

## **PROTOCOLO DE PRÉ-TRATAMENTO DE BIOTA (INVERTEBRADOS) VISANDO A DETERMINAÇÃO DE METAIS**

### **1. Objetivo**

Fornecer a metodologia para pré-tratamento de amostras biológicas (invertebrados) visando à determinação de metais.

### **2. Descontaminação do material**

Todo o material a ser utilizado (colheres, pinças, placas de petri, recipientes de vidro e de plástico), que for entrar em contato com a amostra, deverá ser descontaminado da seguinte forma:

- i. Banho de detergente extran 2% (v/v) por pelo menos 24 horas. O material deverá ficar totalmente imerso na solução, de modo que o ar não fique retido no interior do recipiente. A solução de detergente deverá ser trocada a cada 15 dias, ou antes, se necessário, i.e. resíduos presentes no fundo do banho.
- ii. Rinsagem abundante com água deionizada;
- iii. Banho em ácido nítrico 10%(v/v) por pelo menos 24 horas. O material deverá ficar totalmente imerso na solução de modo que o ar não fique retido no interior do recipiente. Não colocar nenhum material constituído de metal (pinças ou bisturis de aço inox) ou que apresente restos de etiquetas e ou resíduos de marcadores permanentes e outros.
- iv. Lavagem com água deionizada (Milli-Q) em abundância.

Após a descontaminação, o material deverá ser seco em ambiente limpo, coberto e sem poeira. O material descontaminado deverá ser embalado em dois sacos plásticos.

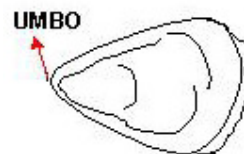
Os instrumentos de inox deverão ser descontaminadas diferentemente. Os materiais de inox deverão ser lavados apenas com água deionizada e detergente líquido neutro (Extran), com o auxílio de uma esponja. O manuseio de todo material deverá ser feito utilizando-se luvas sem talco.

### **3. Abertura de concha**

Toda coleta e manipulação das amostras e dos materiais utilizados deverão ser feitas mediante a utilização de luvas sem talco.

No laboratório, as conchas deverão ser lavadas externamente com água ultra pura (Milli-Q). Após a lavagem externa, as conchas devem ser acondicionadas em uma bandeja previamente descontaminada, e coberta com papel toalha.

Devido à resistência do material, as conchas deverão ser abertas com o auxílio de uma faca/bisturi de inox colocada na região do umbo, entre as duas valvas, como mostrado na figura ao lado. Nesta etapa do procedimento tem que haver bastante atenção para que a faca, mesmo descontaminada, não entre em contato com o tecido mole do animal. Para retirada do tecido mole deverá ser utilizada uma pinça ou colher de plástico ou aço de qualidade de material cirúrgico, sendo estes, previamente descontaminados. Por fim, o tecido mole deverá ser acondicionado em placas de petri, ou outro recipiente, devidamente identificado, no qual as amostras serão congeladas e, posteriormente, liofilizadas.



### **4. Liofilização das amostras**

Para a secagem das amostras, as mesmas deverão ser liofilizadas. As amostras deverão estar completamente congeladas antes de serem introduzidas no liofilizador. A liofilização deverá ocorrer em um período entre 12-24 horas. As amostras liofilizadas deverão ser acondicionadas em recipientes plásticos, previamente descontaminados, etiquetados e estocadas em dissecadores.

### **5. Moagem das amostras**

As amostras secas deverão ser cominuidas, preferencialmente, em moinhos de bolas ou criogênico. Para a ambientação do moinho deverá ser moído uma pequena massa (alíquota equivalente a aproximadamente 5 ml) de amostra durante o período de 2 minutos, ou período igual ao que vai ser utilizado durante o procedimento. Se for utilizado moinho de bolas, a cominuição de toda a amostra deverá ser feita em etapas, utilizando

massa equivalente a 15 ml, durante um período de 2 minutos. Deverão ser feitos ciclos suficientes para a moagem de toda a amostra.

As amostras moídas deverão ser colocadas nos mesmos recipientes de plástico onde estavam acondicionadas antes da cominuição e novamente estocadas em dissecadores.

## **6. Custódia da amostra**

Todos os recipientes utilizados no pré-tratamento da amostra deverão ser etiquetados com as seguintes informações: Local de coleta, data, estação de coleta e espécie. Caso exista a necessidade de maiores informações para identificação da amostra, as mesmas deverão ser colocadas nas etiquetas. Durante os trabalhos de pré-tratamento também deverá ser preenchida a planilha apresentada a seguir.

