

6 Determinação de HPAs em peixes

Várias técnicas analíticas têm sido usadas para determinar os níveis de HPAs e seus metabólitos em peixes. As técnicas mais comumente usadas incluem a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/FID), cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta ou de fluorescência (CLAE/UV, CLAE/F), cromatografia de camada fina com detector de fluorescência. Além destas técnicas quantitativas podem ser usadas técnicas semi-quantitativas de fluorescência, técnicas de imunoensaio, entre outras.

Como matrizes podemos ter o tecido de diversos órgãos, e fluidos biológicos como sangue e bÍlis. Por ser uma matriz complexa, a análise do tecido exige uma etapa de extração dos HPAs da matriz e “*clean up*” antes da análise propriamente dita, sendo um procedimento caro e demorado. Já a análise da bÍlis do peixe é uma técnica mais simples pois não são necessárias etapas de extração.

6.1. Técnicas de extração e *clean-up*

O objetivo da extração é separar o HPA da matriz, com mínima coextração de outros compostos e mínima degradação do HPA extraído. As amostras devem ser extraídas o mais rápido possível após sua coleta, para minimizar a degradação, sublimação e outras rotas de perda dos HPAs. Como exemplo de perda por armazenagem temos a adsorção de HPAs nas paredes dos frascos de vidro de amostras aquosas. Já em solventes orgânicos o HPA parece ser estável (Bjørseth, 1983).

Como os HPAs se degradam facilmente na presença de radiação ultravioleta, deve-se evitar expor as amostras durante as etapas de extração e análise, a fim de evitar sua fotodecomposição. A degradação térmica e a

sublimação também podem causar perdas de HPA durante a extração. É recomendado que sejam usados solventes relativamente voláteis em procedimentos de refluxo ou destilação para permitir a concentração do extrato em baixas temperaturas. Manter a temperatura abaixo de 45 °C reduz ou até elimina as perdas de HPAs. Mas, a perda de HPAs com dois anéis pode chegar até a 80% na concentração do extrato por evaporador rotativo (Bjørseth, 1983).

Os métodos de extração mais comuns são:

- **Extração com solvente:** Soxhlet, ultra-som, extração mecânica de alta intensidade e extração líquido-líquido;
- **Extração por métodos térmicos:** sublimação e destilação;
- **Extração em fase sólida:** carbono, resinas macrorreticulares, sílica gel, florisil, alumina, fase sólida ligada a sílica;
- **Métodos de digestão.**

Na extração com solvente, a eficiência da extração dos HPAs depende da polaridade do solvente usado, da natureza da matriz e da preparação das amostras.

Matrizes complexas como alimentos contém uma série de compostos hidrofóbicos e é necessário que haja uma etapa de *clean-up* para que estes sejam removidos.

Para o *clean-up* de amostras existe uma série de procedimentos que podem ser usados tais como: fracionamento solvente:solvente, extração em fase sólida, cromatografia de camada fina, cromatografia em coluna e cromatografia por exclusão. Um dos métodos mais eficientes e seletivos é a coluna cromatográfica com $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de atividade IV. Eluentes como o hexano, extraem todos os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos não polares enquanto os componentes que correspondem a maior quantidade de material dissolvido, como os lipídios, ficam adsorvidos na coluna. Este procedimento foi sugerido como método de escolha para o padrão ISO (Stolyhwo & Sikorski, 2005). Já para matrizes de alto teor de lipídio, foi demonstrado que o uso da cromatografia por permeação em gel, embora seja uma técnica mais cara, dá melhores resultados (Rizel, 2003).

6.2. Determinação de HPAs em bÍlis de peixe

Como o metabolismo de vertebrados é eficaz na biotransformação e eliminação de HPAs, eles não se acumulam no tecido de peixes. Assim, os níveis de HPAs no tecido não são considerados um bom marcador de bioacumulação destes compostos já que não refletem os níveis destes xenobióticos no meio ambiente (van der Oost *et al.*, 2003). Assim, vários cientistas passaram a usar a análise de metabólitos de HPAs em bÍlis de peixe para monitorar o meio ambiente e demonstrar sua correlação com a exposição a estes compostos (Krahn *et al.*, 1984; Beyer *et al.*, 1996, 1998; Lin *et al.*, 1996; Aas *et al.*, 1998, 2000; Verweij *et al.*, 2004; Haugland *et al.*, 2005).

Neste tipo de análise os compostos presentes na bÍlis são metabólitos, produto da biotransformação dos HPAs no seu fÍgado, sendo compostos hidroxilados e conjugados. Estes metabólitos refletem a exposição dos peixes aos HPAs de 2 a 3 dias, onde a migração dos peixes não deve exercer influência nos resultados (Ariese *et al.*, 1993).

O primeiro trabalho onde os metabólitos de HPAs na bÍlis de peixe foram usados como biomarcadores foi publicado em 1984 por Krahn e colaboradores. Neste trabalho foi usada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE-F), sem a separação completa ou identificação dos metabólitos individuais. Os comprimentos de onda de excitação e emissão usados foram, respectivamente, 380/430 nm para medir metabólitos do tipo benzo(a)pireno e 290/335 nm para medir metabólitos do tipo naftaleno.

Em 1993 Ariese e colaboradores, usando peixes contaminados em cativeiro, demonstraram existir correlação entre o método de determinação por CLAE-F e por fluorescência sincronizada (*Synchronous Fluorescence Spectroscopy* - SFS) para os comprimentos de onda de excitação e emissão de 380/430 nm. No ano seguinte, Lin e colaboradores publicam um segundo trabalho usando esta mesma técnica.

Em 1996 Lin e colaboradores estudaram o uso da medição por fluorescência fixa (*Fixed Fluorescence* - FF) de metabólitos do tipo naftaleno e metabólitos do tipo benzo(a)pireno, comparando com análises por cromatografia. Neste estudo foram usados 3 diferentes tipos de peixes. Foi encontrada forte correlação entre as duas técnicas, sendo as medições por FF, em geral,

menores que as medições feitas por CLAE-F. Além disso, foi demonstrado que com a utilização desta técnica foi possível discriminar locais impactados de outros não impactados.

Atualmente, são empregadas usualmente 5 técnicas diferentes, sendo três semi-quantitativas: fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão fixos (FF) e comprimentos de onda de excitação e emissão sincronizados (SFS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Fluorescência (CLAE/F). Para a separação e quantificação dos HPAs podem ser usadas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Fluorescência (CLAE/F) ou Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de Massas (CG/EM) (Figura 12) (Ariese *et al.*, 2005b).

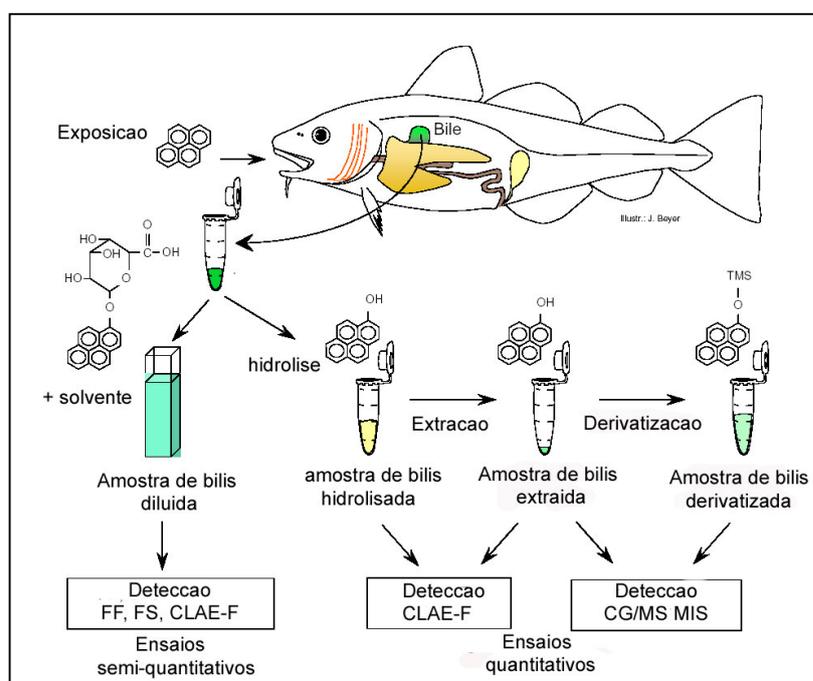


Figura 12. Métodos de determinação de HPAs em bÍlis de peixe (adaptado de Ariese *et al.*, 2005b).

A vantagem de usar as técnicas semi-quantitativas é a sua rapidez e baixo custo, já que não é necessária uma etapa de “clean up”, sendo indicadas para o monitoramento ambiental em casos de derrame de óleo. No caso da CLAE, para que esta técnica seja quantitativa a bÍlis deve ser hidrolisada enzimaticamente, permitindo a detecção dos compostos hidroxilados livres. Para a análise por cromatografia gasosa é necessária uma etapa de extração para separar os HPAs hidrolisados da matriz e a derivatização pode ser usada para aumentar a separação e sensibilidade. Este método é o mais indicado para a

análise de HPAs com 2 e 3 anéis por sua seletividade, sendo indicado para a análise de exposição à petróleo. Já o CLAE é mais indicado para a detecção de compostos com 4 ou 5 anéis, sendo indicado para contaminação por HPAs resultantes de processos de combustão (Ariese *et al.*, 2005b).

Além de sua simplicidade e baixo custo, alguns autores demonstraram que as análises de bÍlis de peixe por fluorescência fixa têm uma boa correlação com as análises feitas por CLAE com detetor de fluorescência, indicando que esta técnica é uma boa ferramenta para o monitoramento de HPAs na bÍlis de peixe. (Lin *et al.*, 1996; Vuontisjärvi *et al.*, 2004).

Nesta dissertação foi usada a técnica espectroscópica de Fluorescência Fixa (Fixed Fluorescence) para o estudo semi-quantitativo dos metabólitos de HPAs na bÍlis dos peixes coletados na Baía de Guanabara.

6.3. Fluorescência molecular

Quando orbitais atômicos se combinam formam um orbital molecular ligante, de energia mais baixa, e um orbital molecular anti-ligante, de energia mais alta. No estado fundamental, os elétrons de uma molécula ocupam os orbitais de energia mais baixos. A ligação dupla em uma molécula orgânica contém dois tipos de orbitais moleculares, um orbital *sigma* (σ), correspondente a um par de elétrons ligantes e um orbital molecular *pi* (π) associado a outro par. Os orbitais π são formados pela superposição paralela de orbitais p atômicos. Muitos compostos orgânicos contém elétrons não-ligantes e esses elétrons não-compartilhados são designados pelo símbolo n.

No estado fundamental, os HPAs são sistemas onde todos os orbitais π ligantes estão ocupados por dois elétrons com spins opostos e todos os orbitais π antiligantes (π^*) estão desocupados e os orbitais estão em simetria. As energias dos orbitais mais externos são particularmente importantes para as propriedades físico-químicas dos HPAs, já que suas energias determinam as propriedades dos HPAs. Os elétrons responsáveis pela formação dos orbitais moleculares π são os elétrons $2p_z$ do carbono (Bjørseth, 1983).

Conforme mostrado na Figura 13, as energias dos vários tipos de orbitais moleculares diferem significativamente. Quase sempre o nível de energia de um elétron não-ligante situa-se entre os níveis de energia dos orbitais σ e π ligantes

e antiligantes. As transições eletrônicas entre certos níveis de energia podem ocorrer por absorção de radiação (Skoog, 2002).

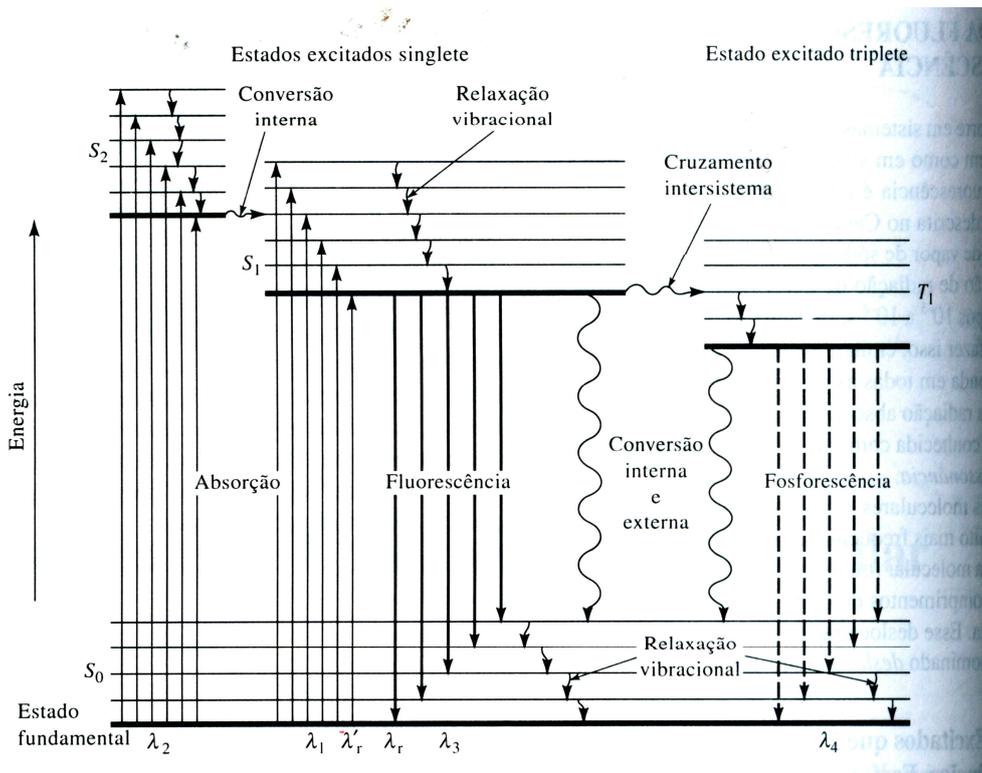


Figura 13. Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente (fonte: Skoog, 2002).

Todos os compostos orgânicos são capazes de absorver radiação eletromagnética já que todos contêm elétrons de valência que podem ser excitados a níveis de energia mais altos. As energias de excitação associadas a elétrons formando a maior parte ligações simples são altas, de modo que a absorção por elas está restrita à chamada região ultravioleta de vácuo (comprimento de onda (λ) < 185 nm). As dificuldades experimentais associadas com o ultravioleta de vácuo são significativas e como conseqüência, a maioria das investigações espectrofotométricas de compostos orgânicos envolve a região de comprimento de onda maior que 185 nm.

A absorção de radiação visível e de ultravioleta de maior comprimento de onda está restrita a um número limitado de grupos funcionais (grupos cromóforos) que contêm elétrons de valência com energia de excitação relativamente baixas. Como o estado excitado é instável os elétrons excitados pela absorção de fótons voltam ao seu estado fundamental (processo de relaxação ou desativação) (Figura 13). Os processos de relaxação podem ser

não radiativos como a relaxação vibracional, a conversão interna e a conversão externa (Skoog, 2002). Quando ocorre o cruzamento intersistema o spin de um elétron excitado é invertido e se tornando não-emparelhado com o elétron no estado fundamental. A probabilidade dessa transição é aumentada se os níveis vibracionais dos dois estados se interpenetram (Figura 13). Após o cruzamento para um estado triplete pode ocorrer desativação do estado eletrônico excitado por conversão interna ou externa ou por emissão de fóton (fosforescência).

Se a diferença de energia entre o estado singleto excitado e o estado fundamental é significativa, o retorno do estado excitado singleto para o estado fundamental pode ocorrer por emissão de fóton, fluorescência e o grupo cromóforo é chamado de fluoróforo.

As moléculas aromáticas, com sua estrutura rígida, têm menos graus de liberdade vibracional que as moléculas alifáticas e são a classe de compostos que mais frequentemente apresentam fluorescência (Sharma & Schulman, 1999).

A intensidade de fluorescência (I_F) é diretamente proporcional à intensidade do feixe de excitação (I_0), a absorvância ($\epsilon b C$) e o rendimento quântico (Φ_F) da espécie, definidos pela equação:

$$I_F = K_F I_0 \Phi_F \epsilon b C \quad (9)$$

onde K_F é uma constante de proporcionalidade, função da resposta instrumental no momento da detecção, ϵ é a absorvidade molar, b é o comprimento percorrido pelo feixe na amostra e C a concentração da espécie fluorescente.

O rendimento quântico é a razão do número de moléculas luminescentes pelo número total de moléculas excitadas. A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não-substituídos fluoresce em solução e a eficiência quântica aumenta com o número de anéis e seu grau de condensação.