por um coeficiente de variação inferior, apesar de aceitável ( $CV < 15\%$ ) para ambos os comprimentos de onda.

As análises para a determinação da percentagem de recuperação, limites de detecção e de quantificação foram realizadas apenas a  $\lambda_{\text{emissão}}=440$  nm porque se considerou que a este comprimento de onda a sensibilidade do método de quantificação é adequada, a precisão é superior, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da recta de calibração é maior e porque a validação da gama de trabalho foi efectuada para um maior número de pontos.

Validada a metodologia adoptada, pelo estudo da linearidade e gama de trabalho, procedeu-se à determinação das percentagens de recuperação, limite de detecção e de quantificação pelo procedimento SPE-RLC-FLD.

### 3.2.2. Determinação das percentagens de recuperação, limite de detecção e de quantificação da metodologia SPE-RLC-FLD

Para determinar a percentagem de recuperação do método utilizaram-se apenas 10 dos 12 resultados obtidos após análise das soluções aquosas de 6-Cl-BaP (13) com concentração de 0,01  $\mu\text{g/L}$ . Este valor foi escolhido para que a concentração final ( $C_f$ ) (2,5  $\mu\text{g/L}$ ) fizesse parte da recta de calibração. As áreas de integração dos sinais

cromatográficos foram convertidas em concentrações pela recta de calibração obtida anteriormente. Esses dados encontram-se na Tabela 3.14.

Constam desta tabela a concentração final média ( $C_m$ ), a percentagem de recuperação do método ( $\%R_m$ ), o desvio padrão da concentração ( $s C_m$ ) e o coeficiente de variação (CV).

Tabela 3.14.- Cálculo da percentagem de recuperação média do método ( $\%R_m$ ) e coeficiente de variação (CV).

Amostra	$C_f$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$C_m$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$\%R$	$\%R_m$	$s C_m$	CV(%)
1.1	1,7514		70,1			
1.2	1,6891		67,6			
1.3	2,4735		98,9			
1.4	2,1261		85,0			
1.5	2,2494		90,0			
1.6	2,3301	2,1091	93,2	84,4	0,25991	12,3
1.7	1,9204		76,8			
1.8	2,1409		85,6			
1.9	2,0520		82,1			
1.10	2,3584		94,3			

A percentagem de recuperação do método foi de 84,4% e o coeficiente de variação foi de 12,3%. A elevada recuperação do derivado clorado deve-se possivelmente à baixa solubilidade em água e alta hidrofobicidade do composto, que deverá ser semelhante ao BaP (3), do qual deriva. O coeficiente de variação obtido inferior a 15%, permite assegurar o cálculo da percentagem de recuperação com uma boa precisão.

Para o cálculo do limite de detecção, a concentração de 6-Cl-BaP (13) na água escolhida foi de 0,0014  $\mu\text{g/L}$ . Este valor corresponde a 0,295  $\mu\text{g/L}$ <sup>1</sup> de concentração final ( $C_f$ ), o que equivale aproximadamente um terço do limite de quantificação teórico (1  $\mu\text{g/L}$ ) que deve corresponder ao extremo inferior da recta de calibração. Para este procedimento foram analisadas 12 soluções preparadas por dois operadores diferentes em dois dias consecutivos. As áreas de integração das amostras foram convertidas em concentrações pela recta de calibração. Com base na concentração final realizaram-se os cálculos do desvio padrão da concentração ( $sC_f$ ), limite de detecção (LDM) e de

<sup>1</sup> Valor calculado com base na concentração de 6-Cl-BaP em água e o valor da percentagem de recuperação (84,4%).

quantificação (LQM) da metodologia e coeficiente de variação. Os resultados encontram-se na tabela 3.15.

Tabela 3. 15. – Limite de detecção (LDM) e quantificação (LQM) da metodologia SPE-RLC-FLD.

Amostra	$C_f$ (µg/L)	$C_m$ (µg/L)	$s C_m$	LD* (µg/L)	LDM** (µg/L)	LQ° (µg/L)	LQM°° (µg/L)	CV (%)
1.1	0,5436							
1.2	0,6012							
1.3	0,4846							
1.4	0,5924							
1.5	0,5012							
1.6	0,5028							
1.7	0,5472	0,5320	0,0454	0,6818	0,0032	2,0454	0,0097	8,5
1.8	0,5375							
1.9	0,4729							
1.10	0,4890							
1.11	0,5965							
1.12	0,5146							

$$*LD=C_m+(3,3 \times sC_m)$$

$$**LDM=(LD/250)/0,844$$

$$°LQ=3xLD$$

$$°°LQM=(LQ/250)/0,844$$

Aplicada toda a metodologia SPE-RLC-FLD, o limite de detecção e quantificação obtidos foram 0,0032 µg/L e 0,0097 µg/L. O coeficiente de variação, inferior a 25%, indica uma boa precisão do método associada a este método.

Para testar o limite de quantificação da metodologia analítica processaram-se soluções aquosas com concentração de 0,0045 µg/L. Analisaram-se os resultados obtidos experimentalmente e calcularam-se as percentagens de erro, desvio padrão da concentração e coeficiente de variação. Os resultados estão na Tabela 3.16.

Tabela 3. 16. – Cálculo da percentagem de erro e coeficiente de variação para testar o limite de quantificação.

Amostras	C <sub>obtida</sub> (µg/L)	C <sub>m</sub> (µg/L)	C <sub>água</sub> (µg/L)	%E	%E <sub>m</sub>	s C <sub>m</sub>	CV (%)
1.1	0,00411		0,00452	9,00			
1.2	0,00446		0,00452	1,35			
1.3	0,00475		0,00452	5,10			
1.4	0,00443		0,00452	1,99			
1.5	0,00444		0,00452	1,87			
1.6	0,00459	0,00446	0,00452	1,50	3,0	0,00016	3,7
1.7	0,00465		0,00452	2,94			
1.8	0,00456		0,00452	0,83			
1.9	0,00443		0,00452	2,08			
1.10	0,00445		0,00452	1,60			
1.11	0,00435		0,00452	3,81			
1.12	0,00434		0,00452	3,92			

A baixa percentagem de erro (%E<sub>m</sub><15%) e o coeficiente de variação inferior a 15% (Tabela 3.16) são indicadores de que o limite de quantificação foi correctamente determinado.

Os limites de detecção e de quantificação também foram calculados utilizando os resultados da recta de calibração. Os resultados são apresentados na Tabela 3. 17.

Tabela 3. 17. – Limite de detecção e quantificação do método (LDM e LQM), obtidos pela recta de calibração.

LD* (µg/L)	LDM ** (µg/L)	LQ <sup>o</sup> (µg/L)	LQM <sup>oo</sup> (µg/L)
1,0177	0,0048	3,0532	0,0145

\*LD=(3,3 x s<sub>y</sub>) / m ; s<sub>y</sub> - desvio padrão residual, m- declive da recta de calibração

\*\*LDM= (LD/250)/0,844

<sup>o</sup>LQ=3xLD

<sup>oo</sup>LQM=(LQ/250)/0,844

Os limites de detecção e quantificação obtidos pela recta de calibração foram 0,0048 e 0,0145 µg/L enquanto utilizando toda a metodologia os valores foram mais baixos (0,0032 e 0,0097 µg/L, respectivamente). Privilegiam-se os valores obtidos quando todo o método é utilizado porque apresenta dados mais rigorosos, uma vez que englobam os erros originados em todos os passos da metodologia.

O limite de detecção desta metodologia permite a determinação deste derivado clorado em valores equivalentes aos definidos para o BaP nas legislações nacional (Decreto-Lei nº306/2007) e internacional (Directiva 98/83/EC).

Comparando esta metodologia com metodologias equivalentes para a quantificação do BaP em águas para consumo verifica-se que a recuperação (superior a 80%) e os limites de detecção são muito semelhantes (na ordem dos nanogramas por litro) (Garcia-Falcon *et al*, 2004; Martinez *et al*, 2004).

### **3.3. Caracterização da potencial actividade genotóxica de 6-cloro-benzo[a]pireno**

Para avaliar o potencial genotóxico do 6-Cl-BaP (13), comparativamente ao BaP (3), realizou-se o teste do cometa em células metabolicamente competentes, as células HepG2. A citotoxicidade das concentrações testadas de ambos os compostos foi igualmente determinada.

A selecção das células HepG2 para este estudo, deve-se ao facto de serem células humanas e de reterem alguma actividade metabólica dos hepatócitos dos quais derivam. Assim, deixa de ser essencial introduzir um sistema exógeno de activação metabólica, por exemplo a fracção S9 obtida a partir de um homogenado de fígado de roedores, como é descrito na literatura para outros ensaios (Colmsjo *et al* 1984; Lofroth *et al*, 1984). Estudos recentes, referem que estas células são indicadas para testar pró-mutagénicos, isto é, compostos que necessitam de ser metabolizados para revelarem o seu potencial mutagénico, como é o caso do BaP (3) (Knasmuller *et al*, 1998; Uhl *et al*, 1999,2000; Valentin-Severin *et al*, 2004).

As soluções de BaP (3) foram preparadas em DMSO porque estudos indicam que a utilização deste solvente não afecta a viabilidade celular, desde que a sua concentração não seja superior a 1% (Uhl *et al*, 1999,2000; Valentin-Severin *et al*, 2004). O solvente escolhido para a preparação das soluções de 6-Cl-BaP foi o acetonitrilo, pois todos os estudos anteriores deste trabalho foram realizados com este solvente.

#### **3.3.1. Testes de citotoxicidade**

A determinação do efeito citotóxico dos compostos em estudo e dos respectivos solventes (controlos negativos), para além de fornecer dados sobre a toxicidade dos

mesmos, permite também evitar falsos positivos no ensaio do cometa, pois podem aparecer cometas gerados por apoptose e não pelos efeitos genotóxicos do composto testado (Tice *et al*, 2000).

A avaliação da actividade citotóxica do 6-Cl-BaP (13) e do BaP (3) foi realizada através do teste do vermelho neutro (*Neutral Red*). As concentrações testadas variaram entre 0,1  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$  e o tempo de exposição escolhido foi de 24 horas. O controlo positivo seleccionado foi o etilmetanosulfonato (EMS), ao qual as células foram expostas durante apenas 1 hora.

Para determinação da citotoxicidade do 6-Cl-BaP (13) e do BaP (3), calculou-se a média e desvio padrão das três réplicas efectuadas por concentração e determinou-se a viabilidade celular relativamente à do respectivo solvente, em percentagem, cuja representação gráfica se apresenta na Figura 3.8. Por sua vez, a viabilidade dos solventes foi calculada em relação à de uma cultura não tratada (controlo negativo). Obteve-se uma viabilidade relativa de 78% e 72% para os solventes acetonitrilo e DMSO, respectivamente. A redução da viabilidade celular provocada pelos solventes utilizados evidencia que o efeito dos solventes no ensaio do cometa não pode ser desprezado. Contudo, a proximidade da viabilidade relativa obtida para ambos indica que a influência dos solventes na avaliação do efeito genotóxico do 6-Cl-BaP (13) e do BaP (3) será semelhante.

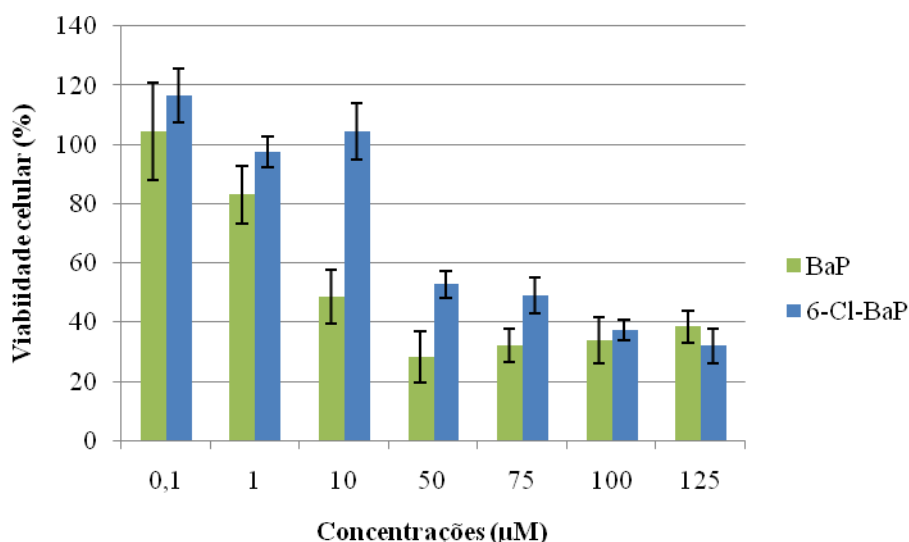


Figura 3.8. – Viabilidade celular expressa como valor médio ( $\pm$  desvio padrão) em função das concentrações de BaP e 6-Cl-BaP testadas, relativamente à viabilidade celular determinada para os respectivos controlos negativos.

No que diz respeito ao composto em estudo, o 6-Cl-BaP (13), observa-se um marcado decréscimo da viabilidade celular a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$  (< 60%), sendo que o tratamento das células com concentrações superiores a 50  $\mu\text{M}$  causou uma redução progressiva da viabilidade até valores correspondentes a, aproximadamente, 30% da viabilidade do solvente. Por sua vez, o tratamento com BaP (3) causou uma redução da viabilidade celular logo a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  sendo, no entanto, mais marcada a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

A comparação entre os dados obtidos para concentrações equimolares de ambos os compostos evidencia que o 6-Cl-BaP (13) é, para a generalidade das concentrações testadas, menos citotóxico que o BaP (3) (excepto para a concentração de 125  $\mu\text{M}$ ). A análise estatística dos resultados (teste *t* de Student) indica que, de facto, apenas para as concentrações de 10, 50 e 75  $\mu\text{M}$ , o valor da viabilidade celular é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre os dois, sendo que as duas concentrações mais elevadas induzem reduções semelhantes da viabilidade celular.

No seu conjunto, os resultados da citotoxicidade mostraram que, dentro da gama de concentrações testadas, o 6-Cl-BaP (13) é menos citotóxico que o BaP (3), à excepção das duas concentrações mais elevadas, as quais têm um efeito citotóxico muito semelhante.

### 3.3.2. Ensaio do cometa em condições alcalinas

Para avaliar a genotoxicidade do 6-Cl-BaP (13), seleccionou-se o ensaio do cometa que permite a detecção de quebras de cadeia simples e dupla de DNA e locais alcali-lábeis. Além disso é um método simples, rápido e altamente específico e sensível (Tice *et al*, 2000). Os parâmetros analisados foram percentagem de DNA na cauda, comprimento da cauda (tail length), momento da cauda (tail moment) e momento da cauda “Olive” (Olive tail moment). De entre estes, a percentagem de DNA na cauda é o que permite avaliar de forma mais directa e linear a percentagem de lesões induzidas no DNA pelo agente a testar.

As primeiras concentrações de 6-Cl-BaP (13) a ser testadas foram 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  para que fossem próximas do limite de quantificação do 6-Cl-BaP (13) obtido anteriormente para águas de consumo humano, através da metodologia SPE-RLC-FLD.

Nesta gama de concentrações, nem o BaP (3) nem o seu derivado clorado apresentaram qualquer indução da migração do DNA após tratamento das células

HepG2 durante 24h, comparativamente aos respectivos controlos dos solventes. Por este motivo, serão apenas apresentados os resultados das concentrações mais elevadas. Os resultados negativos obtidos para as concentrações referidas de BaP (3) (0,1 – 10  $\mu\text{M}$ ) estão concordantes com os descritos na literatura, pois alguns estudos referem que apenas para concentrações superiores a 25  $\mu\text{M}$  se manifestam os efeitos genotóxicos deste composto, em células HepG2 (Uhl *et al*, 1999; 2000).

A média da percentagem de DNA presente na cauda dos cometas analisados após a exposição a várias concentrações dos dois compostos (100 cometas por tratamento), encontra-se descrita na Tabela 3.18. O teste estatístico aplicado para a análise dos dados foi o teste *t* de Student, quer para verificar a significância dos resultados dos tratamentos relativamente aos controlos, quer para comparar os dados de concentrações equimolares de 6-Cl-BaP e BaP (Tabela 3.18)

Tabela 3. 18. – Resultados do ensaio do cometa (valor médio da percentagem de DNA na cauda) e da análise estatística dos dados (teste *t* de Student).

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Percentagem de DNA na cauda (%)			$p^{\Delta}$	$p^{\blacktriangle}$
		1ª experiência	2ª experiência	3ª experiência		
Controlos negativos	0	4,70	7,70	2,40		
	Acetonitrilo	7,10	13,80	5,20		
	DMSO	11,00	13,40	3,60		
BaP	50	13,20	18,40	9,60	0,1052	
	75	13,30	20,90	8,50	0,1609	
	100	11,00	23,70	10,90	0,1705	
	125	11,60	23,80	20,50	0,0596	
6-Cl-BaP	50	7,70	16,40	4,90	0,6917	0,402
	75	10,10	17,80	7,70	0,9139	0,643
	100	46,20	41,60	29,70	0,0174*	0,022*
	125	47,90	50,20	54,00	0,0002*	0,005*
Controlo positivo EMS	$2 \times 10^4$	41,60	46,40	38,60	0,0004*	

\* valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ )

$\Delta$  Comparação do BaP ou do 6-Cl-BaP com o respectivo controlo

$\blacktriangle$  Comparação de concentrações equimolares de BaP e 6-Cl-BaP

Os resultados da curva dose-resposta obtida para cada um dos compostos encontram-se graficamente representados na Figura 3.9. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experiências independentes por concentração e as linhas de tendência definem a relação dose-resposta que, por regressão, melhor se ajustou aos dados obtidos para cada composto.

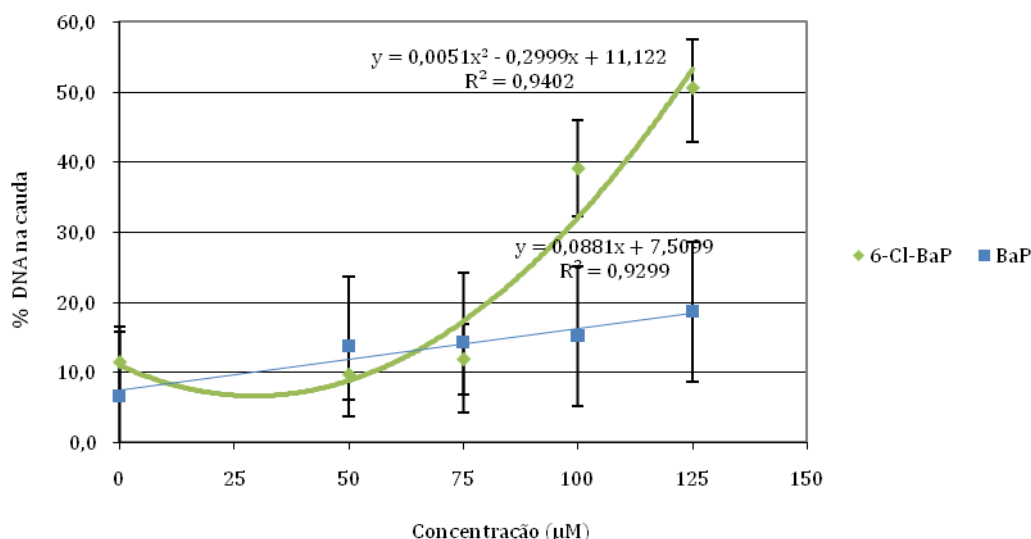


Figura 3. 9.- Percentagem de DNA na cauda obtida após tratamento de células HepG2 com BaP (3) e 6-Cl-BaP (13).

Em ambos os casos, verifica-se um aumento da percentagem de DNA na cauda do cometa com a concentração do agente testado, mas a magnitude da resposta é bastante diferente. Verificou-se, de facto, que o modelo matemático que melhor define a relação dose-resposta do 6-Cl-BaP (13) é um modelo polinomial, enquanto para o BaP (3) se encontrou uma relação de tipo linear mas com um declive muito pouco acentuado.

A análise estatística dos resultados (Tabela 3.18) indica que o 6-Cl-BaP (13) induziu um aumento significativo de lesões no DNA relativamente ao controlo, nas concentrações de 100 e 125  $\mu$ M, enquanto que o BaP (3) só na concentração mais elevada foi capaz de induzir um aumento mais marcado de lesões, mas ainda no limiar de significância estatística. A comparação entre concentrações equimolares de ambos os compostos mostra que, nas concentrações de 100 e 125  $\mu$ M, os valores da percentagem de DNA na cauda do cometa obtidos para o 6-Cl-BaP (13) são significativamente mais elevados que os obtidos para o BaP (3) (Tabela 3.18), sugerindo que, nestas

concentrações, o 6-Cl-BaP (13) é um genotóxico mais potente que o seu composto de origem, o BaP (3).

Os cometas obtidos podem ser arbitrariamente divididos em 5 classes, de acordo com a percentagem de DNA que se encontra na cauda. A classe 0 indica que 0 a 19% do DNA presente migrou para a cauda do cometa. Na classe 1 a percentagem é de 20 a 39%, na classe 2 é de 40 a 59%, na classe 3 é de 60 a 79% e na classe 4 é de 80 a 100%.

Os gráficos seguintes ilustram essa distribuição por classes para o BaP (3) (Figura 3.10) e para o 6-Cl-BaP (13) (Figura 3.11).

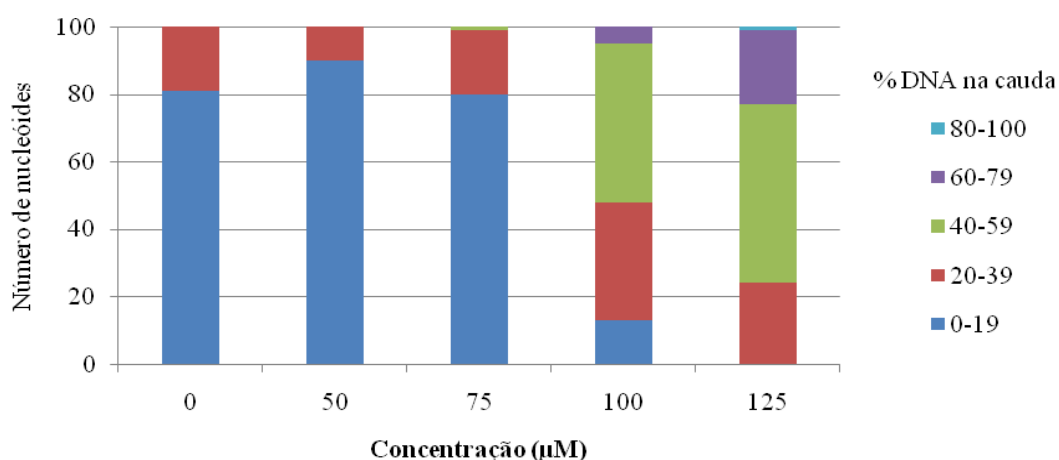


Figura 3. 10. – Proporção de cometas em cada classe de frequências para o BaP (3).

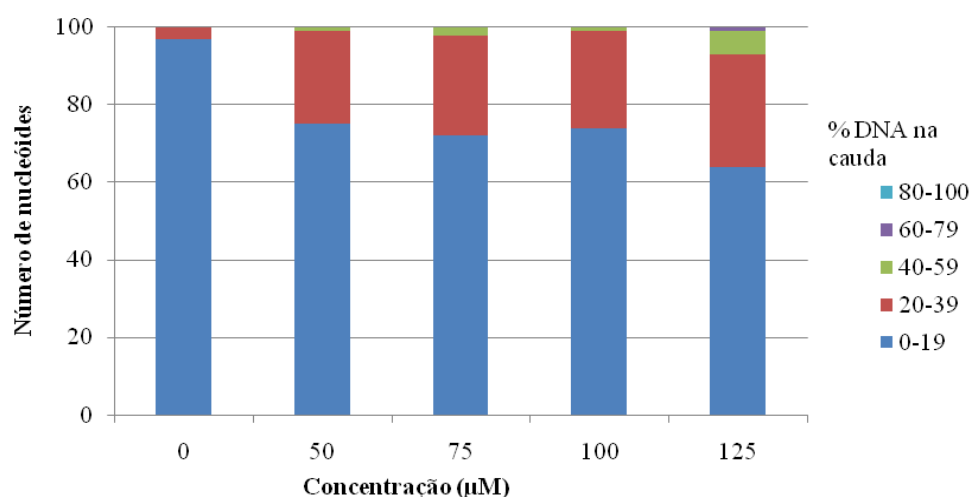


Figura 3. 11. – Proporção de cometas em cada classe de frequências para o 6-Cl-BaP (13).

A distribuição por classes de frequência permite identificar qual a classe ou classes predominante(s) para cada concentração do agente testado. Deste modo,

verifica-se que o BaP (3) induz essencialmente a formação de cometas de classe 0 e 1 para qualquer das concentrações, o que indica a presença de, respectivamente, 0-19% e 20-39% de DNA na cauda dos cometas obtidos. Apenas na concentração mais elevada, 125  $\mu\text{M}$ , se observam cometas cuja percentagem de DNA na cauda é da ordem de 40-59%, indiciando a indução de um efeito lesivo no DNA. Em comparação com o BaP (3), o tratamento das células HepG2 com 100  $\mu\text{M}$  do seu derivado clorado induziu já, predominantemente, a formação de cometas em que 40-59% do DNA se encontrava na cauda. Na concentração de 125  $\mu\text{M}$ , para além dos cometas de classe 2, notou-se ainda uma elevada frequência de cometas em que 60-79% de DNA se encontrava na cauda, sugerindo um efeito fortemente genotóxico. É ainda de referir a quase inexistência de cometas na classe 4, isto é, aquela que inclui cometas com mais de 80% de DNA danificado e que se considera que poderá estar associada à detecção de um efeito de fragmentação do DNA por apoptose.

Em resumo, uma vez que a percentagem de DNA na cauda do cometa é o parâmetro que se correlaciona de forma mais directa com o número de lesões induzidas no DNA das células em estudo, dos resultados obtidos é possível inferir que o 6-Cl-BaP (13) induz um aumento de lesões no DNA das células HepG2 em função da dose, segundo um modelo polinomial. Nas mesmas concentrações, o BaP (3) causou uma fraca indução de lesões no DNA que, contudo, variou linearmente com a dose. Por seu turno, a distribuição dos cometas por classes de frequência de acordo com a percentagem de DNA na cauda, veio confirmar que, de entre as concentrações testadas, o efeito genotóxicos do 6-Cl-BaP (13) parece ser mais acentuado do que o do BaP (3) nas duas concentrações mais elevadas.

Além do parâmetro anterior, avaliou-se também o comprimento da cauda dos cometas. Embora este parâmetro não permita avaliar, de forma directa, as lesões do DNA, é possível relacionar também este parâmetro com o número de lesões induzidas pelos dois compostos, dado que a presença de DNA lesado causa uma maior migração durante a electroforese, que se traduz num maior comprimento da cauda.

Os resultados experimentais obtidos para este parâmetro são apresentados na Tabela 3.19. As médias e erro padrão dos resultados obtidos encontram-se graficamente representados na Figura 3.12. O valor médio do comprimento da cauda obtido para cada tratamento foi comparado com o do respectivo controlo negativo pelo teste *t* de Student.

Tabela 3. 19. - Resultados do ensaio do cometa: valor médio do comprimento da cauda ( $\mu\text{m}$ ) após tratamento de células HepG2 com doses equimolares de 6-Cl-BaP (13) e BaP (3).

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Comprimento da cauda ( $\mu\text{M}$ )			$p^{\Delta}$ (teste t)	$p^{\Delta}$ (teste t)
		1ª experiência	2ª experiência	3ª experiência		
Controlo negativo	0	5,17	10,55	2,96		
	Acetonitrilo	11,24	21,51	23,09		
	DMSO	13,11	8,08	5,28		
BaP	50	18,64	31,57	15,03	0,107	
	75	17,02	33,82	13,41	0,174	
	100	17,87	36,51	18,62	0,112	
	125	13,31	35,69	30,67	0,108	
6-Cl-BaP	50	7,41	23,25	4,79	0,387	0,265
	75	10,01	26,42	9,01	0,639	0,500
	100	47,36	47,42	40,28	0,006*	0,062
	125	51,56	53,73	56,28	0,006*	0,052
Controlo positivo EMS	$2 \times 10^4$	40,51	47,65	41,56	0,0002*	

\* valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ )

$\Delta$  Comparação do BaP e 6-Cl-BaP com o respectivo controlo (Teste t de Student)

$\Delta$  Comparação de concentrações equimolares de BaP (3) e 6-Cl-BaP (13) (Teste t de Student)

Os resultados obtidos mostram um aumento do comprimento da cauda com a concentração de 6-Cl-BaP (13), enquanto que para o BaP (3) não se observa um efeito relacionado com a dose. A análise estatística dos resultados obtidos para cada tratamento em comparação com os dos respectivos controlos permite verificar que as concentrações de 100 e 125  $\mu\text{M}$  do derivado clorado provocaram aumentos estatisticamente significativos do comprimento da cauda (Tabela 3.19). Verifica-se ainda graficamente que, na concentração de 125  $\mu\text{M}$ , o 6-Cl-BaP (13) induz uma migração de DNA superior à induzida pelo controlo positivo, o EMS. A comparação do efeito produzido por concentrações equimolares dos dois compostos revela que as concentrações de 100 e 125  $\mu\text{M}$  de 6-Cl-BaP (13) induzem cometas cuja cauda tem um comprimento superior à dos induzidos por concentrações equimolares de BaP (3) (Figura 3.12), apesar da diferença estatística se encontrar no limiar de significância.

A análise do comprimento da cauda dos cometas sugere, deste modo, que para as concentrações de 100 e 125  $\mu\text{M}$ , o 6-Cl-BaP (13) apresenta capacidade de induzir lesões

no DNA das células HepG2, capacidade essa que aparenta ser superior à do BaP (3), à semelhança do que foi anteriormente observado para a percentagem de DNA na cauda do cometa. Os outros parâmetros analisados, momento da cauda e momento da cauda “Olive”, descrevem os mesmos resultados, portanto os seus dados não são apresentados.

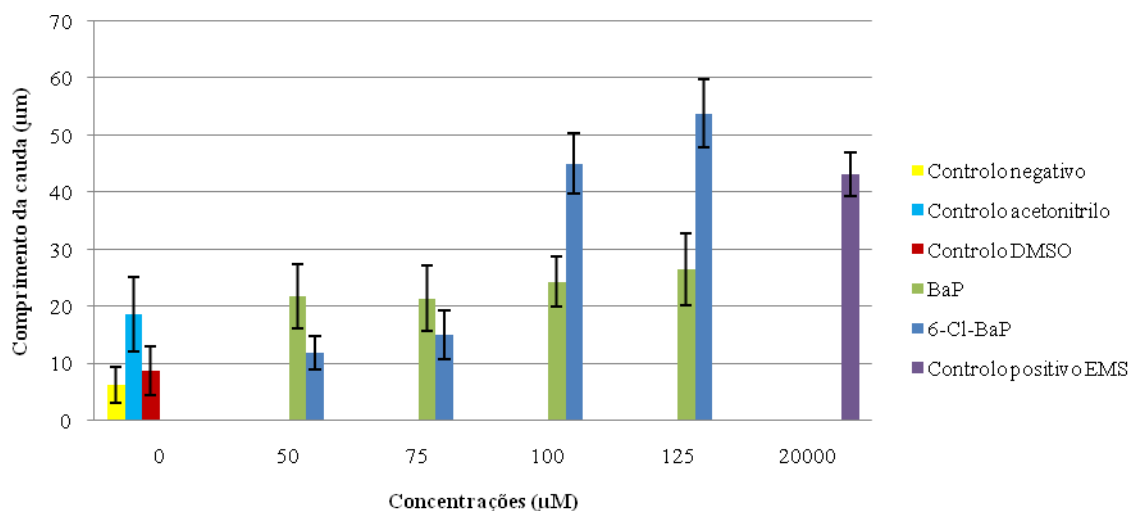


Figura 3. 12. – Comprimento da cauda dos cometas obtidos (valores médios de três experiências independentes) após tratamento com concentrações equimolares de BaP (3) e 6-Cl-BaP (13).

O efeito genotóxico do BaP (3) encontra-se amplamente descrito na literatura (Lin *et al*, 2007; Majer *et al*, 2004; Knasmuller *et al*, 2004; Uhl *et al*, 1999,2000;Valentin-Severin *et al*, 2003). Assim, devido à proximidade estrutural, utilizou-se este agente para efeitos comparativos dos resultados obtidos com o seu derivado clorado.

De acordo com a literatura, o BaP (3) deveria ter revelado efeitos genotóxicos para concentrações superiores a 25 µM (Uhl *et al*, 2000; Knasmuller *et al*, 2004), sendo que outro estudo refere a existência de efeitos genotóxicos pouco significativos no ensaio do cometa, para uma exposição a concentrações iguais ou inferiores a 25 µM durante 24 horas (Valentin-Severin *et al*, 2003). Os dados obtidos para o BaP (3) neste trabalho evidenciaram um efeito genotóxico pouco marcado, embora o tratamento das células com 125 µM já tenha originado uma indução na percentagem de DNA na cauda dos cometas próxima da significância estatística. Torna-se, assim, necessário testar concentrações mais elevadas de BaP (3), para verificar se essa tendência se acentuará.

A análise global dos resultados deste estudo permite verificar que existem diferenças no efeito genotóxico observado para o BaP e para o 6-Cl-BaP e que o efeito do derivado clorado é, aparentemente, superior ao do HAP não substituído. Estes resultados são compatíveis com os efeitos genotóxicos descritos para o antraceno,

fenantreno, benzo[a]antraceno, pireno, criseno e seus derivados, utilizando o teste de Ames (Lofroth *et al*, 1984).

Nesta avaliação genotóxica é necessário referir que os resultados positivos, registados no ensaio do cometa para concentrações de 100 e 125  $\mu$ M de 6-Cl-BaP (13), podem não reflectir, exclusivamente um efeito genotóxico mas poderão ter sido influenciados por alguma citotoxicidade. De facto, sabe-se que o DNA fragmentado detectado no ensaio do cometa pode resultar também de células em apoptose ou necrose devido a efeitos de citotoxicidade (Tice *et al*, 2000). Contudo, como a viabilidade das células expostas a BaP (3) e 6-Cl-BaP (13) não é estatisticamente diferente para estas concentrações, os efeitos citotóxicos deverão ter um impacto semelhante para ambos os agentes. Outro factor que poderá ter influência nos resultados do ensaio do cometa é o efeito do solvente (Tice *et al*, 2000). Contudo, esse efeito foi tido em conta ao realizarem-se controlos dos solventes e parecem, realmente, não ser desprezáveis. Assim, como os efeitos do solvente e da citotoxicidade são semelhantes, os resultados sugerem que o 6-Cl-BaP (13) é mais genotóxico que o BaP (3).

A observação de um efeito genotóxico do derivado clorado do BaP (3) superior ao do seu composto de origem obtido no presente estudo usando o ensaio do cometa, deverá ser encarado como uma primeira abordagem ao potencial genotóxico do 6-Cl-BaP (13). De facto, apesar de um resultado positivo pelo ensaio do cometa estar associado à existência de um efeito lesivo no DNA, não significa que se trate de um efeito irreversível. Contudo, considera-se que será ainda importante testar outros tempos de exposição e concentrações superiores do BaP (3) e 6-Cl-BaP (13). Por outro lado, para se poder tirar uma conclusão sobre o potencial genotóxico e, eventualmente carcinogénico, do 6-Cl-BaP (13) seria relevante recorrer a outros testes como o ensaio do micronúcleo, a análise de aberrações cromossómicas ou a indução de trocas de cromatídeos irmãos (Natarajan *et al*, 1991; Knasmuller *et al*, 1998; Darroudi *et al*, 1998). Embora sejam procedimentos morosos, comparativamente ao ensaio do cometa, são capazes de detectar efeitos genotóxicos irreversíveis ao nível cromossómico e, portanto, são essenciais para uma caracterização mais completa do efeito genotóxico de um composto.

Neste estudo observou-se ainda que o 6-Cl-BaP (13) só revela efeitos genotóxicos a partir de concentrações muito superiores ao limite de quantificação obtido na água para consumo humano. Contudo, um consumo diário prolongado de água contendo pequenas

quantidades destes compostos, ou seja, uma exposição crónica, poderá conduzir a um efeito cumulativo a longo prazo, cujo impacto se desconhece.



## 4. Conclusões

Este trabalho foi o primeiro a aliar simultaneamente diversas áreas científicas, nomeadamente química orgânica, química analítica e toxicologia genética para o estudo de derivados clorados de HAPs. Este projecto envolveu a síntese química e caracterização do 6-Cl-BaP (13), a implementação de uma metodologia analítica para a sua quantificação em águas para consumo e o estudo da sua genotoxicidade por comparação com o HAP respectivo (BaP (3)).

Além disso deste trabalho resultou também o desenvolvimento de um novo método sintético de cloração de compostos aromáticos e o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a detecção de Cl-HAPs. O estudo de genotoxicidade do 6-Cl-BaP (13) foi também efectuado pela primeira vez neste projecto.

A síntese do 6-Cl-BaP (13) através do novo método desenvolvido, que recorre à utilização de hipoclorito de sódio como agente de cloração num sistema bifásico, revelou resultados bastante satisfatórios. O método desenvolvido para a síntese do derivado clorado do BaP (3) apresenta inúmeras vantagens relativamente a outros métodos referidos na literatura (Dyker *et al*, 2003; Mulder *et al*, 1993; Nakamura *et al*, 2007), por ser muito simples, rápido e de fácil execução e permitindo o isolamento do 6-Cl-BaP (13) como um elevado rendimento. Adicionalmente, dispensa o uso de solventes carcinogénicos como o tetracloreto de carbono utilizado nas técnicas referidas anteriormente.

Este método de síntese, contudo não se revelou eficaz para todos os HAPs testados pois o BbF (1) e BkF (2) não originaram os respectivos derivados clorados. Possivelmente a reacção não ocorreu devido à elevada estabilidade química destes compostos destes compostos também demonstrado por outro autor (Audin *et al*, 2000).

Futuramente, seria interessante aplicar este método de síntese a outros HAP como o benzo[ghi]perileno, e indeno [1,2,3-c,d]pireno referidos na legislação nacional e o fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[j]fluoranteno e dibenzo[a,h]antraceno também referidos pela OMS (1998) como agentes genotóxicos, mutagénicos ou carcinogénicos.

A metodologia de SPE-RLC-FLD foi otimizada e validada como o objectivo de quantificar o 6-Cl-BaP (13) em águas para consumo humano. Este método foi escolhido por ser comumente utilizado para a quantificação de HAPs em águas para consumo humano, apresentando algumas vantagens relativamente a outros métodos desenvolvidos que envolvem outras técnicas de preparação de amostra nomeadamente microextração em fase sólida e extração líquido-líquido (Urbe *et al*, 1997; Zhou *et al*, 2006; Liu *et al*, 1997; Manodori *et al*, 2006; Anyakora *et al*, 2005).

A metodologia desenvolvida é bastante fácil e simples de aplicar, económica, apresenta uma sensibilidade adequada, com boa linearidade e permite detectar este composto na ordem dos nanogramas por litro. O limite de detecção obtido permite a determinação do 6-Cl-BaP (13) em valores equivalentes aos definidos para o BaP (3) nas legislações nacional (Decreto-lei nº306/2007) e internacional (Directiva 98/83/EC). Futuramente, devem ser realizados estudos de veracidade, repetibilidade e precisão intermédia em amostras de água da torneira, ultra-pura e superficiais, para que a metodologia possa ser aplicada a outras amostras de água para consumo humano, nomeadamente água da torneira. Poderá também estender-se esta metodologia a outros Cl-HAPs. Nessa altura poderá quantificar-se estes compostos em amostras reais, e estudar a formação deste tipo de derivados no decorrer do processo de cloração, tal como autores já o fizeram para alguns HAPs (Oyler *et al*, 1982; Shiraishi *et al*, 1985).

O estudo dos efeitos genotóxicos do 6-Cl-BaP (13) foi realizado através do ensaio do cometa em condições alcalinas, por ser simples, rápido e altamente específico e sensível (Tice *et al*, 2000).

A avaliação do 6-Cl-BaP (13) revelou a indução de significativas lesões no DNA após a exposição de células HepG2 durante 24 horas a concentrações iguais ou superiores a 100 µM. Os estudos realizados mostraram ainda que a genotoxicidade dos derivados clorados é superior à do HAP que lhe deu origem, conforme é descrito por Lofroth *et al* (1984) para o antraceno, fenantreno, benzo[a]antraceno, pireno, criseno e seus derivados.

Procuraram-se avaliar concentrações próximas do limite de quantificação do 6-Cl-BaP (13) determinado por SPE-RLC-FLD para água de consumo humano. Contudo os efeitos genotóxicos apenas se manifestaram a partir de concentrações muito superiores às encontradas na água para o 6-Cl-HAP (13). Apesar disso, o conhecimento do seu efeito genotóxico é importante, dado que o ser humano estará exposto de uma forma

crónica a baixas doses, o que poderá levar a um efeito cumulativo do composto no organismo.

Nesta fase, seria importante testar outros tempos de exposição e/ou realizar novos ensaios de genotoxicidade como o ensaio dos micronúcleos, a análise de aberrações cromossómicas ou indução de trocas de cromátídeos irmãos, essenciais para uma caracterização genotóxica mais completa. Estes e outros ensaios poderiam ser realizados de modo a contribuir para a avaliação do risco para a saúde humana, do consumo prolongado de águas de abastecimento contaminadas com estes subprodutos de desinfecção da água.



## 5. Bibliografia

Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR); US Department of Health and Human Services; **1990**

Amin, S., Huie, K.; Hecht, S.; *Carcinogenesis*; **1985**, 6(7), 1023- 1025.

Anyakora, C.; Ogbeche, A.; Palmer, P.; Coker, H.; *Journal of Chromatography A*; **2005**, 1073, 323-330

Aubin, S.; Farant, J.; *Journal of the Air & Waste Management Association*; **2000**, 50 (12), 2093-2101

Borenfreund, E.; Puerner, J.; *Toxicol. Lett.*; **1985**, 24, 119-124

Cardoso, V.; Rodrigues, A.; Correia, J.; Benoliel, M.; *Polycyclic Aromatic Compounds*, **2000**, 19, 227-239

Charles, G.; Bartles, M. J.; Zacharewski, T. R.; Gollapudi, B. B.; Freshour, N. L.; Carney, E.W.; *Toxicol. Sci.*; **2000**, 55, 320-326

Chen, H.; *Analytical Sciences*; **2004**, 20, 1383-1388

Collins, A.; *Mol. Biotechnology*; **2004**, 26, 249-261

Colmsjö, A.; Rannug, A. and Rannug, U.; *Mutation Res.*; **1984**, 135, 21-29

Darroudi, F.; Natarajan, A.; *Altern. Lab. Anim.*; **1998**, 22, 445-453

Decreto-lei 306/2007; Diário da República Portuguesa, 1.<sup>a</sup> série; N.º 164; 27 de Agosto de **2007**; Ministério do Ambiente, do ordenamento do território e do desenvolvimento regional; Lisboa

Dewhurst, F.; Kitchen, D.; *J. Chem. Soc.*; **1972**, Perkin Trans. 1, 710-712

Dietrich, C.; Oesch, F.; Oesch-Bartolomowicz, B.; Weiis, C.; *Environ. Cancer Risk, Nutrition and individual Susceptibility (ECNIS)*; **2008**, Alemanha

Directiva 98/83/EC de 3 de Novembro de **1998**; Conselho da União Europeia; OJEC L330/ 05.12.98; União Europeia

Djozan, Dj.; Assadi, Y.; *Microchemical Journal*, **1999**, 63, 276-284

- Doong, R.; Chang, S.; Sun, Y.; *Journal of Chromatography A*; **2000**, 879, 177-188
- Dyker, G.; Kadzimirsz, D.; Thone, A.; *Eur. J. Org. Chem.*; **2003**, 3162-3166
- El-Beqqali, A.; Kussak, A.; Abdel-Rechim, M.; *Journal of Chromatography A*; **2006**, 1114, 234-238
- Fenech, M.; *Mut. Res.*; **2006**, 600, 58-66
- Garcia-Falcon, M.; Perez-Lamela, M.; Simal-Gandara; *J. Agric. Chem.*; **2004**, 52, 6897-6903
- Geddie, J.; Amin, S.; Huie, K.; Hecht, S.; *Carcinogenesis*; **1987**, 8 (11), 1579-1584
- Harrison, R.; Perry, R.; Wellings, R.; *Environ. Sci. Technol.*; **1976**, 10 (12), 1156-1160
- Hou, L.; Lee, H.; *Journal of Chromatography A*; **2002**, 976, 377-385
- Hu, J.; Jin, X.; Kunikane, S.; Terao, Y.; Aizawa, T.; *Environ. Sci. Technol.*; **2006**, 40, 487-493
- International Agency for Research on Cancer (IARC); *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data*; **1998**, 32, Lyon
- ISO 8466-1; *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*; International Organization for Standardization; **1990**
- Itoh, S.; Matsuoka, Y.; *Wat. Research*; **1996**, 30 (6), 1403-1410
- Kim, J.; Stansbury, K.; Walker, N.; Trush, M.; Strickland, P.; Sutter, T.; *Carcinogenesis*, **1998**, 19 (10), 1847-1853
- Kitawaza, A.; Amagai, T.; Ohura, T.; *Environ. Sci. Technol.*; **2006**, 40, 4592-4598
- Knasmüller, S.; Mersch-Sundermann, V.; Kevekordes, S.; Darroudi, F.; Huber, W.W.; Hoelzl, C.; Bichler, J.; Majer, B.J.; *Toxicology*; **2004**, 198, 315 – 328
- Knasmüller, S.; Parzefall, W.; Sanyal, R.; Ecker, S.; Schwab, C.; Uhl, M.; Mersch-Sundermann, V.; Williamson, G.; Hietsch, G.; Langer, T.; Darroudi, F.; Natarajan, A.; *Mutation Res.*; **1998**, 402, 185–202

- LaVoie, E. J.; Amin, S.; Hecht, S.; Furuya, K.; Hoffmann, D.; *Carcinogenesis*; **1982**, 3(1): 49-52.
- Lee, G.; Freedman, H.; *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 20, 1641
- Léon, V.; Álvarez, B.; Cobollo, M.; Muñoz, S.; Valor, I.; *Journal of Chromatography A*; **2003**, 999, 91-101
- Lin, T.; Yang, M.; *Toxicology*, **2008**, 245, 147-153
- Liu, Y.; Lee, M.; *Anal. Chem.*; **1997**, 69, 5001-5005
- Löfroth, G.; Nilsson, L.; Agurell, E.; Sugiyama, T.; *Mutation Res.*; **1985**, 155, 91-94
- Mahadevan, B.; Parsons, H.; Musafia, T.; Sharma, A.; Amin, S.; Pereira, C.; Baird, W.; *Environ. Mol. Mutagen.*, **2004**, 44,99-107
- Majer, B.; Mersch-Sundermann, V.; Darroudi, F.; Laky, B.; Wit, K.; Knasmüller, S.; *Mutation Res.*; **2004**, 551,153-166
- Manodori, L.; Gambaro, A.; Piazza, R.; Ferrari, S.; Stortini, A.; Moret, I.; Caodaglio, G.; *Marine Pollution Bulletin*; **2006**, 52, 184-192
- Martinez, E.; Gros, M.; Lacorte, S.; Barceló, D.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1047, 181-188
- Mastral, A.; Callén, M.; *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34, 3051-3057
- Mulder, P.; RamaKrishna, N.; Cremonesi, P.; Rogan, E.; Cavalieri, E.; *Chem. Res. Toxicol.*; **1993**, 6, 657-661
- Murk, A.; *Environ. Toxicol. Chem.*; **2002**, 21(1), 16-23
- Nakamura, H.; Tomonaga, Y.; Myata, K.; Terao, Y.; *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 2190-2195
- Natarajan, A.; Darroudi, F.; *Mutagenesis*; **1991**, 5, 399-403
- Netto, A.; Moreira, J.; Dias, A.; Arbilla, G.; Ferreira, L.; Oliveira, A.; Barek, J.; *Química Nova*, **2000**, 23 (6), 765-773
- Organização Mundial de Saúde (OMS); *Guidelines for drinking-water quality*; **1998**; vol. 2, 2ª ed.; Geneva

- Organização Mundial de Saúde (OMS); *Guidelines for drinking-water quality - recommendations*; **2006**; vol.1, 3<sup>a</sup> ed; Geneva
- Oyler, A.; Luikkonen, R.; Lukasewycz, M.; Cox, D.; Peake, D.; Carlson, R.; *Environ. Health Perspectives*; **1982**, 46,73-86
- Oyler, A.; Luikkonen, R.; Lukasewycz, M.; Helkkila, K.; Cox, D.; Carlson, R.; *Environ. Sci. Technol.*; **1983**, 17, 334-342
- Oyler,A.; Bodenner,D.; Welch,K.; Luikkonen,R.; Carlson,R.; Kopperman,H.; Caple,R.; *Anal. Chem.*; **1978**, 50 (7), 837-842
- Perrin, D.; Armarego, W.; Purification of laboratory chemicals; 3<sup>a</sup> edição, **1988**, Nova Iorque
- Pettersson, J.; Klokowki, A.; Zaniol, C.; Roeraade, J.; *Journal of Chromatography A*; **2004**, 1033, 339-347
- Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseini; Mohammad-Reza, M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.; *Journal of Chromatography A*; **2006**, 1116, 1-9
- Schwartz, D.; Saxena, J.; *Environ. Sci. Technol.*; **1979**, 13 (9), 1138-1141
- Shimada, T.; Fujii-Kuriyama, Y.; *Cancer Sci.* , **2004**, 35,1-6
- Shiraishi, H.; Pilkington, N. H.; Otsuki, A. and Fuwa, K. ; *Environ. Sci. Technol.*; **1985**, 19(7), 585-590
- Spink, D.; Wu, S.; Spink, B.; Hussain, M.; Vakharia, D.; Pentecost, B.; Kaminsky, L.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* ;**2007** , 226 (3),213-224
- Staal, Y.; Herwijnen, M; Schooten, F.; Delfit, J.; *Carcinogenesis*; **2006**, 27 (3), 646-655
- Starks, C.; Liotta, C.; Halern, M.; *Phase-transfer catalysis: fundamentals, applications, and industrial perspectives*, Chapman & Hall, **1994**, Londres
- Supelco - Guide to Solid Phase Extraction; *bulletin 910*; Sigma-Aldrich Co.; **1998**
- Thorsen, W.; Crone, D.; Shea, D.; *Environ. Sci. Technol.*; **2004**, 38,2029-2037
- Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.; Sasaki, Y.; *Environ. Mol. Mut.*; **2000**, 35, 206-221
- Titato, G.; Lanças, F.; *Journal of Chromatographic Sci.*; **2006**,44, 35-40

Uhl, M.; Helma, C., Knasmuller, S.; *Mutation Research*; **2000**, 468, 213–225

Uhl, M.; Helma, C.; Knasmuller, S.; *Mut. Res.*; **1999**, 441, 215-224

United States Environmental Protection Agency (US EPA); *Ground Water & Drinking Water*; **2006**

Urbe, I.; Ruana, J.; *Journal of Chromatography A* ; **1997**, 778, 337-345

Valentin-Severin, I.; Le Hegarat, L.; Lhuguenot, J.; Le Bon, A.; Chagnon, M.; *Mutation Res.*; **2003**, 536, 79-90.

Validação de métodos internos de ensaio em Análise Química; *Guia Relacre 13*; **2000**

van Lipzig, M.; Vermulen, N.; Gusinu, R.; Legler, J.; Frank, H.; Seidel, A.; Meerman, J.; *Environ. Tox. Pharmacol.*; **2005**, 19, 41-55

Wolska, L.; Rawa-Adkonis, M.; Góreck, T.; Zygmunt, B.; Namieśnik, J.; *Chemia Analalityczna* (Warsaw) ; **2006**, 51(35), 35-49

Zhou, Y.; Yan, X.; Kim, K.; Wang, S.; Lui, M.; *Journal of Chromatography A*; **2006**, 1116, 172-178



## 6. Anexos

### Anexo I

#### 6.1. Preparação de soluções do ensaio do cometa

##### 6.1.1. Tampão de lise

Tabela 6. 1. Composição do tampão de lise.

Composição da solução	Quantidade (g) para 1L de solução
NaCl (2,5 M)	146,10
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O (100 mM)	37,20
Tris-HCl (10 mM)	1,20
NaOH (pH10)	20 mL NaOH (10 M)
N-laurosilsarcosina (1%)	10,0

##### Procedimento:

Pesou-se o NaCl, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O e Tris-HCl e adicionou-se cerca de 2/3 do volume da água necessária. Agitou-se com o auxílio de um agitador magnético e juntou-se NaOH. Mediu-se o pH e adicionou-se NaOH gota a gota até atingir pH 10. Juntou-se o detergente N-laurosilsarcosina. Após a dissolução de todos os reagentes acertou-se o volume com água destilada. Guardou-se a solução à temperatura ambiente.

### 6.1.2. Tampão de neutralização

Tabela 6. 2. Composição do tampão de neutralização.

Composição da solução	Quantidade (g) para 1L de solução
Trizma base (0,4M Tris)	48,50
HCl 4 M	95 mL

#### Procedimento:

Pesou-se Trizma base e adicionou-se HCL 4 M previamente preparado. Perfez-se o volume com água destilada e agitou-se com agita solução foi guardada à temperatura ambiente.

### 6.1.3. Solução de electroforese

Tabela 6.3. Composição da solução de electroforese.

Composição da solução	Quantidade (g) para 2L de solução
NaOH 300 mM	24,0
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O 1mM	0,74

#### Procedimento:

Pesou-se o NaOH em copo de plástico de 2L. Adicionou-se Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O e água milli-Q até 2/3 do volume necessário. Tapou-se com alumínio e agitou-se com agitador magnético. Mediu-se o pH e verificou-se se era superior a 13. Guardou-se em câmara fria (4°C) até ao momento de utilização. A solução era guardada apenas por uma semana.

## **6.2.Preparação de lâminas**

### **Procedimento:**

Prepararam-se 100 mL de agarose com ponto de ebulição normal (normal melting point – LMP) 1% em água destilada. Colocou-se o copo com esta solução sobre uma superfície quente, evitando a solidificação da mesma. Mergulharam-se as lâminas na agarose tendo o cuidado de limpar o verso da lâmina e colocaram-se sobre a superfície quente para secar a agarose, Marcou-se o lado da lâmina com agarose. As lâminas foram depois guardadas à temperatura ambiente em caixas fechadas.

## **6.3.Preparação do microgel**

### **Procedimento:**

Preparam-se 50 mL de agarose com baixo ponto de ebulição (low melting point – LMP) 0,7% em PBS. Dividiu-se o microgel em pequenas alíquotas de 1 mL e guardaram-se a 4°C.

## **Publicações deste trabalho:**

-Rebola, M.; Silva, M. J.; Louro, H.; Alexandra, A.; José, S. S., Rebelo, M. H.; Cardoso, A. S. “Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with drinking water chlorination: preparation, quantification and genotoxicity characterization”, aceite para publicação na revista Ecological Chemistry and Engineering.

- Rebola, M.; Silva, M. J.; Louro, H.; Alexandra, A.; José, S. S., Rebelo, M. H.; Cardoso, A. S. “Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with drinking water chlorination: preparation, quantification and genotoxicity characterization”, Proceedings of Ecopole 2008.

- Rebola, M.; Silva, M. J.; Louro, H.; Alexandra, A.; José, S. S., Rebelo, M. H.; Cardoso, A. S. “Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with drinking water chlorination: preparation, quantification and genotoxicity characterization”, Apresentação em Poster (3º Prémio), P95, Ecopole 2008, 23-25 Outubro, 2008, Polónia.