

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS TOTAIS DE MÉRCURIO (Hg) EM AMOSTRAS DE CABEÇA E CORPO DE *Drosophilas melanogaster*

MARIANNE M. S. MELO¹; MATHEUS C. BIANCHINI², GUSTAVO GOHLKE³,
ROBSON L. PUNTEL⁴, ERICO M. M. FLORES⁵, MARCIA F. MESKO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marianne_msmelo@hotmail.com

²Universidade Federal da Fronteira Sul – matheus_cbianchini@hotmail.com

³Universidade Federal de Santa Maria – gustavogohlke@gmail.com

⁴Universidade Federal do Pampa – robson_puntel@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Santa Maria – ericommf@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marciamesko@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A utilização de modelos biológicos alternativos, como, a *Drosophila melanogaster* (também chamada de mosca de fruta) têm ganhado destaque em estudos *in vivo* devido a vantagens como fácil manuseio, curto período de vida (o que contribui para a obtenção de resultados em um curto intervalo), bem como uma similaridade genética. Essas características contribuem para sua aplicabilidade em pesquisas científicas, sendo um modelo adequado para estudar os efeitos de diferentes xenobióticos, dentre eles, metais potencialmente tóxicos (MUSACHIO et al., 2020).

O mercúrio (Hg) é um metal conhecido por sua elevada toxicidade (tanto na forma orgânica como inorgânica) e sua grande capacidade de bioacumulação em organismos. Estudos em *D. melanogaster* podem elucidar como esse metal se move, acumula e impacta os organismos (SILVA et al., 2021). Como exemplo de técnicas analíticas que possibilitam a determinação de Hg, é possível mencionar, dentre outras, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP-OES), ambas utilizando de um sistema de introdução de amostra por geração química de vapor (CVG).

A ICP-MS tem como princípio a separação dos analitos pela sua razão massa/carga após sua ionização em um plasma de elevada energia, geralmente de Ar (POETINE et al., 2022). Já a MIP-OES, também utiliza um plasma, mas de menor energia, composto de N₂ e que é gerado por micro-ondas. Esse plasma promove a excitação dos analitos que, ao retornarem ao seu estado fundamental, emitem luz em comprimento de onda específico, que serão posteriormente analisados na óptica do espectrômetro para identificar e quantificar os elementos presentes (BITENCOURT et al., 2023).

Além de técnicas de determinação adequadas, é importante também escolher um método de preparo de amostras eficiente e compatível com a etapa de quantificação. Por exemplo, a digestão ácida é um método frequentemente utilizado para a decomposição de amostras de composição majoritariamente orgânica, como amostras biológicas, visando a posterior determinação de metais. Entretanto, é importante mencionar que a combinação de ácido clorídrico (HCl) com o ácido nítrico (HNO₃, reagente altamente oxidante utilizado para decompor a matéria orgânica) durante a digestão para a posterior determinação Hg, é sobremaneira importante para garantir a estabilidade do metal em solução sem perder a eficiência da decomposição (FERREIRA, et al., 2023).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi, primeiramente, utilizar a CVG-MIP-OES e a CVG-ICP-MS para determinação de Hg em amostras de

D.melanogaster, após digestão ácida. Além disso, analisando-se separadamente os corpos e as cabeças das moscas, buscou-se avaliar e entender a capacidade de bioacumulação e mobilidade do Hg após expor o modelo *in vivo* a este agente tóxico.

2. METODOLOGIA

Moscas adultas de 1-3 dias de vida de ambos os sexos (50% machos /50% fêmeas) foram separadas em 1) controle (C) e 2) tratado (T) (com 25 μ M de timerosal – forma orgânica de Hg) e expostas pelo período de 4 dias (D1 a D4). A cada 24 horas, durante os 4 dias, as moscas eram retiradas dos frascos, anestesiadas e tinham as estruturas de cabeça e corpo separadas para posteriores análises. Esse modelo foi executado duas vezes, cada uma das vezes em uma semana (semana 1, S1; e semana 2, S2). Como a massa de amostra individual dessas coletas era insuficiente para a execução do método, as amostras foram reorganizadas e as moscas coletadas em um mesmo dia dos três diferentes *pools* de cada grupo foram homogeneizadas em um tubo só, mantendo-se as duplicatas, respeitando-se a divisão dos grupos “controle” e “tratamento”, bem como a divisão em cabeças e corpos. Para melhor compreensão, é possível observar como foi feita a divisão e homogeneização das amostras no Quadro 1. Cada tubo de cabeças de moscas continha cerca de 2 mg de massa de amostra, enquanto a massa média das amostras de corpos de moscas foi de aproximadamente 14 mg.

Quadro 1. Descrição da divisão das amostras de cabeça de moscas dos grupos controle e “tratamento”.

Amostra*	Coleta**	Amostra*	Coleta**	Amostra*	Coleta**	Amostra*	Coleta**
CA1 e CO1	C1D1S1 C2D1S1 C3D1S1	CA5 e CO5	C1D3S1 C2D3S1 C3D3S1	CA9 e CO9	T1D1S1 T2D1S1 T3D1S1	CA13 e CO13	T1D3S1 T2D3S1 T3D3S1
CA2 e CO2	C1D1S2 C2D1S2 C3D1S2	CA6 e CO6	C1D3S2 C2D3S2 C3D3S2	CA10 e CO10	T1D1S2 T2D1S2 T3D1S2	CA14 e CO14	T1D3S2 T2D3S2 T3D3S2
CA3 e CO3	C1D2S1 C2D2S1 C3D2S1	CA7 e CO7	C1D4S1 C2D4S1 C3D4S1	CA11 e CO11	T1D2S1 T2D2S1 T3D2S1	CA15 e CO15	T1D4S1 T2D4S1 T3D4S1
CA4 e CO4	C1D2S2 C2D2S2 C3D2S2	CA8 e CO8	C1D4S2 C2D4S2 C3D4S2	CA12 e CO12	T1D2S2 T2D2S2 T3D2S2	CA16 e CO16	T1D4S2 T2D4S2 T3D4S2

*CA = cabeça; CO = corpo. **C = controle; T = tratamento; D = dia de coleta; S = semana de coleta (amostras C1D1S1, C2D1S1, C3D1S1 pertencem respectivamente à semana 1 (S1) dos experimentos controle (C) 1, 2, e 3, coletados no dia 1 (D1), reunidas em um único tubo identificado como “CA1” para as cabeças e “CO1” para os corpos).

As amostras foram decompostas utilizando-se um método de digestão ácida por via úmida em sistema aberto e aquecimento convencional. A solução digestora utilizada foi 1 mL da mistura HNO₃/HCl (3:1 v/v). Após a adição da solução digestora às amostras, essa mistura foi aquecida a 95 °C por cerca de 2 horas. Após o término da decomposição, os digeridos foram avolumados a 1,5 mL com água ultrapura, previamente às análises.

Para realizar a determinação de Hg por ambas as técnicas, no sistema da CVG foram utilizados os reagentes tetraidroborato de sódio (NaBH_4) e ácido clorídrico (HCl), para conversão do Hg total para Hg^0 , sua forma mais volátil. Após a formação de vapor do analito, este é carregado até o sistema de nebulização dos equipamentos utilizados para análise. Os isótopos monitorados durante a análise por CVG-ICP-MS foram ^{202}Hg e ^{200}Hg , enquanto que durante a análise das amostras por CVG-MIP-OES, a linha de emissão monitorada foi em 253,652 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a concentração de Hg nas amostras do grupo controle e “tratamento”, após análise por CVG-ICP-MS e por CVG-MIP-OES, respectivamente, estão demonstrados na Tabela 1. Além disso, estão demonstrados os limites de quantificação (LOQs) obtidos para o analito considerando cada grupo avaliado.

Tabela 1. Concentrações de Hg determinadas por CVG-ICP-MS (grupo controle) e CVG-MIP-OES (grupo “tratamento”) em amostras de cabeças e corpos de *Drosophila melanogaster* (mg kg^{-1} , $n=3$, média \pm SD).

Grupo	Amostra	Hg	Amostra	Hg
Controle	CA1	< 16,55*	CO1	< 2,36*
	CA2	< 16,55*	CO2	< 2,36*
	CA3	< 16,55*	CO3	< 2,36*
	CA4	< 16,55*	CO4	< 2,36*
	CA5	< 16,55*	CO5	< 2,36*
	CA6	< 16,55*	CO6	< 2,36*
	CA7	< 16,55*	CO7	< 2,36*
	CA8	< 16,55*	CO8	< 2,36*
“Tratamento”	CA9	N.d.	CO9	N.d.
	CA10	19,82 \pm 1,34	CO10	48,11 \pm 27,06
	CA11	34,02 \pm 0,52	CO11	92,07 \pm 7,60
	CA12	39,60 \pm 3,19	CO12	98,26 \pm 6,04
	CA13	57,91 \pm 4,49	CO13	115,47 \pm 65,24
	CA14	21,26 \pm 1,71	CO14	124,18 \pm 70,16
	CA15	47,10 \pm 4,94	CO15	135,00 \pm 11,76
	CA16	69,58 \pm 9,62	CO16	140,73 \pm 79,53

*LOQ (mg kg^{-1}); N.d.: Não determinado.

Como é possível observar com relação ao grupo controle, tanto nas amostras de cabeça quanto de corpos, a concentração de Hg está abaixo dos respectivos LOQs. Vale ressaltar que todas amostras deste grupo foram analisadas por CVG-ICP-MS, tendo em vista que esta técnica apresenta maior sensibilidade para determinação de Hg em comparação à outra técnica disponível, a CVG-MIP-OES – e, mesmo assim, não foi possível quantificar o analito nem em cabeças nem em corpos das moscas do grupo controle.

Por outro lado, as amostras pertencentes ao grupo de animais expostos a Hg apresentavam concentrações do analito milhares de vezes maiores do que a faixa de trabalho utilizada na CVG-ICP-MS. Portanto, seria necessário empregar elevadas diluições do digerido antes da injeção das amostras no equipamento – o que causaria um impacto negativo nos parâmetros de precisão e exatidão dos resultados. Assim, para evitar a utilização de fatores de diluição muito elevados ou,

caso contrário, ocasionar danos ao equipamento, as amostras do grupo “tratamento” foram analisadas por CVG-MIP-OES. Utilizando esta técnica e, assim, uma faixa de concentrações de Hg maiores, foi possível quantificar o analito de maneira adequada nessas amostras, conforme observado na Tabela 1.

Como é possível observar por meio dos resultados obtidos, houve um aumento gradual da concentração de Hg nas amostras de moscas na fração dos corpos, proporcional ao número de dias de exposição. Por outro lado, na fração das cabeças das moscas foi observado que o aumento na concentração de Hg não foi proporcional à quantidade de dias de exposição dos animais ao analito. Além disso, a variação entre os valores encontrados para amostras coletados no mesmo dia indica que outras variáveis podem estar associadas à acumulação de Hg nessa fração. Por fim, é válido ressaltar que, de acordo com os resultados obtidos, o Hg é acumulado principalmente na região do corpo das moscas, em comparação à região da cabeça.

4. CONCLUSÕES

Utilizando as técnicas de CVG-ICP-MS e CVG-MIP-OES foi possível quantificar de maneira satisfatória a concentração de Hg em ambos os grupos do modelo *in vivo*, isto é, “controle” e “tratamento”. Para o primeiro grupo, foi necessário empregar a CVG-ICP-MS, que possui uma maior sensibilidade; por outro lado, para a determinação das elevadas concentrações de Hg presente nos animais do grupo exposto a este metal, foi necessário o emprego da CVG-MIP-OES para a obtenção de resultados mais confiáveis.

Ainda, observou-se que a bioacumulação do Hg se deu gradativamente em função do número de dias de exposição apenas na fração do corpo das moscas, enquanto que na região da cabeça, não se observou o mesmo padrão de acumulação. Assim, ressalta-se que mais estudos devem ser realizados sobre as variáveis envolvidas como, por exemplo, aumentar o número de dias de exposição (para entender quais são os efeitos causados ao longo do tempo), bem como a otimização do processo de amostragem, uma vez que se verificou uma ampla variação entre os resultados obtidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BITENCOURT, G. R. et al. On a single method for determining As and Hg in dietary supplements by CVG-MIP OES: optimization of the multimode sample introduction system. **Journal of Analytical Chemistry**, v.38, n.11, p.2342-2352, 2023.
- FERREIRA, S. L. C. et al. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices — A review. **Food Chemistry**, v.121, p.227-236, 2023.
- MUSACHIO, E. A. S. et al. Bisphenol A exposure is involved in the development of Parkinson like disease in *Drosophila melanogaster*. **Food Chemistry and Toxicology**, v.137, p.111-128, 2020.
- POETINI, M. R. et al. Improvement of non-motor and motor behavioral alterations associated with Parkinson-like disease in *Drosophila melanogaster*. Comparative effects of treatments with hesperidin and L-dopa. **NeuroToxicology**, v. 89, p.174-183, 2022.
- SILVA, N. C. et al. Efeito protetor do gama-orizanol contra a toxicidade induzida por manganês em *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p.17519–17531, 2021.