

5

Considerações finais

Neste trabalho, foram validadas e comparadas duas metodologias analíticas para determinação de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe. A espectroscopia de fluorescência fixa é uma técnica rápida, simples e de baixo custo, porém não é seletiva e não possibilita a quantificação dos HPA individuais. A cromatografia líquida de alta eficiência, por sua vez, é uma técnica quantitativa e bastante sensível que pode ser utilizada para análise de HPA em bÍlis de peixe.

Nos peixes, os HPA são biotransformados e armazenados na bÍlis na forma de metabólitos. Assim, em estudos utilizando bÍlis de peixes para avaliação da contaminação ambiental por HPA, para uma quantificação mais correta, é desejável que se faça a determinação dos metabólitos de HPA na bÍlis de peixes, e não dos HPA originais.

Na bÍlis dos peixes, os metabólitos de HPA se encontram na forma conjugada. Assim, torna-se necessário um procedimento para que o metabólito de HPA conjugado seja hidrolisado enzimaticamente e fique na forma livre. É desejável que esta etapa seja realizada quando for utilizada a análise por HPLC por dois motivos. Em primeiro lugar, se a etapa de hidrólise não for feita, compostos muito polares presentes na bÍlis (como o metabólito de HPA na forma conjugada) não serão separados e coeluirão no início da corrida cromatográfica, impedindo a separação e quantificação do composto em estudo. Após hidrólise, entretanto, o metabólito conjugado será transformado no metabólito livre menos polar, que poderá ser separado durante a corrida. Em segundo lugar, não há padrão disponível comercialmente de metabólitos conjugados, apenas de metabólitos livres, o que também não permitiria a quantificação destes compostos. Assim, foram feitas análises de amostras de bÍlis apenas diluídas por fluorescência molecular e de bÍlis hidrolisada por HPLC-F.

Foram feitas análises da bÍlis de peixe hidrolisada também por fluorescência molecular para se concluir se a hidrólise alteraria os resultados obtidos pela análise da bÍlis apenas diluídas. Pôde-se observar que as amostras diluídas apresentaram intensidade de sinal um pouco mais alta que as amostras

hidrolisadas. Porém, por se tratar de uma técnica semiquantitativa, acredita-se não ser necessária a etapa de hidrólise enzimática.

Da mesma forma, também foram analisadas amostras de bÍlis apenas diluídas por HPLC para efeito de comparação com as amostras hidrolisadas. Neste caso, foi observado que as amostras apenas diluídas não apresentaram intensidade de sinal no tempo de retenção do composto em estudo. Assim, pôde-se concluir que, no caso do HPLC, a etapa de hidrólise enzimática é fundamental para quantificação de metabólitos de HPA.

O metabólito 1-hidroxipireno foi escolhido como composto de referência por ser o metabólito mais frequentemente encontrado em estudos utilizando bÍlis de peixes.

Foi observado que os valores obtidos por fluorimetria são maiores do que os obtidos por HPLC. Como a técnica espectrofluorimétrica é semiquantitativa, todos os compostos presentes na bÍlis que fluoescem no mesmo comprimento de onda do composto em estudo serão quantificadas. Já na cromatografia líquida apenas o 1-hidroxipireno é detectado em seu comprimento de onda e tempo de retenção.

Os parâmetros de validação foram calculados para ambos os métodos e os cálculos das incertezas associadas aos métodos foram discutidos. A técnica fluorimétrica apresentou menores valores de limite de quantificação e reprodutibilidade e menor incerteza. A técnica utilizando HPLC, por sua vez, apresentou menores limite de detecção e repetitividade. Nas duas técnicas estudadas, a contribuiu mais significativa para a incerteza dos métodos foi devida às soluções diluídas utilizadas para construção da curva analítica. Acredita-se que, em estudos posteriores, mais fontes de incerteza que não puderam ser contempladas neste trabalho, devam ser contempladas, se possível, para uma estimativa mais real das incertezas associadas aos métodos.

Como as técnicas estudadas apresentaram uma boa correlação, este trabalho demonstra a aplicabilidade de ambas as técnicas aqui discutidas no monitoramento ambiental. A técnica fluorimétrica é indicada para testes de avaliação preliminar, onde não são necessários resultados quantitativos, apenas uma estimativa a respeito de contaminação ou não de determinado ambiente. Por ser uma técnica de baixo custo, rápida, cujo equipamento é de fácil manutenção e operação, pode ser utilizada em análises de rotina. Já a técnica cromatográfica apresenta alto custo de manutenção e operação e análises mais demoradas, sendo indicada como uma segunda etapa na avaliação da contaminação ambiental, onde seriam analisadas apenas as amostras que

apresentassem algum sinal da presença de contaminantes na técnica fluorimétrica, para sua real quantificação.