

3

Parte experimental

3.1.

Material

- micropipetadora automática de 10 a 100 μL
- micropipetadora automática de 100 a 1000 μL
- frasco eppendorf de 2 mL
- suporte para frascos eppendorf
- seringa BD de 3 mL
- microseringa de 100 μL
- balões volumétricos
- unidades filtrantes de nylon 0,45 μm de poro e diâmetro de 13 mm Millipore
- cubetas de quartzo de 1 cm, de 4 faces polidas

3.2.

Reagentes

- água Milli-Q
- acetonitrila grau HPLC/Spectro JT Baker, Alemanha
- etanol grau HPLC, Merck, Alemanha
- enzima beta-glucoronidase aril-sulfatase (30 U mL^{-1} – 60 U mL^{-1}), Merck, Alemanha
- padrão de 1-hidroxipireno (100 ± 4 %) AccuStandard, Estados Unidos

3.3.

Instrumentação e equipamentos

- sistema cromatográfico líquido de alta eficiência Perkin Elmer Series 200, com detector de fluorescência, utilizando os parâmetros descritos no Quadro 1
- espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer
- centrífuga refrigerada IEC Centra MP4R

- banho-maria Quilmis Q-304-160
- balança analítica Mettler Toledo AT261 Delta Range

Quadro 1-Parâmetros operacionais do HPLC.

Parâmetro	Descrição
Bomba	Bomba para cromatografia a líquido Perkin Elmer Series 200
Detector	Detector de fluorescência Perkin Elmer Series 200a com lâmpada de Xenônio
Coluna	Coluna Perkin Elmer para HPLC C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvel e composição	Acetonitrila:água, 70:30
Tempo de corrida	5 minutos
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL

3.4. Metodologia

Como não estavam disponíveis Materiais de Referência Certificados (MRC) de bÍlis de peixe nem matriz de bÍlis de peixe sem contaminação durante a elaboração deste trabalho, optou-se por utilizar a própria matriz de amostras contaminadas para obtenção de alguns dos parâmetros de mérito necessários para a validação do método. Assim, para otimização e validação da metodologia proposta, foram utilizadas amostras de bÍlis de peixe da espécie *Mugil liza*, espécie escolhida por ser bastante encontrada e por já ter sido estudada com sucesso em trabalhos anteriores (Neves, 2006) do Laboratório de Estudos Ambientais. Os indivíduos foram coletados na Praia de Ipiranga, Magé, Rio de Janeiro, RJ, considerada uma área com histórico de contaminação por petróleo.

3.4.1. Coleta dos peixes e extração da bÍlis

Os peixes foram coletados e levados, em isopor com gelo, para o Laboratório de Estudos Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Assim que chegaram ao laboratório, os peixes foram abertos pelo poro urogenital (Figura 9). Após localização da vesícula biliar (Figura 10), as bÍlis

foram extraídas com a utilização de uma seringa (Figura 11) e armazenadas em frasco ependorf (Figura 12), na geladeira, a 4°C, até que fosse promovida a hidrólise das mesmas para posterior análise.



Figura 9-Abertura do peixe pelo poro urogenital.



Figura 10-Localização da vesícula biliar.

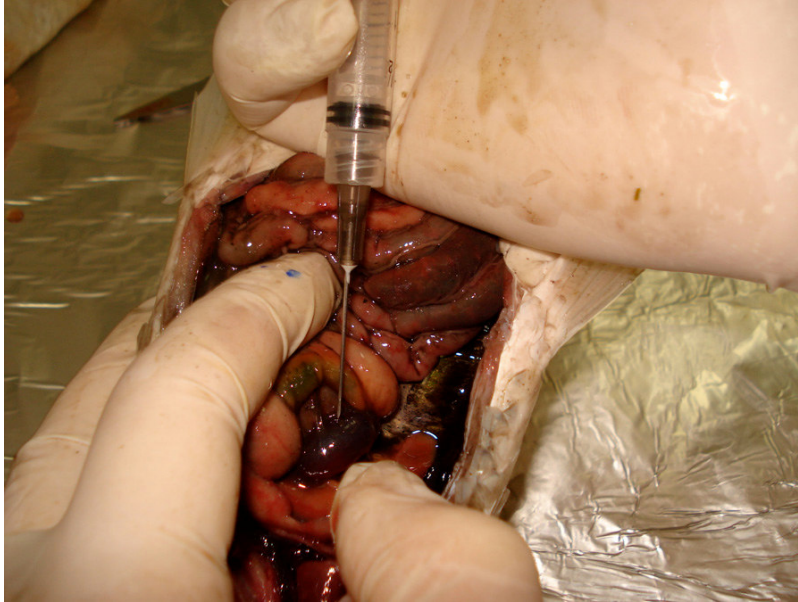


Figura 11-Retirada da bÍlis com auxílio de seringa.



Figura 12-BÍlis armazenada em ependorff.

Os volumes de bÍlis coletados ficaram, na maioria dos casos, entre 1 mL e 2 mL. A cor do líquido biliar variou bastante, devido às diferenças de *status* alimentar entre os indivíduos, apresentando, principalmente, colorações castanha, verde, verde musgo e amarelada.

3.4.2.

Espectroscopia de fluorescência molecular

3.4.2.1.

Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Para determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão foi feito um espectro de varredura do 1-hidroxipireno em espectrofluorímetro e foi determinado o melhor par de comprimentos de onda de excitação/emissão para este metabólito.

3.4.2.2.

Curva analítica no espectrofluorímetro

As curvas analíticas foram feitas a partir soluções-estoque independentes, pesando-se aproximadamente um miligrama de padrão de 1-hidroxipireno para cada solução em balança analítica. Esta massa foi solubilizada em etanol e avolumada a 100 mL em balão volumétrico com etanol 48%, proporção otimizada em trabalhos anteriores do Laboratório de Estudos Ambientais (Neves, 2006). A partir das soluções-estoque, foram preparadas soluções diluídas de concentrações na faixa de 1, 2, 4, 8 e 12 ng mL⁻¹. Cada solução foi lida em espectrofluorímetro, com excitação em 345 nm e emissão em 387 nm, par de comprimentos de onda de excitação e emissão otimizado no item anterior.

A escolha desta faixa de trabalho se deve ao fato de que trabalho anterior desenvolvido no Laboratório de Estudos Ambientais (Neves, 2006) cita que todas as amostras analisadas apresentaram concentração nesta faixa, em equivalentes de pireno.

3.4.2.3.

Análise das amostras de bÍlis no espectrofluorímetro

As amostras de bÍlis foram analisadas de duas maneiras:

i. apenas diluídas na proporção de 1:2000 com etanol 48% - trabalhos anteriores indicam, para determinação de metabólitos de HPA por fluorescência, diluição com etanol 48% na proporção de 1:1000 (Vuontisjärvi, 2004). Porém, em trabalho prévio desenvolvido no Laboratório de Estudos Ambientais (Neves,

2006), foi observado que a proporção de 1:2000 minimizava os efeitos de matriz. Decidiu-se, então, continuar utilizando a mesma proporção.

ii. hidrolisada – como a Literatura reporta diversas metodologias para hidrólise das amostras de bÍlis de peixe – algumas, inclusive, bastante parecidas – foi escolhido um procedimento que pudesse ser facilmente aplicável ao Laboratório de Estudos Ambientais, ou seja, uma metodologia cujos equipamentos e reagentes já estivessem disponíveis no laboratório ou pudessem ser facilmente adquiridos. Além disso, tentou-se escolher uma metodologia que não consumisse muito tempo e não gerasse muito resÍduo. Por conta destes fatores, decidiu-se utilizar a metodologia descrita por Ariese e colaboradores (1997), que consistiu dos seguintes passos:

- foram adicionados 10 µL da enzima β-glucoronidase/arilsulfatase e 480 µL de água a 10 µL de bÍlis;
- as amostras foram incubadas por duas horas a 37 °C;
- foram adicionados 500 µL de etanol;
- a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por três minutos a 4 °C;
- o sobrenadante foi filtrado por seringa contendo unidade filtrante de nylon 0,45 µm de poro e diâmetro de 13 mm;
- o sobrenadante foi então diluído com etanol 48 % para que ficasse com proporção final de 1:2000.

Tanto as amostras de bÍlis só diluídas quanto as hidrolisadas foram analisadas por fluorescência com o par de comprimentos de onda de excitação/emissão 345/387 nm.

3.4.3. Cromatografia a líquido de alta eficiência

3.4.3.1. Escolha da fase móvel

A Literatura reporta principalmente a utilização de dois conjuntos de solventes como fase móvel para análise de metabÓlitos de HPA por HPLC. Pikkarainen (2006), Richardson e colaboradores (2001), Ariese e colaboradores (1993 e 1997) e Vuontisjärvi e colaboradores (2004) utilizaram acetonitrila/água. Já Ruddock e colaboradores (2002 e 2003), Lin e colaboradores (1996), Silva e colaboradores (2006), Krahn e colaboradores (1984 e 1986) utilizaram

metanol/água. Assim, apesar de a metodologia utilizada para hidrólise e análise das amostras de bÍlis de peixe por HPLC (Ariese *et al*, 1997) indicar o uso de acetonitrila/água, decidiu-se testar também a utilização de metanol/água como fase móvel. Ambas as fases foram testadas utilizando-se a proporção isocrática de 70/30 solvente orgânico/água.

3.4.3.2.

Escolha do solvente para solubilização do padrão

A metodologia utilizada para hidrólise e análise das amostras de bÍlis de peixe por HPLC (Ariese *et al*, 1997) indica o uso de acetonitrila com ácido ascórbico para dissolução do padrão do 1-hidroxipireno para obtenção da curva analítica. Mesmo assim, foram testados também diferentes solventes para solubilização do padrão: etanol, metanol, acetonitrila e acetonitrila com ácido ascórbico.

Após escolha do solvente a ser utilizado para solubilização do padrão, foi testado se as diluições para obtenção das concentrações a serem utilizadas para confecção da curva analítica deveriam ser feitas com 100% de solvente orgânico ou se poderiam ser feitas utilizando-se uma mistura de solvente orgânico:água, a fim de diminuir os custos da análise. Testou-se, então, a diluição da solução-estoque de 1-hidroxipireno com 100% de acetonitrila e com uma mistura de acetonitrila/água, na proporção de 48/52.

3.4.3.3.

Escolha da programação de eluição

A referência escolhida para o desenvolvimento deste trabalho (Ariese, 1997) indica duas diferentes programações para separação e detecção dos metabólitos de HPA em bÍlis de peixe hidrolisada. A primeira programação, que está demonstrada na Tabela 5, é uma programação rápida e deve ser utilizada para análises mais rotineiras. A segunda programação, demonstrada na Tabela 6, tem tempo de corrida maior e é recomendada quando for desejada a identificação de metabólitos minoritários.

Tabela 5-Programação curta para análise de metabólitos de HPA.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	35	65
5	30	70
15	0	100

Tabela 6-Programação longa para análise de metabólitos de HPA.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	45	55
5	45	55
25	0	100
40	0	100

Além destas duas programações, foram testadas também três diferentes proporções de acetonitrila/água em eluição isocrática: 90/10, 50/50 e 70/30. Apesar de a eluição com gradiente geralmente diminuir o tempo da programação, sem sacrificar a resolução dos picos, otimizando a eficiência da separação, a programação isocrática também pode ser satisfatória, por causar pouca variação na pressão da bomba, já que não ocorre mudança na proporção dos solventes, causando pouca alteração nos tempos de retenção dos compostos.

Para escolha do gradiente de eluição, foram injetadas amostras contendo uma mistura de cinco HPA (naftaleno, fenantreno, pireno, 1-hidroxipireno e criseno), nas diferentes programações.

3.4.3.4. Curva analítica no HPLC

As curvas analíticas foram feitas a partir de soluções-estoque independentes, pesando-se aproximadamente um grama de padrão de 1-hidroxipireno para cada solução em balança analítica. Esta massa foi solubilizada em acetonitrila e avolumada a 100 mL em balão volumétrico. A partir das soluções-estoque, foram preparadas soluções diluídas de concentrações 0,2; 1; 4; 12 e 20 ng mL⁻¹. As soluções foram filtradas em unidades filtrantes e injetadas no cromatógrafo a líquido com o par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 345/387 nm.

3.4.3.5.**Análise das amostras de bÍlis no HPLC**

Para análise das amostras de bÍlis, o procedimento utilizado para a hidrólise foi o mesmo explicitado no item 3.4.2.3, baseado na metodologia descrita por Ariese e colaboradores (1997). A única diferença foi que, para análise por HPLC, o sobrenadante obtido ao final do procedimento não foi diluído, e sim, injetado diretamente no cromatógrafo a líquido.

As amostras e padrões foram analisados por cromatografia a líquido de alta eficiência, com os parâmetros listados no Quadro 2 e comprimentos de onda de emissão e excitação de 345/387 nm.

Quadro 2-Parâmetros operacionais do HPLC.

Parâmetro	Descrição
Bomba	Bomba para cromatografia a líquido Perkin Elmer Series 200
Detector	Detector de fluorescência Perkin Elmer Series 200a com lâmpada de Xenônio
Coluna	Coluna Perkin Elmer para HPLC C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm
Fase móvel e composição	Acetonitrila:água, 70:30
Tempo de corrida	5 minutos
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL

3.4.4.**Parâmetros de validação dos métodos**

Os parâmetros de validação dos métodos discutidos nesta dissertação foram calculados de acordo com o documento orientativo “Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos” do INMETRO, exceto os itens linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

As curvas analíticas obtidas para o 1-hidroxipireno por fluorescência, representada na Figura 15 (Item 4.1.2), e por HPLC, representada na Figura (Item 4.2.4) foram utilizadas para determinação dos parâmetros referentes à validação de cada método citados nos itens a seguir.

3.4.4.1. Linearidade

Neste trabalho, foi feita a análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear (Freitas, 2003), utilizando-se o software Minitab 15 English.

3.4.4.2. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi determinada como o intervalo que compreende os valores entre o limite de detecção do método e o maior valor de concentração utilizado para a construção da curva analítica, para cada método.

3.4.4.3. Sensibilidade

A sensibilidade é dada pela inclinação da reta de regressão de calibração, conforme a equação abaixo:

$$S = \frac{dx}{dC}, \text{ onde}$$

- S é a sensibilidade (inclinação da reta);
- dx é a variação da resposta;
- dC é a variação da concentração.

3.4.4.4. Limite de detecção

Existem várias maneiras de se calcular o limite de detecção. A maioria das metodologias para sua determinação implica na utilização de brancos de amostras. Como em HPLC não existem picos em amostras em branco, não é possível o cálculo de áreas, médias e desvios-padrão, que seriam necessários para o cálculo do limite de quantificação utilizando brancos de amostras. Portanto, para a metodologia utilizando HPLC, optou-se por analisar padrões do composto de estudo em concentrações cada vez menores, até que não se conseguisse mais visualizar o pico correspondente em seu tempo de retenção. Já para a técnica fluorimétrica, escolheu-se uma metodologia baseada nos parâmetros da curva analítica (Ribani, 2004), dada pela equação abaixo:

$$LD = \frac{3 * s}{S}, \text{ onde:}$$

- s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão, dada pelo valor do erro padrão obtido na estatística de regressão;
- S é a inclinação da reta.

3.4.4.5. Limite de quantificação

Para o cálculo do limite de quantificação, a maioria das metodologias também implica na utilização de brancos de amostras, o que, em HPLC, inviabiliza seu uso. Portanto, escolheu-se, também, uma metodologia baseada nos parâmetros da curva analítica, dada pela equação abaixo:

$$LQ = \frac{10 * s}{S}, \text{ onde:}$$

- s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão, dada pelo valor do erro padrão obtido na estatística de regressão;
- S é a inclinação da reta.

3.4.4.6. Precisão

3.4.4.6.1. Repetitividade

Para se determinar a repetitividade do método, optou-se por expressar o resultado como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV), com sete repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições, segundo a equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100, \text{ onde:}$$

- DPR é o desvio-padrão relativo
- DP é o desvio-padrão
- CMD é a concentração média determinada

Para o método utilizando fluorescência, uma mesma amostra de bÍlis foi contaminada com uma concentração conhecida de soluçŁo de 1-hidroxipireno. Sete replicatas da mistura contendo bÍlis e o HPA foram diluídas na proporçŁo de 1:2000 com etanol 48%, seguindo estudos anteriores do LaboratÓrio de Estudos Ambientais (Neves, 2006), apresentando concentraçŁo final em torno de 7 ng mL⁻¹. As amostras foram analisadas no espectrofluorÍmetro, com excitaçŁo em 345 nm e emissŁo em 387 nm.

Para o método utilizando HPLC, sete replicatas de uma mesma amostra de bÍlis foram contaminadas com o HPA, submetidas ao tratamento enzimático e injetadas em cromatÓgrafo a líquido, com excitaçŁo em 345 nm e emissŁo em 387 nm.

3.4.4.6.2. Reprodutibilidade

Como a reprodutibilidade É o grau de concordância entre os resultados das mediçŁes de um mesmo mensurando, efetuadas sob condiçŁes variadas de mediçŁo, neste trabalho, optou-se por variar o analista.

A reprodutibilidade foi feita da mesma maneira que a repetitividade, porém, desta vez, com um segundo analista fazendo o mesmo procedimento.

Os dados obtidos foram processados fazendo-se uso do programa Microsoft Ofluorescênciaice Excel. As equaçŁes utilizadas para obtençŁo da reprodutibilidade foram as seguintes:

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n$$

$$s_r^2 = MQ_{dentro}$$

$$s_R^2 = (s_r^2 + s_{entre}^2), \text{ onde}$$

- s_R^2 É a soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas
- MQ_{entre} É a soma dos mÍnimos quadrados entre os analistas
- MQ_{dentro} É a soma dos mÍnimos quadrados de cada analista

Para um nÍvel de significância de 95%:

$$R = 2,8 * \sqrt{S_R^2}$$

3.4.4.7. Recuperação

A recuperação foi avaliada fortificando-se amostras de bÍlis em três concentrações diferentes de 1-hidroxipireno, respectivamente 4,5 ng mL⁻¹, 9 ng mL⁻¹ e 18 ng mL⁻¹. Foram feitas seis replicatas para cada concentração.

O cálculo foi feito de acordo com a equação abaixo.

$$R(\%) = \frac{C1 - C2}{C3} * 100, \text{ onde}$$

- R (%) é a recuperação calculada, em porcentagem
- C1 é a concentração determinada na amostra adicionada
- C2 é a concentração determinada na amostra não adicionada
- C3 é a concentração adicionada