



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS**

**João Carlos Jacinto da Cunha de Souza**

**Ribeirão Preto  
2021**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientado:** João Carlos Jacinto da Cunha de Souza

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2021

SOUZA, J.C.J.C.	<b>Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS</b>		MESTRADO FCFRP - USP 2021
--------------------	---	--	------------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, João Carlos Jacinto da Cunha de

Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS).  
Ribeirão Preto, 2021.

75 p: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Junior, Fernando.

1. AALLME. 2. DLLME. 3. Metabólitos mono-hidroxilados de HPAs. 4. Urina. 5. GC-MS 6. Biomonitoramento humano

## FOLHA DE APROVAÇÃO

João Carlos Jacinto da Cunha de Souza

Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Professor Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa dissertação à Cláudia,  
minha mãe, por todo amor e carinho  
recebidos durante toda a minha vida.**

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior, pela oportunidade e por toda compreensão e conhecimento compartilhado.

À Universidade de São Paulo, e aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do Mestrado;

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Toxicologia Analítica e de Sistemas, pelos bons momentos compartilhados e conhecimento compartilhados. Em especial, à Marília e ao Bruno, por todo suporte, aprendizado, paciência e amizade.

À Vanessa Cristina de Oliveira Souza, por todo apoio e conselhos durante esse período.

Ao meu Avô por todo apoio e conselhos nessa etapa desafiadora da minha vida.

À Maria Therezinha, Balila e Paulinha por estarem sempre torcendo pela minha felicidade e pelo meu sucesso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (número do processo: 2018/11150-7).

E a todos os meus amigos e familiares não mencionados que também sempre estiveram presentes durante a minha vida, meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**“Seu tempo é limitado, portanto não o desperdice vivendo a vida de outra pessoa. Não caia na armadilha do dogma, baseando-se no resultado do pensamento alheio. Não deixe o ruído da opinião dos outros afogar sua voz interior. E o mais importante: tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. De alguma forma eles já sabem no que você realmente quer se transformar.”**

**Steve Jobs**

## RESUMO

SOUZA, J. C. J. C. **Comparação da técnica de microextração líquido-líquido assistida por ar e a microextração líquido-líquido dispersiva para determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina por GC-MS.** 2021. 75f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são poluentes orgânicos persistentes formados durante a combustão incompleta da matéria orgânica sendo onipresentes no solo, água e ar. Estes compostos são conhecidos por promover a formação de moléculas carcinogênicas em organismos vivos, além de serem potenciais desreguladores endócrinos. O biomonitoramento humano (BH) consiste na medida periódica de determinada substância química ou seu metabólito no sangue ou urina de uma população. O BH é comum em países desenvolvidos, porém ainda é uma prática incipiente no Brasil. Um dos grandes desafios do BH é dispor de metodologias analíticas simples e rápidas. Em face do exposto dois métodos de preparo de amostras, a microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), foram desenvolvidos para a determinação simultânea dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (OH-HPAs) em urina empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). As vantagens de cada método foram investigadas. Na AALLME, pequenas gotículas do solvente extrator foram imediatamente formadas por sucção com uma seringa de vidro e injeção da mistura de uma solução aquosa de amostra e um solvente extrator num tubo de polipropileno por várias vezes. Na DLLME, as pequenas gotículas foram formadas com o auxílio de um solvente dispersor. A influência de diferentes fatores, como tipo e volume de solvente extrator, força iônica, pH, modo e tempo de agitação, foram otimizados para ambas técnicas de extração. Comparando os métodos otimizados da AALLME e DLLME, a primeira apresenta algumas vantagens relevantes sobre a segunda técnica, como a não necessidade de uso do solvente dispersor, que pode ser tóxico ao meio ambiente. Ambas técnicas apresentaram faixas de eficiência de extração similares para os analitos alvos, correspondendo a 15,24 – 91,61% para a AALLME e, 16,44 – 82,87% para DLLME. Desta forma, a AALLME foi selecionada para análise de algumas figuras de mérito e aplicação em amostras de urina humana. Para avaliar a aplicabilidade do método, 20 amostras de urinas foram analisadas e apresentaram concentrações detectáveis para o 1-hidroxinaftaleno (1-NAF) e 2-hidroxinaftaleno (2-NAF) em 45% e 25% das amostras, em concentrações que variaram de 0,87 a 7,59 ng/mL e 1,86 a 7,24 ng/mL respectivamente. O 9-hidroxiifenantreno (9-HFE), apresentou a mais alta porcentagem de detecção e quantificação, correspondendo a 60% do total de amostras analisadas em concentrações que variaram de 3,71 a 5,59 ng/mL. O 2-hidroxi fluoreno (2-HFL) e o 9-hidroxi fluoreno (9-HFL) foram quantificados em 10% e 25% das amostras, em concentrações variando de 1,12 a 1,43 ng/mL e de 0,58 a 8,58 ng/mL. A concentração do 1-hidroxipireno (1-OHP) em todas as amostras analisadas foi abaixo do limite de detecção. Portanto, o método aqui proposto é uma alternativa simples e rápida para aplicação em estudos de BH, sendo capaz de determinar 6 analitos de OH-HPAs simultaneamente com uso de baixo volume de solventes orgânicos.

*Palavras-chave:* AALLME; DLLME; metabólitos mono-hidroxilados de HPAs; urina; GC-MS; biomonitoramento humano.

## ABSTRACT

SOUZA, J. C. J. C. **Comparison of air-assisted liquid-liquid microextraction technique and dispersive liquid-liquid microextraction to determine the major monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by GC-MS.** 2021. 75f. Dissertation (Master's). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants formed during the incomplete combustion of organic matter and are ubiquitous in soil, water and air. These compounds are known to promote the formation of carcinogenic molecules in living organisms and are potential endocrine disruptors. Human biomonitoring (BH) consists of the periodic measurement of a certain chemical substance or its metabolite in the blood or urine of a population. The BH is common in developed countries, but it is still an incipient practice in Brazil. One of the great challenges of BH is to have quick and simple analytical methodologies. Therefore, two sample preparation methods, air-assisted liquid-liquid microextraction (AALLME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), were developed for the simultaneous determination of the main monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-HPAs) in urine using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The advantages of each method were investigated. In AALLME, small droplets of the solvent extractor were immediately formed by suction with a glass syringe and injecting the mixture of an aqueous solution of sample and a solvent extractant in a polypropylene tube several times. In DLLME, small droplets were formed with the aid of a dispersing solvent. The influence of different factors, such as type and volume of extractor solvent, ionic strength, pH, mode and time of agitation, were optimized for both extraction techniques. Comparing the optimized methods of AALLME and DLLME, the first presents some relevant advantages over the second technique, such as the non-need to use the dispersing solvent, which can be toxic to the environment. Both techniques showed similar extraction efficiency ranges for the target analytes, corresponding to 15.24 – 91.61% for AALLME and 16.44 – 82.87% for DLLME. Thus, AALLME was selected for analysis of some figures of merit and application in human urine samples. To evaluate the applicability of the method, 20 urine samples were analyzed and showed detectable concentrations for 1-hydroxynaphthalene (1-NAF) and 2-hydroxynaphthalene (2-NAF) in 45% and 25% of the samples, in concentrations that varied from 0.87 to 7.59 ng/mL and 1.86 to 7.24 ng/mL respectively. The 9-hydroxyphenanthrene (9-HFE), presented the highest percentage of detection and quantification, corresponding to 60% of the total samples analyzed in concentrations ranging from 3.71 - 5.59 ng/mL. 2-hydroxyfluene (2-HFL) and 9-hydroxyfluene (9-HFL) were quantified in 10% and 25% of the samples, in concentrations ranging from 1.12 to 1.43 ng/mL and from 0.58 to 8.58 ng/mL. The concentration of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in all samples analyzed was below the detection limit. Therefore, the method proposed here is a simple and quick alternative for application in BH studies, being able to determine 6 analytes of OH-HPAs simultaneously with the use of low volume of organic solvents.

*Keywords:* 1. AALLME. 2. DLLME. 3. PAH monohydroxylated metabolites. 4. Urine. 5. GC-MS 6. Human biomonitoring.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Etapas da DLLME.....	18
Figura 2 – Etapas AALLME.....	19
Figura 3 – Estrutura dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados no estudo.....	22
Figura 4 – Espectro de massas do 1-hidroxinaftaleno-d7 (1-NAF-D7).....	28
Figura 5 – Espectro de massas do 1-hidroxinaftaleno (1-NAF). ....	29
Figura 6 – Espectro de massas do 2-hidroxinaftaleno (2-NAF). ....	29
Figura 7 – Espectro de massas do 9-hidroxi fluoreno (9-HFL). ....	29
Figura 8 – Espectro de massas do 2-hidroxi fluoreno (2-HFL). ....	30
Figura 9 – Espectro de massas do 9-hidroxifenantreno (9-HFE). ....	30
Figura 10 – Espectro de massas do 1-hidroxipireno (1-OHP). ....	30
Figura 11 – Cromatogramas e a razão massa/ carga (m/z) dos íons monitorados no modo SIM (monitoramento seletivo de íons) na concentração de 15 ng/mL.....	31
Figura 12 – Escolha do solvente extrator.....	33
Figura 13 – Escolha do solvente dispersor. ....	34
Figura 14 – Avaliação do volume do solvente extrator. ....	35
Figura 15 – Avaliação do volume do solvente dispersor.....	36
Figura 16 – Avaliação do pH da amostra. ....	37
Figura 17 – Avaliação da força iônica. ....	38
Figura 18 – Avaliação do modo da agitação.....	39
Figura 19 – Avaliação do tempo da agitação.....	40
Figura 20 – Escolha do solvente extrator na AALLME. ....	41
Figura 21 – Avaliação do volume do solvente extrator na AALLME.....	42
Figura 22 – Influência do número de ciclos de extração. ....	43

Figura 23 – Avaliação do pH da amostra. ....	44
Figura 24 – Avaliação da força iônica. ....	45
Figura 25 – Avaliação do modo da agitação.....	46
Figura 26 – Avaliação do tempo da agitação.....	47
Figura 27 – Avaliação da eficiência de extração DLLME vs. AALLME. ....	48
Figura 28 – Curvas analíticas para os seis metabólitos de OH-HPAs na faixa de concentração de 1,75 a 20 ng/mL de urina. ....	49
Figura 29 – Cromatograma obtido a partir da análise de urina sintética (amostra branco) e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 20 ng/mL de urina. ....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Razão massa/carga (m/z) dos íons monitorados: .....	23
Tabela 2 – Temperaturas de aquecimento do forno.....	31
Tabela 3 – Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), equação da reta e coeficiente de correlação (r) dos compostos.....	50
Tabela 4 – Efeito matriz para os metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (OH-HPA) em urina sintética.....	50
Tabela 5 – Limite de quantificação do método para determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=10). .....	52
Tabela 6 – Precisão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=6 para cada controle de qualidade).....	53
Tabela 7 – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=6 para cada controle de qualidade).....	53
Tabela 8 – Comparação das características analíticas do método validado de AALLME para quantificação de OH-HPA em urina com outros estudos descritos na literatura. ....	54
Tabela 9 – Concentração determinada para cada metabólito de OH-HPAs em amostras de urina humana. Os valores são expressos em ng/mL de urina. ....	55

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>1-NAF</b>	1-hidroxi-naftaleno
<b>1-NAF-D7</b>	1-naftol-deuterado
<b>1-OHP</b>	1-hidroxipireno
<b>2-HFL</b>	2-hidroxifluoreno
<b>2-NAF</b>	2-hidroxi-naftaleno
<b>9-HFE</b>	9-hidroxifenantreno
<b>9-HFL</b>	9-hidroxifluoreno
<b>AALLME</b>	microextração líquido-líquido assistida por ar
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CV</b>	coeficiente de variação
<b>DLLME</b>	microextração líquido-líquido dispersiva
<b>EPR</b>	erro padrão relativo
<b>FMN</b>	fator de matriz normalizado
<b>GC-MS</b>	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
<b>LC-MS/MS</b>	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
<b>LLE</b>	extração líquido-líquido
<b>LOD</b>	limite de detecção
<b>LOQ</b>	limite de quantificação
<b>p.c.</b>	peso corpóreo
<b>RDC</b>	resolução da diretoria colegiada
<b>SD</b>	desvio padrão
<b>SPE</b>	extração em fase sólida
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

**LISTA DE SÍMBOLOS**

<b>%</b>	porcentagem
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>&lt;</b>	menor que
<b>±</b>	mais ou menos
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	cloreto de cálcio dihidratado
<b>g</b>	gramas
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato de potássio monobásico
<b>KSCN</b>	tiocianato de potássio
<b>L</b>	litros
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mL</b>	mililitros
<b>mTorr</b>	miliTorr
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	fosfato de sódio dibásico
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sódio
<b>ng</b>	nanograma
<b>ng</b>	nanogramas
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico

**rpm** rotações por minuto

**V** volts

## SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABELAS .....	V
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS .....	11
1.2. EXPOSIÇÃO AOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E FORMAÇÃO DE SEUS METABÓLITOS .....	11
1.3. TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SEUS METABÓLITOS .....	13
1.4. BIOMONITORAMENTO .....	14
1.5 PREPARO DE AMOSTRAS .....	16
1.5.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	<b>16</b>
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 SOLUÇÕES PADRÃO E REAGENTES .....	21
3.2 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA .....	23
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	24
3.4 FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS.....	28
4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA POR DLLME .....	32
4.2.1 Escolha do solvente extrator .....	32
4.2.2 Escolha do solvente dispersor .....	33
4.2.3 Volume do solvente extrator .....	34
4.2.4 Volume do solvente dispersor .....	35
4.2.5 Avaliação do efeito do pH da amostra .....	36
4.2.6 Avaliação da força iônica na DLLME .....	37
4.2.7 Avaliação da agitação.....	38
4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA POR AALLME .....	40
4.3.1 Escolha do solvente extrator .....	40
4.3.2 Avaliação do volume de solvente extrator na AALLME.....	41
4.3.3 Avaliação do número de ciclos de aspiração e dispensação .....	43
4.3.4 Avaliação do efeito do pH na AALLME .....	44
4.3.5 Avaliação do efeito da força iônica na AALLME .....	44
4.3.6 Avaliação do modo e tempo de agitação na AALLME .....	45

4.3.7 Avaliação da eficiência de extração DLLME <i>versus</i> AALLME .....	47
5. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO.....	48
5.1 LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	48
5.2 SELETIVIDADE.....	51
5.3 EFEITO MATRIZ .....	52
5.4 PRECISÃO E EXATIDÃO.....	52
5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM URINA HUMANA .....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
ANEXOS.....	64
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO FCFRP - USP ...	64
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos que apresentam estrutura básica formada por carbono e hidrogênio, e constituídos por dois ou mais anéis aromáticos, apresentando uma variedade de estruturas e isômeros. Dentre suas propriedades físico-químicas destacam-se a baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor, e altos pontos de fusão e ebulição (WHO, 1998). Os HPAs são compostos onipresentes e poluentes com relativa abundância no ambiente, uma vez que sua formação tem origem na combustão incompleta da matéria orgânica, através de processos naturais, e por inúmeras atividades humanas. (ANDERSSON; ACHTEN, 2015). São utilizados, principalmente, como intermediários na produção de plastificantes, pigmentos, corantes e pesticidas. A combustão do carvão, a queima de biomassa, a exaustão veicular e o uso de óleos lubrificantes são considerados fontes ambientalmente relevantes de HPA (WHO, 1998).

A classe dos HPAs apresenta mais de 100 compostos, dentre os quais dezesseis são listados como poluentes prioritários de acordo com a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos EUA). A fim de prevenir a exposição humana a esses contaminantes, a USEPA recomenda o monitoramento em rotina dos dezesseis poluentes prioritários em amostras de ar, solo e água. O monitoramento ambiental de HPAs é uma ferramenta importante no controle da poluição, mas fornece informações limitadas sobre a exposição humana e os subsequentes riscos para a saúde, já que esses compostos precisam de ativação metabólica para expressar efeitos deletérios à saúde humana (ANDERSSON; ACHTEN, 2015).

### 1.2. Exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e formação de seus metabólitos

A exposição humana aos HPAs ocorre principalmente através da inalação do ar poluído e/ou fumaça de cigarro, por absorção dérmica e ingestão. A água e o alimento contaminados são as principais fontes de ingestão de HPAs para seres humanos não expostos ocupacionalmente. Esses alimentos podem ser contaminados tanto pelo processo de processamento ou cozimento, quanto pela deposição atmosférica, incluindo carnes grelhadas

ou carbonizadas, cereais, farinha, pão e vegetais (RIBEIRO, 2001; SROGI, 2007; MA; HARRAD, 2015; MOUSTAFA et al., 2015).

A biotransformação hepática do HPAs se inicia com a oxidação pelas monooxigenases do citocromo P450 (fase I), formando intermediários de epóxido reativo, seguido por redução ou hidrólise em derivados hidroxilados (metabólitos mono-hidroxilados de HPAs - OH-HPAs). No metabolismo de fase II, os OH-HPAs são conjugados com ácido glicurônico ou sulfato para aumentar a sua solubilidade em água (LI et al., 2006). De acordo com o peso molecular, os conjugados de OH-HPAs com dois ou três anéis aromáticos são ser excretados na urina, e aqueles com 4 ou mais anéis são excretados nas fezes (RAMESH et al., 2004).

Os metabólitos comumente formados e detectados em urina incluem o 1-hidroxi-naftaleno, 2-hidroxi-naftaleno, 2-hidroxi-fluoreno, 3-hidroxi-fluoreno, 9-hidroxi-fluoreno, 1-hidroxi-fenantreno, 2-hidroxi-fenantreno, 3-hidroxi-fenantreno, 4-hidroxi-fenantreno, 1-hidroxi-pireno (ELOVAARA; VÄÄNÄNEN; MIKKOLA, 2003; VAN DE WIELE et al., 2004; XIA et al., 2009; DOBRACA et al., 2018; CDC, 2018).

A seleção de um biomarcador de exposição é uma etapa crucial durante os estudos de biomonitoramento humano. De acordo com estudos já descritos na literatura, o 1-hidroxi-pireno (principal metabólito mono-hidroxilado do pireno) é um biomarcador de escolha para avaliar a exposição à combustão da gasolina e diesel (LANKOVA et al., 2016).

No entanto, o pireno não é classificado como carcinógeno, e a determinação do seu produto de biotransformação não se torna muito relevante durante a avaliação de risco para a saúde humana. Ademais, considerando que o benzo[a]pireno é um representante chave dos HPAs cancerígenos, o biomonitoramento de seu principal metabólito, o 3-hidroxi-benzo[a]pireno, é a melhor opção (BARBEAU; MAÎTRE; MARQUES, 2011; CHAMPMARTIN; JEANDEL; MONNIER, 2017).

Embora o 1-hidroxi-pireno seja utilizado como um biomarcador para a avaliação da exposição a uma ampla variedade de HPAs e o 3-hidroxi-benzo[a]pireno para HPAs cancerígenos, a determinação do perfil urinário de diferentes metabólitos de HPAs fornece melhores informações para uma correta avaliação da exposição humana, das doses internas e da variabilidade individual no metabolismo de uma ampla gama de HPAs (XU et al., 2004).

Recentemente, diversos pesquisadores têm avaliado as concentrações de outros metabólitos mono-hidroxilados originados de fluoreno, naftaleno, fenantreno e pireno. Dentre

eles destacam-se avaliações de OH-HPAs de fluoreno (2-hidroxi fluoreno, 9-hidroxi fluoreno), naftaleno (1-hidroxi naftaleno, 2-hidroxi naftaleno), fenantreno (1-hidroxi fenantreno, 2-hidroxi fenantreno, 3-hidroxi fenantreno, 4-hidroxi fenantreno) e pireno (1-hidroxi pireno) em urina (XU et al., 2004; LI et al., 2006; CAMPO; ROSSELLA; FUSTINONI, 2008; CDC, 2018; DOBRACA et al., 2018).

### **1.3. Toxicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos**

Após exposição, os HPAs são armazenados no tecido adiposo, fígado, nos rins, cérebro, e glândulas mamárias, e podem se acumular por exposições repetidas e em longo prazo. Segundo a *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC), níveis detectáveis de HPAs podem ser observados em muitos órgãos, sendo reportados maiores concentrações no fígado (IARC, 1983; GROVA et al., 2011; SCINICARIELLO; BUSER, 2014).

Os efeitos agudos dos HPAs na saúde humana dependerão principalmente da extensão da exposição e da concentração de HPAs durante a exposição, da toxicidade dos HPAs, e da via de exposição. A exposição em curto prazo aos HPAs também tem sido relatada como causadora de comprometimento da função pulmonar em asmáticos e efeitos trombóticos em pessoas acometidas por doença coronariana (ACGIH, 2005). Ainda não está totalmente elucidado o mecanismo de indução ou não da ocorrência de efeitos adversos sobre a saúde humana após exposição aos HPA em concentrações ambiente e em curto prazo. Em contraste, as exposições ocupacionais a altos níveis de misturas de poluentes contendo HPAs são conhecidas por causar sintomas como irritação nos olhos, náusea, vômito, diarreia e outros (UNWIN et al., 2006).

Estudos de toxicidade oral aguda indicam que os HPAs têm toxicidade aguda moderada a baixa. Um valor de  $DL_{50}$  superior a 1,60 ng/kg de peso corpóreo foi relatado para o benzo[a]pireno em ratos e camundongos (WHO/IPCS, 1998). O nível de ausência de efeito adverso observado (NOAEL – do inglês *no observed adverse effect levels*) para o benzo[a]pireno, em um estudo de 90 dias em ratos, foi de 3 mg/kg p.c. por dia, com base na toxicidade no fígado (KROESE et al., 2001). Os efeitos na saúde decorrentes da exposição prolongada ou crônica aos HPAs podem incluir diminuição da função imunológica, catarata, dano renal e hepático (como a icterícia), problemas respiratórios, sintomas semelhantes aos da asma e anormalidades da função pulmonar, além de alergias na pele (ABDEL-SHAFY;

MANSOUR, 2016). O efeito tóxico mais preocupante do HPAs é seu potencial carcinogênico. Alguns metabólitos reativos de HPAs (epóxidos e diidrodióis) apresentam o potencial para se ligar a proteínas celulares e DNA, formando adutos e produzindo efeitos deletérios. Essa ruptura bioquímica e dano celular resultante podem conduzir a mutações e malformações do desenvolvimento, tumores e câncer (ATSDR, 2009; KIM et al., 2013).

Pesquisadores relataram aumento de incidência de câncer de pele, pulmão, bexiga, fígado e estômago, bem como sarcomas no local da injeção, em animais. Estudos reportados na literatura realizados em animais mostram que alguns HPAs podem afetar os sistemas hematopoiético e imunológico, e produzir efeitos deletérios nos sistemas reprodutivos, neurológicos e de desenvolvimento (ATSDR, 2009). Incidências crescentes de câncer de pulmão, pele e bexiga estão associadas à exposição ocupacional aos HPAs. Relatórios epidemiológicos de trabalhadores expostos aos HPAs observaram aumento na incidência de câncer de pele, pulmão, bexiga e gastrointestinal em humanos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016).

Na legislação brasileira não há ainda limites máximos toleráveis (LMT) definidos para a maioria dos alimentos passíveis de contaminação por HPAs. No Brasil, algumas Portarias e Resoluções Normativas da ANVISA determinam LMT do benzo[a]pireno em alimentos que passaram por processo de defumação, e para a água. De acordo com a Resolução RDC n°2/2007, o LMT é de 0,03 µg/kg para benzo[a]pireno em alimentos defumados, e a Portaria n°518/2004 juntamente com a Resolução RDC n°274/2005 estabeleceram LMT de 0,7 µg/L em água (PAZ, et al 2017).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) estabelece 2,0 µg/kg para o benzo[a]pireno e 10,0 µg/kg para a soma de benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno e criseno, chamados de 4HPA, em óleos e gorduras destinados ao consumo humano direto ou como ingrediente de alimentos. A EFSA também propõe que o 4HPA seja utilizado como possível marcador da presença de HPA em alimentos, e não apenas o benzo[a]pireno, como descrito na RDC n°274/2005 (EU, 2006; EFSA, 2008; PAZ, et al 2017).

#### **1.4. Biomonitoramento Humano**

O crescente aumento da produção industrial e na demanda agrícola expõe o homem a uma grande quantidade de substâncias químicas, tanto em condições ocupacionais quanto em

seu macroambiente, o que se torna necessário à avaliação da população quanto à exposição a esses compostos. A avaliação e a medição das concentrações de substâncias químicas e poluentes ambientais em tecidos ou fluidos biológicos, como sangue e urina são denominadas de biomonitoramento humano (BH) (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007; KUNO, 2009).

Atualmente, o BH é uma ferramenta utilizada na avaliação da saúde humana, servindo de base para a adequação de padrões de cada substância. Assim, o biomonitoramento da exposição de trabalhadores ou da população geral é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde (PASCHAL, 2007).

Em países como os Estados Unidos da América é dada uma considerável atenção aos estudos de BH, ao passo que existem diversas agências e instituições voltadas para tal avaliação, como o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o *National Institutes of Health* (NIH), a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) e a *United State Environmental Protection Agency* (USEPA) (CARAN, 2016).

Dentre os fluidos biológicos destinados ao estudo de biomonitoramento humano, o sangue e a urina destacam-se como as principais. Outras amostras também podem ser utilizadas, como a saliva, cabelo, unha, leite e demais tecidos. Os materiais biológicos devem ser acessíveis, disponíveis em quantidades suficientes para análises rotineiras e sem desconforto e risco para a saúde do indivíduo (ANGERER; EWERS; WILHELM, 2007; KUNO, 2009; BOCATO, 2019). Apesar de sua tradição, a coleta de amostras de sangue implica em maiores dificuldades logísticas e de aceitação, principalmente entre a população infantil (GOUVEIA et al., 2014).

Diante do potencial tóxico do HPAs, diversos estudos de BH são realizados em países como Estados Unidos e Canadá, para avaliar o risco da exposição humana a esses. Estudos de biomonitoramento requer a análise de um grande número de amostras. Para isso faz-se necessário o desenvolvimento de eficientes métodos analíticos de preparo de amostras, requerindo baixo volume de amostras e o processamento em curto intervalo de tempo (PRIMEL et al., 2017; CDC, 2021).

## 1.5 Preparo de amostras

A exposição humana aos HPAs é frequentemente monitorada em amostras de urina. Devido à complexidade da amostra, é necessário o emprego de uma técnica de preparo de amostras visando isolar e pré-concentrar os analitos de interesse da matriz, além de minimizar os efeitos dos interferentes e ainda tornar a amostra compatível com o sistema de medição, por exemplo, um cromatografo. Além disso, os OH-HPAs são encontrados na urina humana na faixa de concentração de ng/mL (partes por bilhão). Sendo assim, a técnica de preparo de amostras deve ser capaz de pré-concentrar os analitos aumentando assim a detectabilidade do método analítico (PRIMEL et.al., 2017; URBANCOVA et al., 2017).

A extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (SPE) são os procedimentos mais comuns empregadas para o preparo dessas amostras. No entanto, esses métodos são laboriosos e requerem quantidades relativamente grandes de solventes orgânicos e que são potencialmente tóxicos (MOREIRA et al., 2015; JOUYBAN et al., 2020). As microtécnicas utilizadas no preparo de amostras reduzem o impacto negativo causado pelo uso excessivo de solventes orgânicos tanto no meio ambiente quanto na saúde dos analitas. Além do exposto, a redução da quantidade de solventes orgânicos empregados durante o processo de extração se traduz em redução de custos no tratamento de resíduos. Com a crescente demanda de análises nos estudos de BH associada à necessidade de redução do tempo de preparo de amostras e diminuição do consumo de reagentes durante o processo analítico, várias iniciativas surgiram vislumbrando uma maior simplicidade de operação e redução nos tempos de análise e consumo de solvente orgânicos em rotina (HAINES et al., 2017).

### 1.5.1 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Com a substituição das técnicas clássicas de preparo de amostra pelas técnicas miniaturizadas na determinação de compostos orgânicos em amostras biológicas e ambientais nos últimos anos, a DLLME surgiu como uma alternativa viável. Ela apresenta diversas vantagens incluindo a rapidez, baixo custo, alta eficiência de extração e pré-concentração dos analitos. Essa microtécnica é baseada na partição dos analitos de interesse utilizando volumes pequenos de uma mistura de solventes, o dispersor e o extrator (MARTINS et al., 2012; MOREIRA et al., 2014; PLOTKA-WASYLKA et al., 2016).

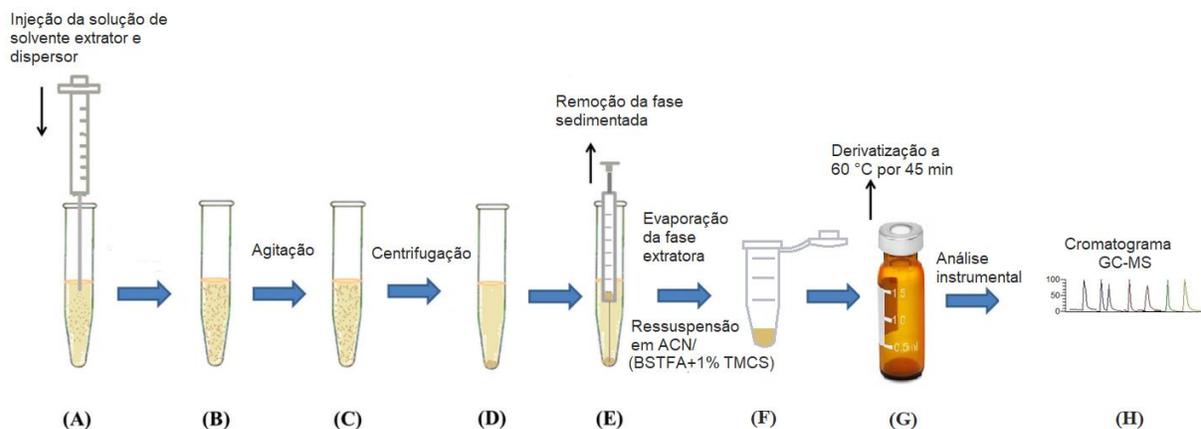
A DLLME foi inicialmente proposta por Rezaee e colaboradores (2006) e está esquematizada na figura 1. Nessa técnica são utilizados um solvente chamado de dispersor, que deve ser miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), e um solvente extrator, que deve ser insolúvel na fase aquosa. Essa mistura de solventes é então injetada rapidamente na amostra com auxílio de uma seringa causando uma rápida turbidez, conhecida como formação do ponto nuvem. Nesse estado são formadas microgotas dos solventes dispersas por toda solução aquosa, aumentando a superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra e, conseqüentemente, favorecendo a partição do analito para a fase orgânica (CALDAS et al., 2011). Após a injeção rápida da mistura de solventes, a amostra é centrifugada, para que as microgotas possam ser depositadas, e é realizada a remoção e transferência da fase sedimentada (MARTINS et al., 2012). A formação do ponto nuvem dispensa a agitação prolongada e as sucessivas extrações realizadas, como nos procedimentos da ELL. Como na DLLME a partição ocorre rapidamente e possui alta eficiência de extração, não é necessário que haja sucessivas extrações, fazendo com que a técnica possa ser considerada de equilíbrio ou até mesmo exaustiva, quando a eficiência de extração é próxima de 100 % (REZAAE et al., 2010; MARTINS et al., 2012).

A presença do solvente dispersor na solução da amostra aquosa tornará essa relativamente menos polar, o que resulta num aumento da solubilidade dos analitos apolares na solução da amostra, conduzindo a uma menor eficiência de extração. Para superar esta desvantagem, alguns métodos alternativos foram propostos, empregando menor quantidade de solvente dispersor ou eliminando a necessidade de sua adição. Ademais, o solvente dispersor pode ser excluído do método quando for substituído por outro método de extração que consiga dispersar totalmente o solvente extrator na amostra (FARAJZADEH et al., 2013).

Diversas alternativas foram realizadas nos últimos anos para aprimorar a técnica DLLME clássica, objetivando contornar suas desvantagens apresentadas (FARAJZADEH et al., 2019). A DLLME assistida por ultrassom, vórtex, microondas e a microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME), foram empregadas para reduzir ou eliminar o uso do solvente dispersor na DLLME. Uma vez que a agitação assistida por vórtex ou por sonificação são empregadas para aumentar a taxa de transferência de massa dos analitos para fase extratora, ao aumentar a área de contato entre eles, ainda necessita da adição do solvente dispersor. Ao comparar a AALLME com os métodos de DLLME de rotina e os métodos aprimorados, fica

evidente que o primeiro é mais rápido, simples e de fácil execução, uma vez que exclui o emprego do solvente dispersor (AMINI; KHANDAGHI; MOGADDAM, 2018; FARAJZADEH et al., 2020).

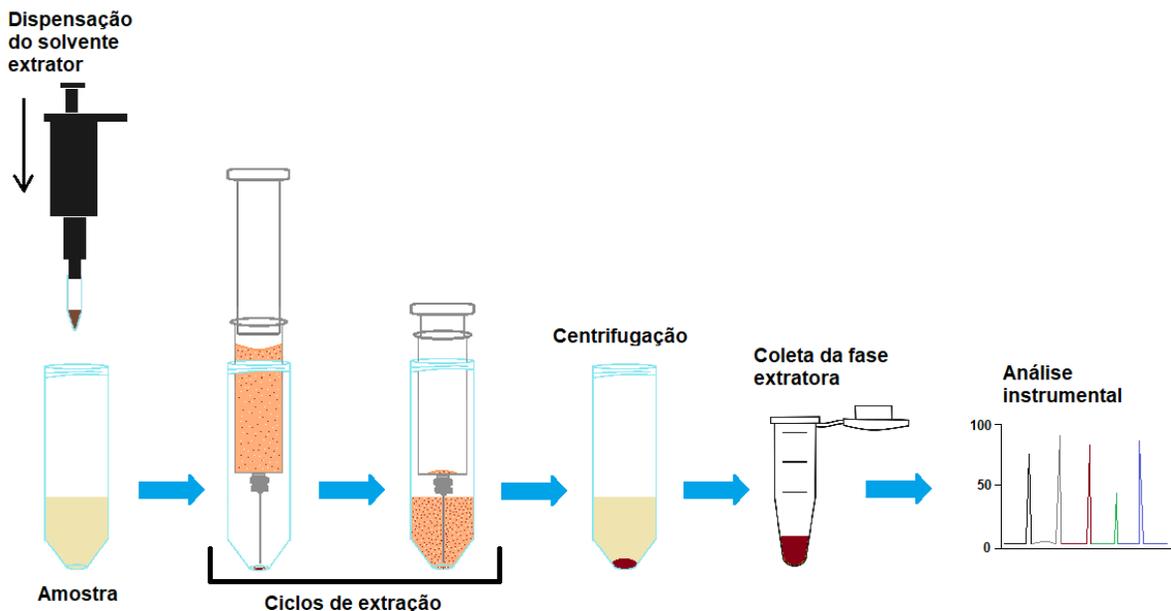
**Figura 1:** Descrição das etapas realizadas no método de extração da DLLME (Fonte: o autor).



### 1.5.2 Microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME)

AALLME foi descrita pela primeira vez em 2012 por Farajzadeh e colaboradores para a análise de ftalatos em amostras aquosas. O método apresentado era semelhante ao da DLLME, no entanto não havia necessidade da adição de nenhum solvente orgânico para dispersão de um solvente extrator na solução da amostra. Nesse processo de extração, um solvente orgânico hidrofóbico com volume na faixa de microlitros ( $\mu\text{L}$ ) (solvente extrator) é disperso na solução da amostra executando ciclos de aspiração/dispensação por várias vezes, com o auxílio de uma seringa de vidro equipada com uma agulha, como mostrado na Figura 2.

**Figura 2:** Descrição das etapas realizadas no método de extração da AALLME (Fonte: o autor).



Os estudos mostraram que a viscosidade e a tensão interfacial do solvente de extrator foram os dois principais parâmetros nos métodos de microextração líquido-líquido (LPME). Esses parâmetros controlam simultaneamente o tamanho da gota do solvente extrator e a taxa de transferência de massa dos analitos. A realização de ciclos de aspirar e dispersar converte o solvente de extração em pequenas gotículas e, conseqüentemente, a área de contato da solução com o solvente extrator aumenta enormemente (FARAJZADEH et al., 2013). Após a centrifugação da mistura formada, as fases orgânicas e aquosas são separadas e a fase orgânica coletada para análises posteriores. Este método pode ser adequado para a extração de vários compostos orgânico em amostras aquosas, incluindo amostras de urina (FARAJZADEH; MOGADDAM, 2012; ROCHA; DE OLIVEIRA; BARBOSA, 2018).

Embora a DLLME tenha sido aplicada à determinação dos OH-HPAs em amostras de urina por Gupta e colaboradores (2015), nossa pesquisa na literatura não revelam relatos sobre a aplicação da AALLME na determinação de tais compostos tóxicos na urina humana. Diante do exposto, um novo método de microextração foi avaliado empregando AALLME para o preparo de amostras e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para a determinação simultânea de seis OH-HPAs. Ademais, a técnica de AALLME foi comparada com a DLLME para avaliar qual das duas técnicas seria mais atrativa para o biomonitoramento de rotina de OH-HPAs em urina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar e desenvolver dois métodos analíticos simples e rápidos para a determinação dos principais OH-HPAs em amostras de urina e validar a técnica mais amigável do ponto de vista ambiental.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Otimizar os parâmetros relacionados ao preparo de amostra empregando DLLME e AALLME;
- b) Desenvolver e avaliar as figuras de mérito do método analítico mais ambientalmente amigável para determinação dos OH-HPAs por GC-MS;
- c) Aplicar o método desenvolvido na quantificação dos analitos em amostras de urina humana.

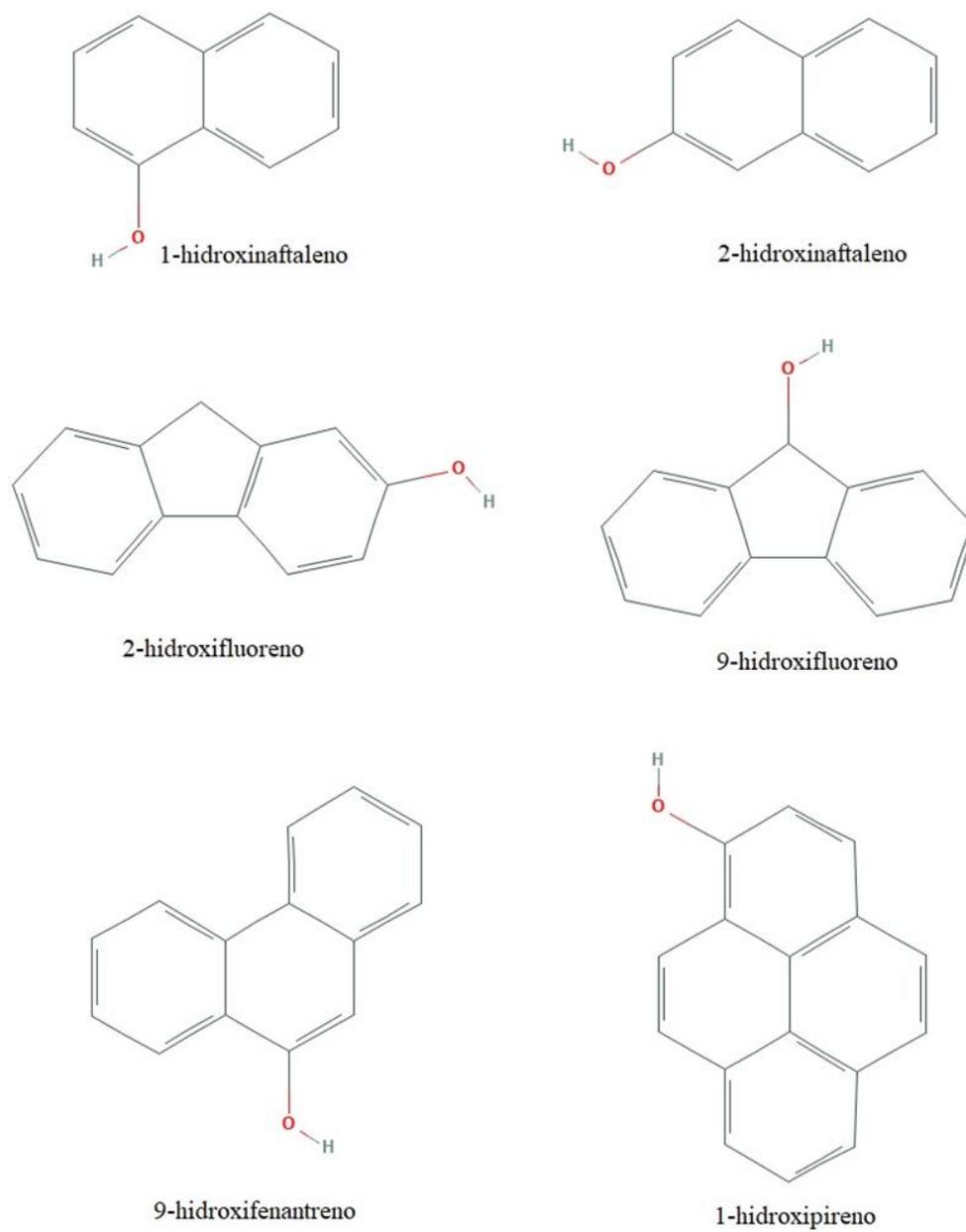
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções padrão e reagentes

Os metabólitos mono-hidroxilados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, 1-hidroxinaftaleno (1-NAF), 2-hidroxinaftaleno (2-NAF), 2-hidroxifluoreno (2-HFL), 9-hidroxifluoreno (9-HFL), 9-hidroxifenantreno (9-HFE), 1-hidroxipireno (1-OHP), além do padrão interno 1-hidroxinaftaleno deuterado (1-NAF-*d*7), foram obtidos da Toronto Research Chemicals<sup>®</sup>, (North York, Ontário, Canadá), Accustandard<sup>®</sup>, (New Haven, Connecticut, Estados Unidos) e Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St Louis, Missouri, Estados Unidos). As estruturas dos padrões analíticos selecionados para este estudo estão demonstradas na Figura 3. As soluções estoques de concentração 1000 µg/mL e as diluições seriadas relativas aos pontos da curva de calibração foram preparadas em acetonitrila grau GC, (Sigma- Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, Missouri, Estados Unidos). O reagente derivatizante empregado foi o N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% trimetilclorosilano (TMCS), obtido da Sigma - Aldrich<sup>®</sup> (St Louis, Missouri, Estados Unidos).

Os reagentes utilizados para o preparo da urina sintética, ambos em grau analítico, foram obtidos de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, EUA). Para o preparo utilizou-se 24,5 g de uréia; 8,5 g cloreto de sódio; 3,8 g cloreto de potássio; 1,4 g creatinina; 1,18 g fosfato de potássio; 1,03 g ácido cítrico; 0,64 g hidróxido de sódio; 0,47 g bicarbonato de sódio; 0,34 g ácido ascórbico e 0,28 mL de ácido sulfúrico para o preparo de 500 mL em água Milli-Q (VELA-SORIA et al., 2014; ROCHA et al. 2016, 2018; SILVEIRA et al., 2020). A urina sintética foi estocada a 4°C até o momento das análises.

**Figura 3:** Estrutura dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados no estudo.



Fonte: PubChem, 2021.

### 3.2 Instrumentação analítica

As análises do presente estudo foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), da Thermo Fisher Scientific®. Para separação cromatográfica dos metabólitos mono-hidroxilados de HPA foi empregada uma coluna analítica FS-CAP SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; 5% difenilpolisiloxano, 95% dimetilpolisiloxano), da Sigma-Aldrich®. A temperatura inicial do forno, que contém a coluna cromatográfica, foi de 100 °C, mantida por 2 minutos, seguida por uma rampa de aquecimento a 15 °C/min até 210 °C, com posterior aumento de 20 °C/min até 280 °C, mantendo por 4 minutos, totalizando 17 minutos de tempo de corrida. Hélio foi utilizado como gás de arraste, na vazão de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C, o volume de injeção utilizado foi de 2 µL, realizada em modo *splitless* com abertura da válvula após 1 minuto.

O sistema de detecção utilizado foi espectrômetro de massas do tipo quadrupolo simples (modelo ISQ single quadrupole, Thermo Fisher Scientific®), equipado com fonte de ionização por elétrons (EI). As temperaturas da fonte de ionização e da linha de transferência para o espectrômetro de massas (*transfer line*) foram mantidas em 300 °C e 280 °C, respectivamente. As determinações foram executadas no modo *Full Scan*, monitorando a faixa de razão massa/carga ( $m/z$ ) de 180 a 350, e em modo SIM (monitoramento de íon selecionado) para quantificação dos OH-HPAs. As  $m/z$  selecionadas no modo SIM estão descritas na Tabela 1. A aquisição e a quantificação dos dados foram realizadas utilizando o programa Thermo Xcalibur™ versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific®).

**Tabela 1:** Razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons monitorados:

Analitos	Íon precursor ( $m/z$ )
1-hidroxinaftaleno	216 – 201 – 185
2-hidroxinaftaleno	216 – 201 – 185
2-hidroxifluoreno	254 – 239
9-hidroxifluoreno	254 – 239
9-hidroxifenantreno	266 – 251
1-hidroxipireno	290 – 275 – 259
*PI - 1-hidroxinaftaleno- <i>d</i> 7	223 – 208

\*PI: padrão interno

### 3.3 Preparo das amostras

Após a etapa de otimização instrumental do GC-MS, as técnicas de DLLME e AALLME foram otimizadas. Para a otimização e validação do método analítico utilizou-se urina sintética como matriz branca, uma vez que não há amostra de urina humana isenta dos analitos estudados (Rocha et al., 2019).

O tipo e volume de solvente extrator e dispersor, pH, força iônica da matriz, modo e tempo de agitação da amostra foram os parâmetros avaliados na técnica da DLLME. Os testes foram realizados em tubos de polipropileno de 50 mL e alíquotas de 5,0 mL de urina sintética foram diluídas com 5,0 mL de água ultrapura, e enriquecidas com 100 µL da solução de uso do padrão interno na concentração de 20 ng/mL (1-hidroxinaftaleno-*d*7) e demais padrões analíticos do estudo. Para homogeneização dos analitos agitou-se a mistura em vórtex por 3 segundos. Separadamente, foi preparada a mistura dos solventes dispersor e extrator, correspondendo a 300 µL de dicloroetano (DCE) e 500 µL etanol (EtOH). Alíquotas da mistura de solventes foram aspiradas com auxílio de uma seringa e dispensadas rapidamente em um único movimento no fundo do tubo contendo a amostra aquosa para a formação do ponto nuvem. Os tubos, foram agitados em vórtex por 15 segundo e submetidos à centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica (aproximadamente 160 µL) foi separada, transferida para tubos ependorffs de 2,0 mL e evaporadas em concentrador à vácuo de amostras. Finalmente, os resíduos foram reconstituídos em 100 µL de uma solução (25:75 v/v) de agente derivatizante (BSTFA - 1% TMCS) e acetonitrila. Após agitação em vórtex por 30 segundos, a mistura foi transferida para vial âmbar e devidamente vedado com auxílio de uma ferramenta do tipo crimpador, e, então, a derivatização dos analitos foi realizada a 60 °C durante 45 minutos em banho-maria. Volume de 2,0 µL foi introduzido no sistema cromatográfico para a análise.

Para a técnica de preparo de amostras AALLME avaliou-se o tipo e volume de solvente extrator, número de ciclos de extração, pH da amostra, força iônica, modo e tempo de agitação da amostra. Em tubos de polipropileno de 50 mL, alíquotas de 5,0 mL de urina sintética foram diluídas com 5,0 mL de água ultrapura, e enriquecidas com 100 µL da solução de uso do padrão interno na concentração de 20 ng/mL (1-hidroxinaftaleno-*d*7) e demais padrões analíticos do estudo. Para homogeneização dos analitos agitou-se em vórtex a mistura inicial por 3 segundos. Um volume de 300 µL de dicloroetano (DCE) foi adicionado à mistura inicial, e realizou-se três ciclos de aspiração/dispensação da amostra, utilizando uma seringa de vidro de 10 mL. A

mistura foi transferida para novos tubos de polipropileno de 15 mL, agitou-se em vórtex por 45 segundos e, então, centrifugou-se a 4000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica (aproximadamente 160  $\mu$ L) foi separada, transferida para tubos ependorffs de 2,0 mL e evaporadas em concentrador a vácuo de amostras. Finalmente, os resíduos foram reconstituídos em 100  $\mu$ L de uma solução (25:75 v/v) de agente derivatizante (BSTFA - 1% TMCS) e acetonitrila. Após agitação em vórtex por 30 segundos, a mistura foi transferida para vial âmbar e devidamente vedado com auxílio de uma ferramenta do tipo crimpador, e, então, a derivatização dos analitos foi realizada a 60 °C durante 45 minutos em banho-maria. Volume de 2,0  $\mu$ L foi introduzido no sistema cromatográfico para a análise.

### 3.4 Figuras analíticas de mérito

As figuras analíticas de mérito foram avaliadas em amostras de urina sintética, devido à falta desse material biológico certificadamente livre dos metabólitos de HPAs em nosso laboratório. A estratégia do emprego de matriz sintética tem sido utilizada em diversos trabalhos analíticos de desreguladores endócrinos, como demonstrado por Vela-Soria e colaboradores (2014), Rocha e colaboradores (2016; 2018) e por Silveira e colaboradores (2020). Dessa forma, a fórmula preparada tem por objetivo mimetizar as características naturais da urina humana. A avaliação das figuras analíticas de mérito foi conduzida observando os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito matriz, precisão e exatidão, seguindo parcialmente o recomendado pela ANVISA na RDC N° 27 de 17 de maio de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012c).

A linearidade foi avaliada empregando amostras de urina sintética fortificadas no intervalo de 0,72 a 20 ng/mL, e foram submetidas ao processo de extração de acordo com o procedimento de preparo de amostras AALLME descrito anteriormente. A curva analítica foi construída em no mínimo seis concentrações diferentes e os pontos da curva foram realizados em triplicata. O padrão interno foi preparado na concentração de 20 ng/mL.

A precisão e exatidão foram calculadas utilizando amostras de urina fortificadas com três diferentes concentrações em triplicata (n=3). A primeira concentração foi considerada o limite inferior de quantificação que variou entre os analitos (0,72 a 2,09 ng/mL) e as demais concentrações foram 10,0 e 20,0 ng/mL para todos os analitos. A precisão foi expressa como

coeficiente de variação (CV %), não se admitindo valores superiores a 20 % para o limite inferior de quantificação e 15% para as demais concentrações. A exatidão foi expressa pelo erro padrão relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o limite inferior de quantificação e  $\pm 15\%$  para as demais concentrações.

As fórmulas utilizadas para o cálculo do coeficiente de variação (CV%) e erro padrão relativo (EPR) estão demonstradas abaixo:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

$$PR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

O efeito matriz foi avaliado através da comparação das respostas analíticas dos analitos em solução padrão com as respostas analíticas obtidas em amostras de urina sintética enriquecidas com os analitos e o padrão interno nas mesmas concentrações (3,0 ng/mL e 15 ng/mL), e em triplicata (n=3). Foram escolhidas duas concentrações, uma delas representando uma concentração alta e outra representando uma concentração baixa com valor acima do limite inferior de todos os analitos (0,72 a 2,09 ng/mL). Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno (PI), conforme a fórmula abaixo. O coeficiente de variação (CV%) dos FMNs de todas as amostras não devem ser superiores a 15%.

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do soluto em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do soluto em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}}$$

Os limites estipulados para avaliar o coeficiente de variação na precisão e efeito matriz, e o erro padrão relativo na exatidão, foram valores de referência de acordo com o guia de validação de métodos bioanalíticos da ANVISA (RDC n° 27, de 17 de maio de 2012) (BRASIL, 2012c).

Limite de detecção (LOD) é definido como a menor concentração detectável do analito na amostra. No presente estudo o LOD foi obtido utilizando a menor concentração que proporcionou razão sinal/ruído próximo de 3. O limite inferior de quantificação (LIQ) é considerado o primeiro ponto da curva analítica para cada composto, e o menor valor quantificado com precisão e exatidão.

### **3.5 Aplicação do método analítico em urina humana**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP – USP) no dia 08/11/2018 (ANEXO A), processo n°477 - CCAAE: 91124418.2.0000.5403, conforme Parecer Consubstânciado do CEP N° 3.009.288. O estudo somente foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos voluntários do estudo incluídos na pesquisa (ANEXO B). Por meio do TCLE os voluntários foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo e os possíveis riscos envolvidos. Foi garantida a liberdade dos voluntários em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

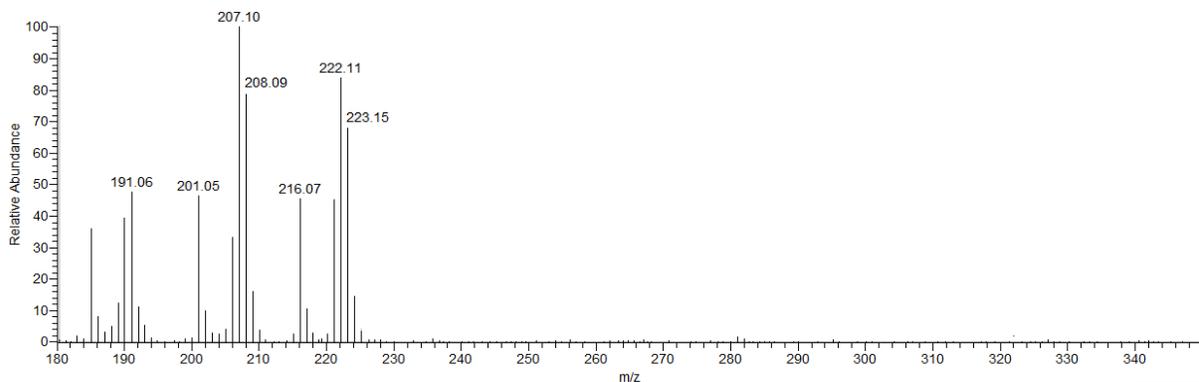
Após a validação analítica, o método foi aplicado na análise de vinte amostras de urina coletadas de oito indivíduos do sexo masculino e doze do sexo feminino, na faixa etária entre 18 a 35 anos. A urina foi coletada no volume de cerca de 50 mL, através da deposição direta em tubos plásticos de polipropileno (previamente avaliado quanto a presença dos analitos estudados), e armazenadas a 5 °C até o momento das análises. Os participantes foram orientados a coletarem a primeira urina do dia ou com intervalo de 4 horas entre as micções. Para coletar a urina foi orientado fazer a higiene da genitália com água e sabão, e a trazerem os tubos até no máximo 1 hora da coleta para armazenamento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

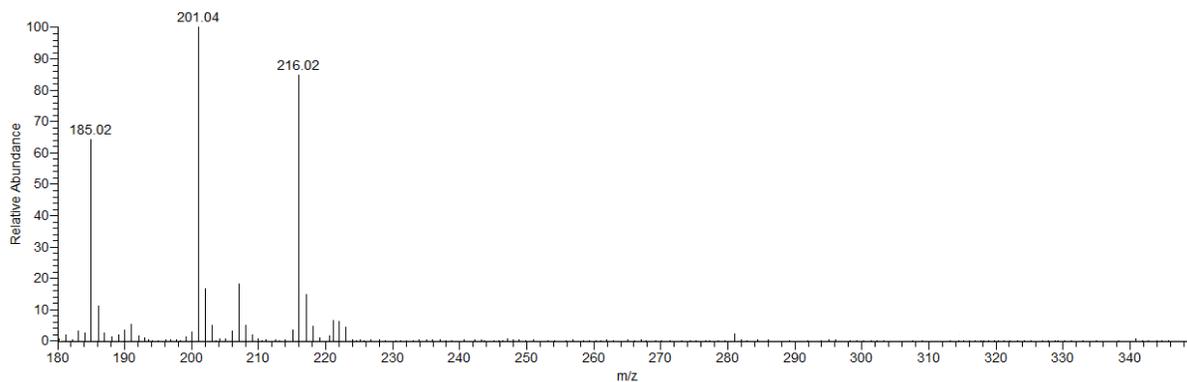
### 4.1 Condições instrumentais

As condições cromatográficas foram otimizadas com objetivo de avaliar a eficiência da separação dos compostos. Foram testados diferentes parâmetros instrumentais, como rampas de temperatura do forno de temperatura, diferentes vazões do gás de arraste, temperatura do injetor e volume de injeção. As análises iniciais no espectrômetro de massas foram executadas no modo *Full Scan*, e foram selecionados os íons fragmentos mais intensos para cada analito e padrão interno, no modo *SIM* (monitoramento de íon selecionado), descritos no item 3.2 e na tabela 1. Os tempos de retenção para cada composto foram determinados por comparação com soluções padrão dos OHHPAs e do padrão interno e seus respectivos espectros de massas. As figuras de 4 a 10 mostram os espectros de massa obtidos no modo *Full Scan* para cada metabólito de OH-HPAs em estudo, e a figura 4 o espectro de massa obtido no modo *Full Scan* para o padrão interno, 1-hidroxi-naftaleno-*d*7.

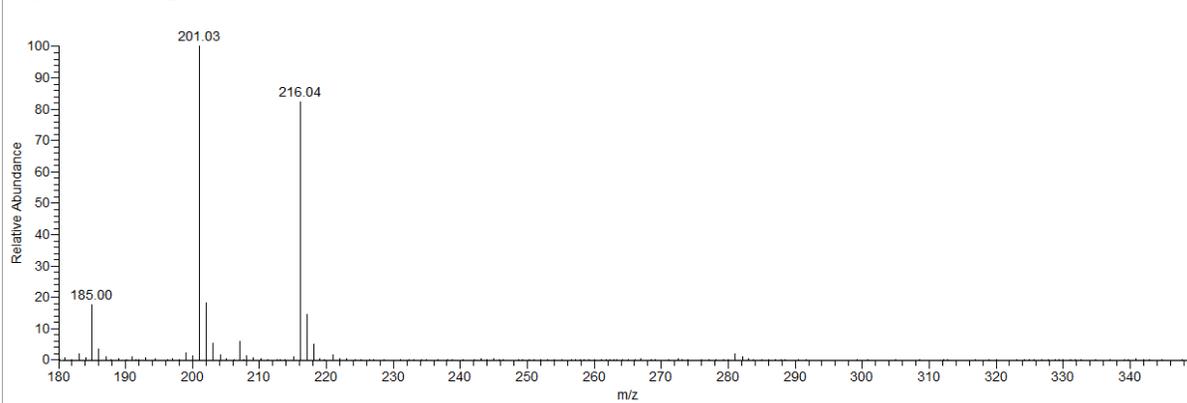
**Figura 4:** Espectro de massas do 1-hidroxi-naftaleno-*d*7 (1-NAF-D7) (Fonte: O autor).



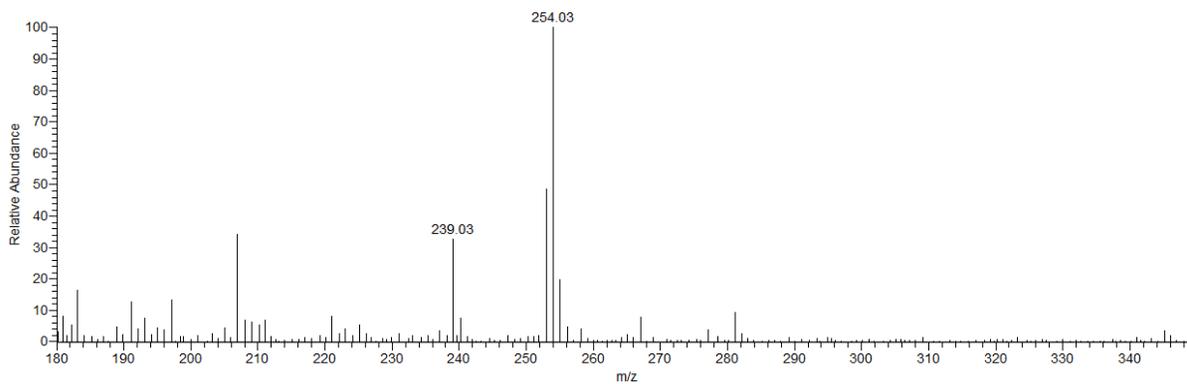
**Figura 5:** Espectro de massas do 1-hidroxi-naftaleno (1-NAF) (Fonte: O autor).



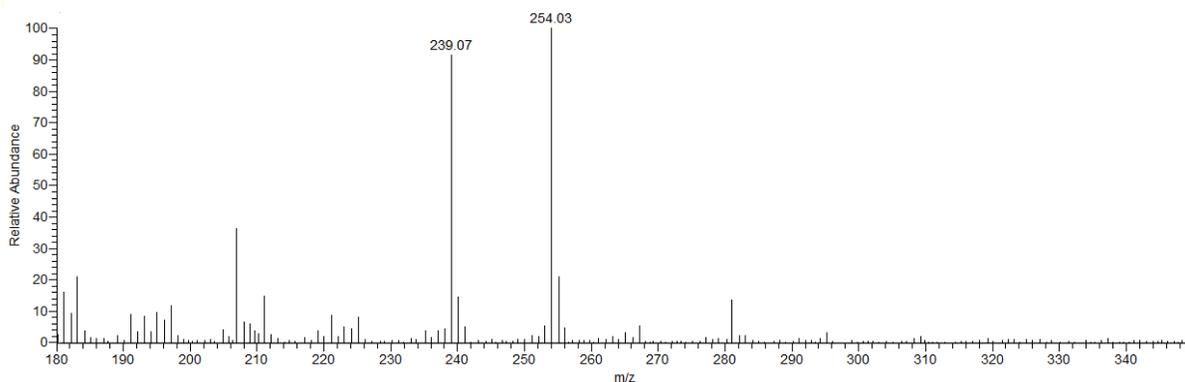
**Figura 6:** Espectro de massas do 2-hidroxi-naftaleno (2-NAF) (Fonte: O autor).



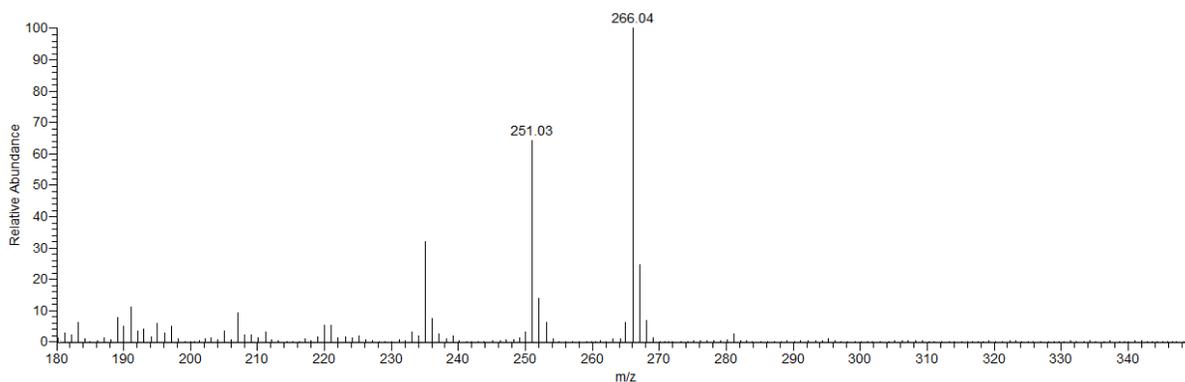
**Figura 7:** Espectro de massas do 9-hidroxi-fluoreno (9-HFL) (Fonte: O autor).



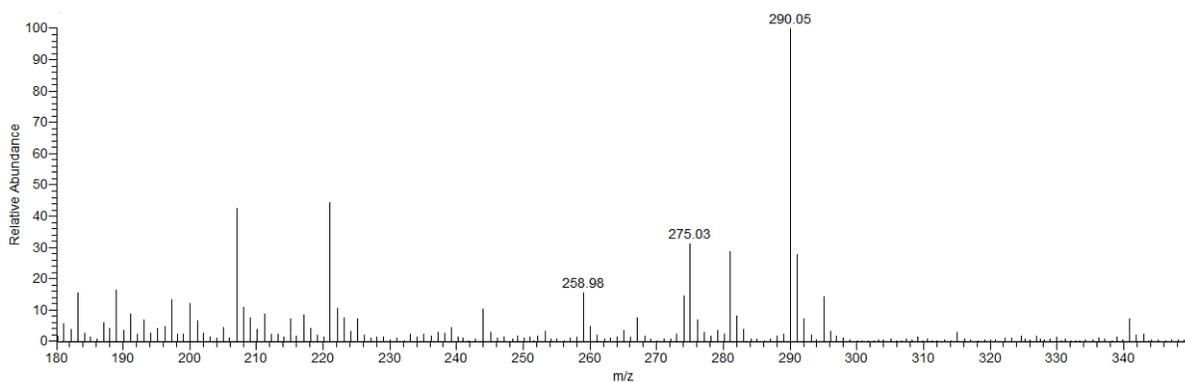
**Figura 8:** Espectro de massas do 2-hidroxi fluoreno (2-HFL) (Fonte: O autor).



**Figura 9:** Espectro de massas do 9-hidroxifenantreno (9-HFE) (Fonte: O autor).



**Figura 10:** Espectro de massas do 1-hidroxipireno (1-OHP) (Fonte: O autor).



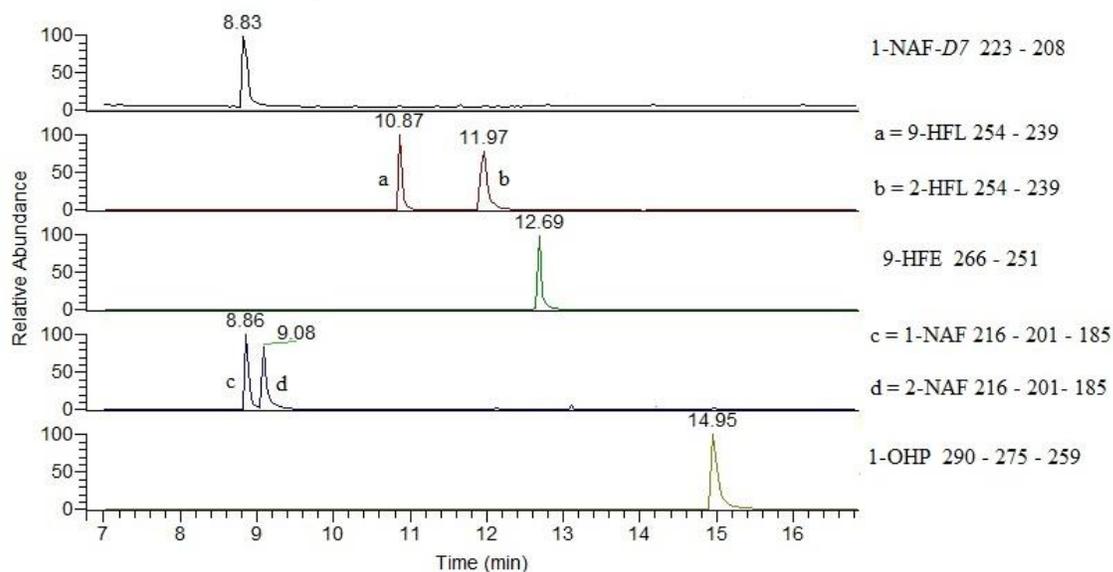
A Tabela 2 mostra a rampa de aquecimento selecionada, utilizando uma coluna de 30 metros para a separação cromatográfica dos analitos, com resultados satisfatórios na resolução dos picos. A figura 11 mostra o cromatograma referente aos tempos de retenção dos metabólitos de OH-HPAs e padrão interno, indicando a ordem de eluição dos analitos, correspondendo ao

padrão interno, seguindo pelo 1-NAF-*D7*, 1-NAF, 2-NAF, 9-HFL, 2-HFL, 9-HFE e 1-OHP. De acordo com os resultados, os metabólitos do naftaleno apresentam menores tempo de retenção em comparação com os metabólitos do fluoreno e do pireno, conforme descrito anteriormente por Gupta e colaboradores (2015). Além disso, foi verificado o acréscimo de 72 de  $m/z$  na relação massa/carga de cada íon dos metabólitos, decorrente da reação de derivatização por sililação.

**Tabela 2:** Temperaturas de aquecimento do forno (Fonte: O autor).

Velocidade de aquecimento(°C/min)	T °C	Tempo de espera (min)
–	100	2
15	210	0
20	280	4

**Figura 11:** Cromatogramas e a razão massa/ carga ( $m/z$ ) dos íons monitorados no modo *SIM* na concentração de 15 ng/mL (Fonte: O autor).



A derivatização é um processo químico utilizado para modificar as estruturas químicas das substâncias, gerando novos produtos com melhores propriedades cromatográficas, principalmente na cromatografia gasosa (volatilidade). É uma ferramenta muito utilizada para detecção de compostos orgânicos em amostras complexas. Essa etapa é geralmente realizada por reações de substituição no grupo polar do composto, onde podem ocorrer reações de alquilação, acetilação e sililação, sendo esta última a mais usualmente empregada. Nas reações

de silição, o hidrogênio mais instável de ácidos, álcoois, aminas, amidas ou cetonas e aldeídos é substituído pelo grupo trimetilsilil (TMS) para aumentar a volatilidade do soluto, a estabilidade térmica do soluto, melhorar a resposta do soluto à um determinado detector, além de melhorar a separação do soluto de interesse dos demais componentes da amostra (SCHUMMER et al., 2009).

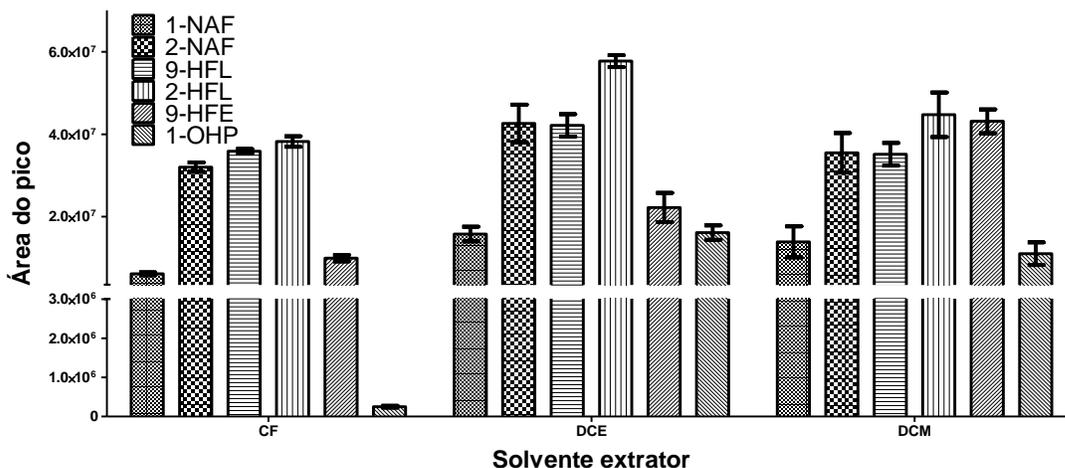
## **4.2 Otimização do procedimento de preparo de amostra por DLLME**

Os parâmetros que influenciam DLLME, tais como a escolha do solvente extrator e seu volume, escolha do solvente dispersor e seu volume, pH da amostra, força iônica, modo e tempo de agitação da amostra, foram investigados e otimizados para que se atingisse uma melhor condição capaz de extrair o máximo de analitos do meio com o mínimo de interferentes (YAN e WANG, 2013). Para a avaliação dos parâmetros, foram considerados os resultados da eficiência de extração (em porcentagem) para representantes dos metabólitos dos naftalenos (1-NAF e 2-NAF), fluorenos (2-HFL e 9HFL), fenantrenos (9-HFE) e pirenos (1-OHP), que são os compostos comumente descritos na literatura em estudos de biomonitoramento para este grupo de contaminantes (HAINES et al., 2016; CDC, 2018).

### **4.2.1 Escolha do solvente extrator**

A escolha do solvente extrator é o parâmetro mais importante no desenvolvimento da DLLME. Este deve ser obrigatoriamente imiscível com a fase aquosa e ter a capacidade de solubilizar os analitos de interesse (MARTINS et al., 2012; YAN e WANG, 2013). Para a sua seleção foram fixadas as seguintes condições para os demais parâmetros: 5 mL de urina artificial contaminada (500 ng/mL), 5 mL de água deionizada, 500 µL de solvente dispersor (acetona) e 500 µL de solvente extrator (triclorometano (TCM), dicloroetano (DCE) e diclorometano (DCM)). As amostras foram preparadas em triplicata e os resultados estão expressos em área do pico. A Figura 12 mostra que o solvente com a melhor extração para a maioria dos compostos foi o dicloroetano. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 500 µL de solvente dispersor (acetona), 500 µL de solvente extrator: triclorometano (TCM), dicloroetano (DCE) e diclorometano (DCM) e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 12).

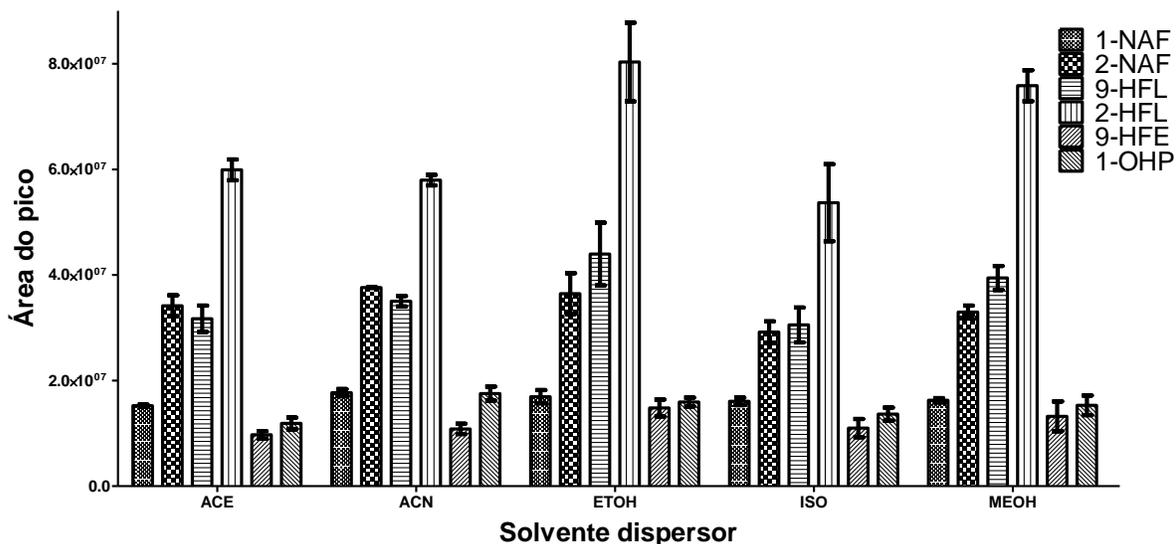
**Figura 12:** Escolha do solvente extrator.



#### 4.2.2 Escolha do solvente dispersor

A escolha do solvente dispersor deve ser realizada baseando-se na miscibilidade com fase aquosa e com o solvente extrator (MARTINS et al., 2012). A seleção apropriada deste promove o aumento na eficiência de extração, pois favorece a dispersão do solvente extrator na forma de pequenas gotículas na amostra, de modo que a área superficial do solvente extrator em contato com a amostra contendo o analito seja infinitamente grande (MOREIRA et al., 2014). Seguindo as mesmas condições anteriores e fixando o DCE como solvente extrator, foram avaliados os seguintes solventes dispersores: acetona (ACE), acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), isopropanol (ISO) metanol (MEOH). De acordo com o observado na Figura 13, visualmente, o ETOH foi o solvente com a melhor extração para a maioria dos compostos. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 500  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de solvente dispersor: ACE, ACN, ETOH, is ISO, MEOH e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 13).

**Figura 13:** Escolha do solvente dispersor.



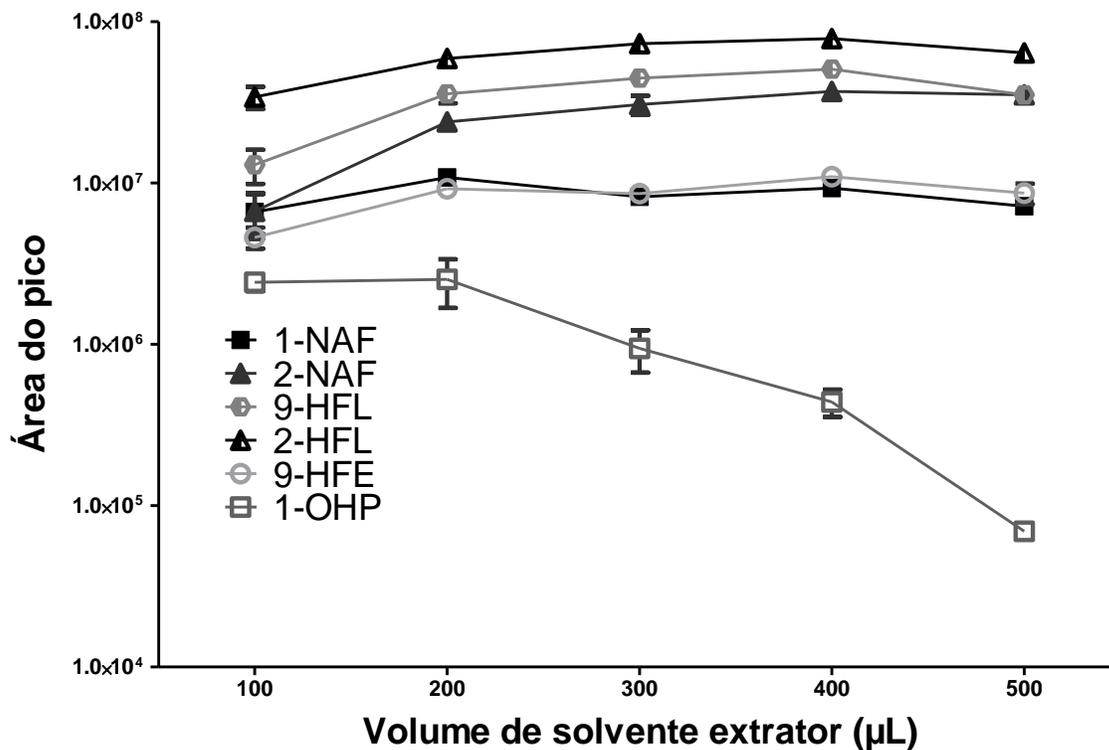
#### 4.2.3 Volume do solvente extrator

O volume de solvente extrator deve ser o menor possível capaz de assegurar a extração dos analitos, fazendo com que haja um alto fator de enriquecimento (KIAROSTAM et al., 2014). Com o par de solventes extrator e dispersor selecionados e mantendo os demais parâmetros nas condições anteriores, foram avaliados os seguintes volumes: 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{L}$ .

Com base nos resultados apresentados na Figura 14, os volumes menores (de 200  $\mu\text{L}$ ) apresentaram menor eficiência da extração, possivelmente devido ao volume reduzido de fase sedimentada, o que dificulta sua coleta. Além disso, o equilíbrio na partição dos analitos entre a fase aquosa e a fase orgânica pode não ter ocorrido de maneira eficiente. A partir do volume de 300  $\mu\text{L}$ , obteve-se os melhores valores de eficiência de extração dos compostos. Embora, não tenha sido observada uma diferença significativa para a maioria dos analitos com exceção do 1-OHP que após o volume de 200  $\mu\text{L}$  teve uma perda significativa de extração. Como descrito por MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, (2014) o aumento do volume deste solvente promove aumento do volume da fase sedimentada e, embora a recuperação permaneça quase constante, o aumento do solvente extrator poderá diminuir a eficiência de extração, levando a perdas na detectabilidade dos analitos de interesse. Dessa maneira, por se tratar de um solvente halogenado tóxico optou-se por utilizar o menor volume de solvente extrator que apresentasse resultados satisfatórios, para maioria dos analitos sendo selecionado o volume de 300  $\mu\text{L}$  para

a continuidade dos experimentos. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 500  $\mu\text{L}$  de ETOH (solvente dispersor) e diferentes volumes de DCE (solvente extrator): 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{L}$  e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 14).

**Figura 14:** Avaliação do volume do solvente extrator.

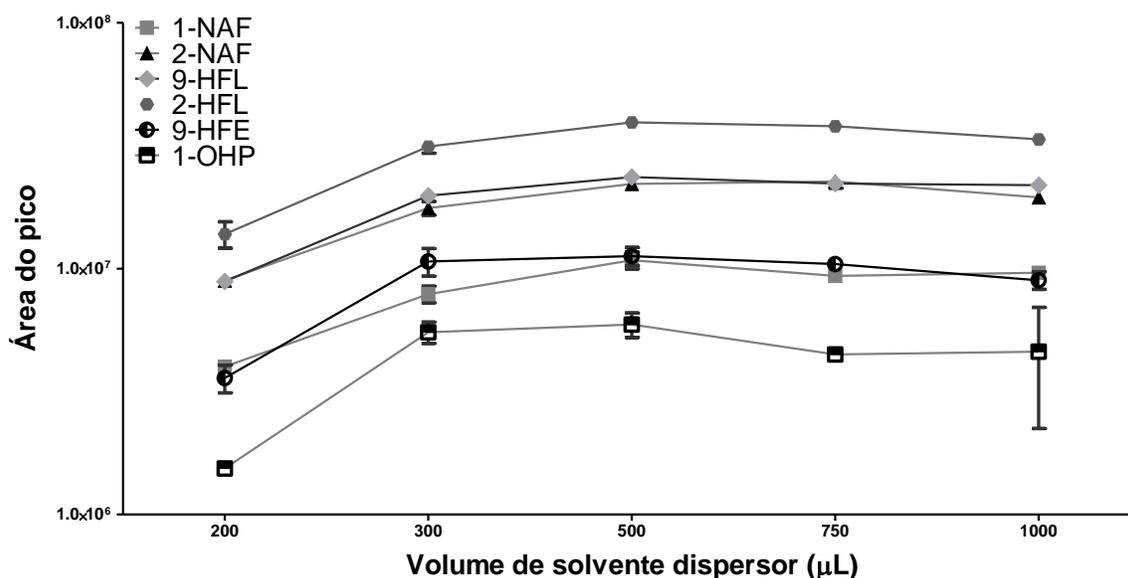


#### 4.2.4 Volume do solvente dispersor

O volume do solvente dispersor afeta diretamente a formação do ponto nuvem e o volume da fase sedimentada (KIAROSTAM et al., 2014). A adequação desse volume depende do volume da fase aquosa e do volume do solvente extrator (KRYLOV et al., 2011). Utilizando o volume de 300  $\mu\text{L}$  de solvente extrator, os seguintes volumes de solvente dispersor foram avaliados: 200, 300, 500, 750 e 1000  $\mu\text{L}$ . Como observado na Figura 15, o volume de 200  $\mu\text{L}$  foi o que apresentou menor eficiência da extração para a maior parte dos compostos, possivelmente devido a uma insuficiência na dispersão do solvente extrator na amostra e, conseqüentemente, a não formação de um ponto nuvem adequado. Como a diferença entre os maiores volumes testados após o volume de 500  $\mu\text{L}$  não foi muito significativa, este volume foi

selecionado para o solvente dispersor, sendo essa quantidade capaz de realizar uma extração eficiente de todos os compostos. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 300  $\mu\text{L}$  de DCE (solvente extrator) e diferentes volumes de ETOH (solvente dispersor): 200, 300, 500, 750 e 1000  $\mu\text{L}$  e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 15).

**Figura 15:** Avaliação do volume do solvente dispersor.

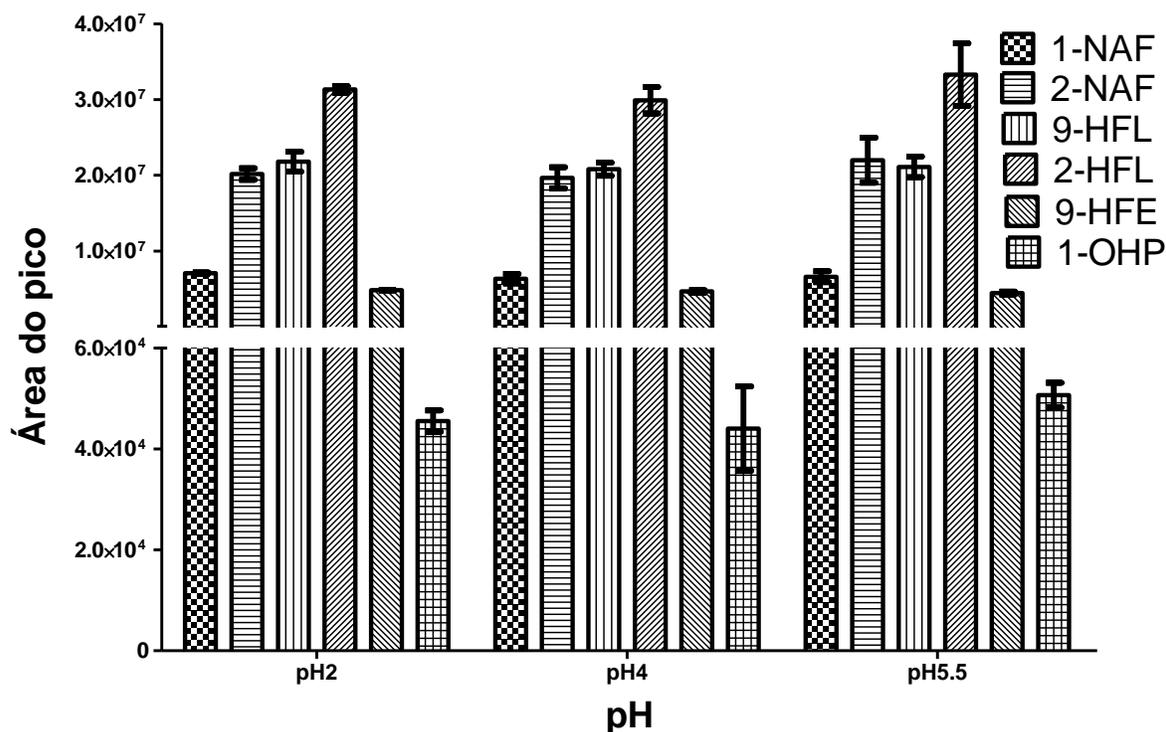


#### 4.2.5 Avaliação do efeito do pH da amostra

Compostos ionizados são mais solúveis na fase aquosa. Portanto, para que haja o favorecimento da extração, o analito deve estar preferencialmente na sua forma não ionizada (CALDAS et al., 2011). Partindo do conhecimento do pka da substância, devemos ajustar o pH da amostra, se houver a necessidade, para que seja garantida uma maior eficiência na extração. Sabendo que os compostos de interesse são ácidos fracos, sendo o pka em torno de 9 para os metabólitos dos naftalenos, fluorenos e fenantrenos, e 14 para o 1-OHP (Oliveira et al., 2017; Gachanja e Maritim, 2018; Santos et al., 2019), devemos manter o pH da amostra pelo menos abaixo de 7, pois pHs mais elevados pode favorecer a ionização deles. Foram testados os valores de pH de 2, 4 e 5,5, através da adição de uma solução de HCl 0,1% (v/v), sendo que o pH da urina humana está em torno de 5,5. Como pode ser observado na Figura 16, não houve grande influência da eficiência da extração para os diferentes valores de pH. Sendo assim, para evitar uma etapa

adicional de correção do pH, o ajuste foi dispensado na condição otimizada. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada com pH ajustado (com solução de HCl 0,1% (v/v) para 2, 4 e sem ajuste (pH = 5.5), 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de ETOH (solvente dispersor) e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 16).

**Figura 16:** Avaliação do pH da amostra.

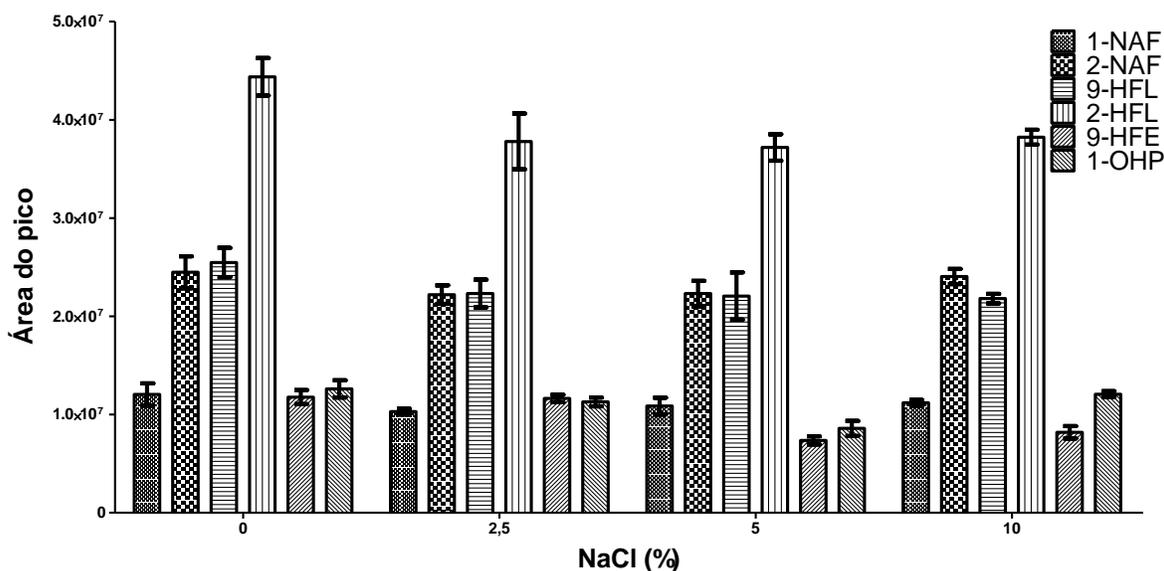


#### 4.2.6 Avaliação da força iônica na DLLME

O efeito conhecido como *salting out* pode melhorar a eficiência da extração devido à diminuição da solubilidade dos analitos na fase aquosa, facilitando sua transferência para a fase orgânica (HUO et al., 2011). Por outro lado, o volume da fase sedimentada pode ser aumentado, uma vez que o solvente extrator também fica mais insolúvel na fase aquosa, diminuindo o fator de enriquecimento da técnica (SARAJI; BOROUJENI, 2014). Trabalhos anteriores que utilizam a microtécnica variam desde a não utilização de sal, até a adição de NaCl em concentrações entre 0,5 e 30% (m/v) (MARTINS et al., 2012).

Foram testadas concentrações de 0 a 10% (m/v) de NaCl. Os resultados expressos na Figura 17 mostram que a não adição de sal faz com que haja uma melhor eficiência na extração da maioria dos analitos. Desta forma, optou-se pela não adição de sal, o que, por ser uma etapa a menos, diminui o tempo de preparo de amostra e mantém uma boa extração dos analitos. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl e nas concentrações de 2,5, 5 e 10%, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de ETOH (solvente dispersor) e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 17).

**Figura 17:** Avaliação da força iônica.



#### 4.2.7 Avaliação da agitação

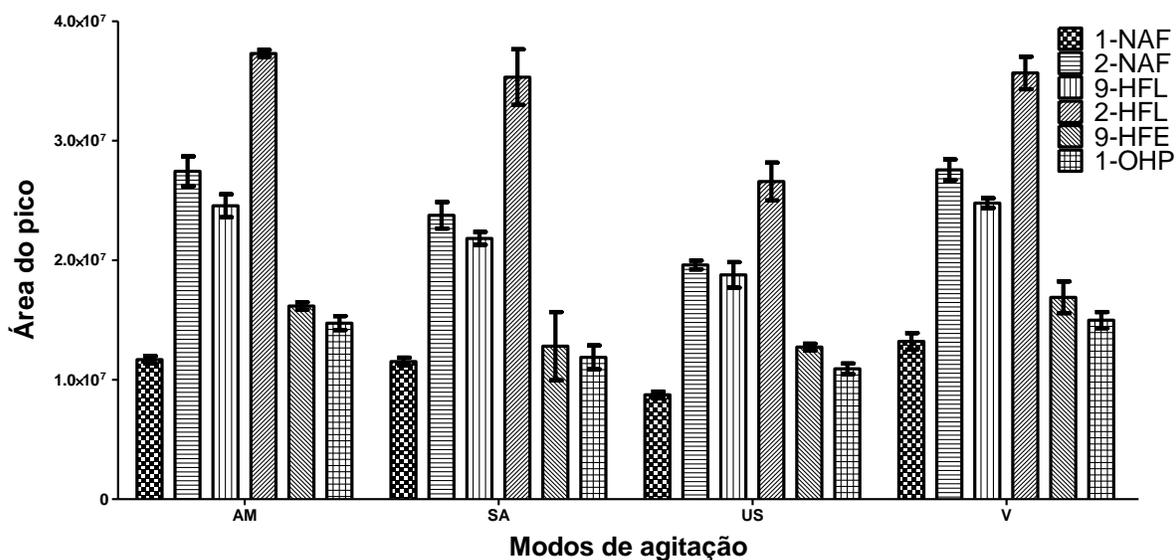
A agitação da amostra foi uma das recentes modificações da técnica DLLME em busca de melhores resultados na eficiência da extração, o que pode contribuir para uma melhor migração dos analitos para a fase orgânica, aumentando o contato entre as fases. São utilizadas a agitação por ultrassom, vórtex e manual. (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014).

Na Figura 18 estão mostradas as eficiências da extração para diferentes modos de agitação: sem agitação, com agitação manual, por ultrassom e em vórtex, mantidas sob agitação por 30 segundos. A agitação por vórtex foi a que visualmente proporcionou melhor eficiência da extração para a maioria dos compostos estudados, além de ser simples de ser executada,

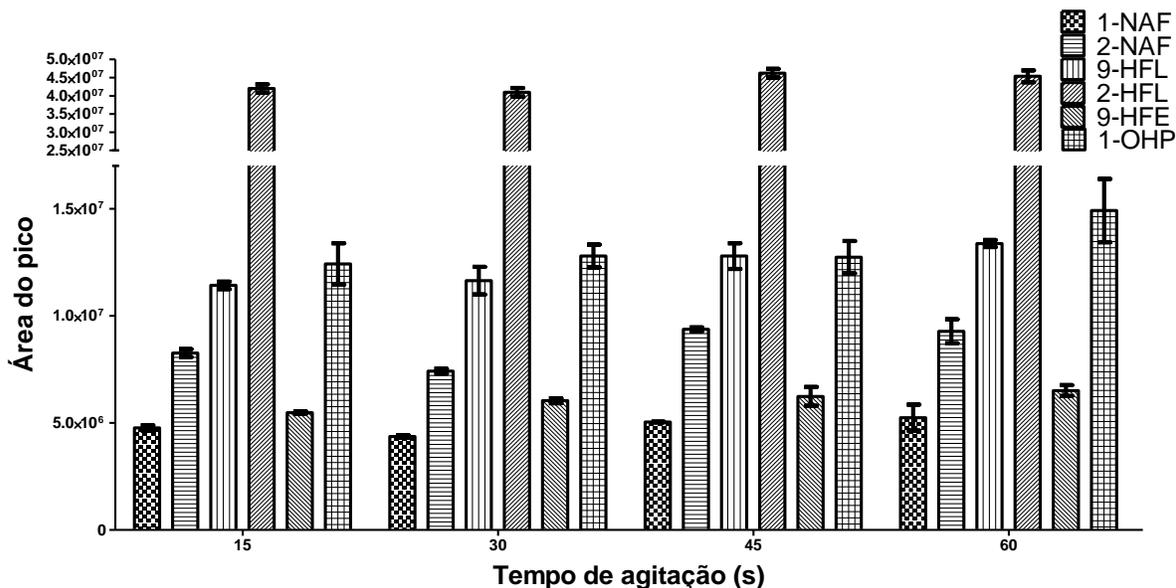
sendo selecionada para o método otimizado. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de ETOH (solvente dispersor), sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl, agitação mantida por 30 segundos e condições diferentes de modos de agitação: sem agitação (SA), agitação manual (AM), agitação por ultrassom (US), agitação em vórtex (V) e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 18).

Na Figura 19 são mostrados diferentes tempos de agitação em vórtex variando entre 15, 30, 45, 60 segundos o tempo agitação de 15 segundos foi selecionado para o método otimizado por extrair satisfatoriamente a maioria dos analitos e o aumento de tempo de agitação não alterar significativamente a eficiência de extração. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de ETOH (solvente dispersor), agitação em vortex (V) foi mantida por diferentes tempos de agitação, 15, 30, 45, 60 segundos e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 19).

**Figura 18:** Avaliação do modo da agitação.



**Figura 19:** Avaliação do tempo da agitação.



### 4.3 Otimização do procedimento de preparo de amostra por AALLME

A microtécnica AALLME foi empregada com intuito de reduzir ainda mais os volumes de solventes orgânicos potencialmente tóxicos ao dispensar o uso do solvente dispersor e ainda alcançar uma alta eficiência de extração dos OH-HPAs das amostras de urina. A influência de diferentes parâmetros tais como a escolha do solvente extrator e seu volume, número de ciclos de extração, pH da amostra, força iônica, modo e tempo de agitação da amostra, foram investigados e otimizados. Nesta etapa, 5 mL de urina com 500 ng mL<sup>-1</sup> de cada OH-HPAs foram utilizados para avaliar o desempenho da extração sob diferentes condições. A otimização foi realizada modificando um parâmetro de cada vez. Todo o procedimento de otimização foi realizado em triplicata. Para evitar contaminação, a seringa de vidro e a agulha foram lavadas com MEOH e água deionizada antes da próxima extração.

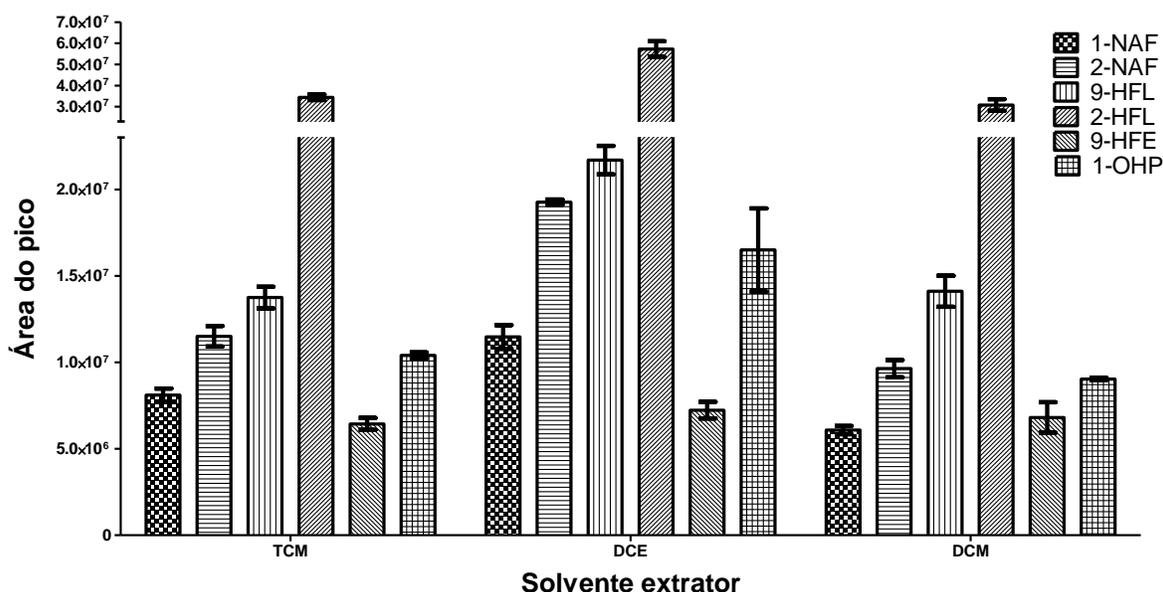
#### 4.3.1 Escolha do solvente extrator

A seleção de um solvente extrator apropriado para a extração dos analitos alvos é um parâmetro importante em diferentes modos de métodos de microextração em fase líquida. Portanto, a etapa mais importante na otimização da AALLME é a seleção do solvente de extrator. Além de uma alta capacidade de extração para os compostos de interesse, o solvente selecionado deve atender a alguns requisitos: baixa solubilidade em água, densidade maior que a água (para nossa

proposta) e deve ser facilmente disperso na água durante o estágio de dispersão empregando uma seringa (FARAJZADEH et al., 2020).

Nesta perspectiva, foram avaliados os seguintes solventes: TCM, DCE e DCM. A Figura 20 mostra, visualmente, que o solvente com a melhor extração para a maioria dos compostos foi o DCE. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 500  $\mu$ L de solvente extrator: TCM, DCE, DCM, 5 ciclos de aspirar e dispensar e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 20).

**Figura 20:** Escolha do solvente extrator na AALLME.

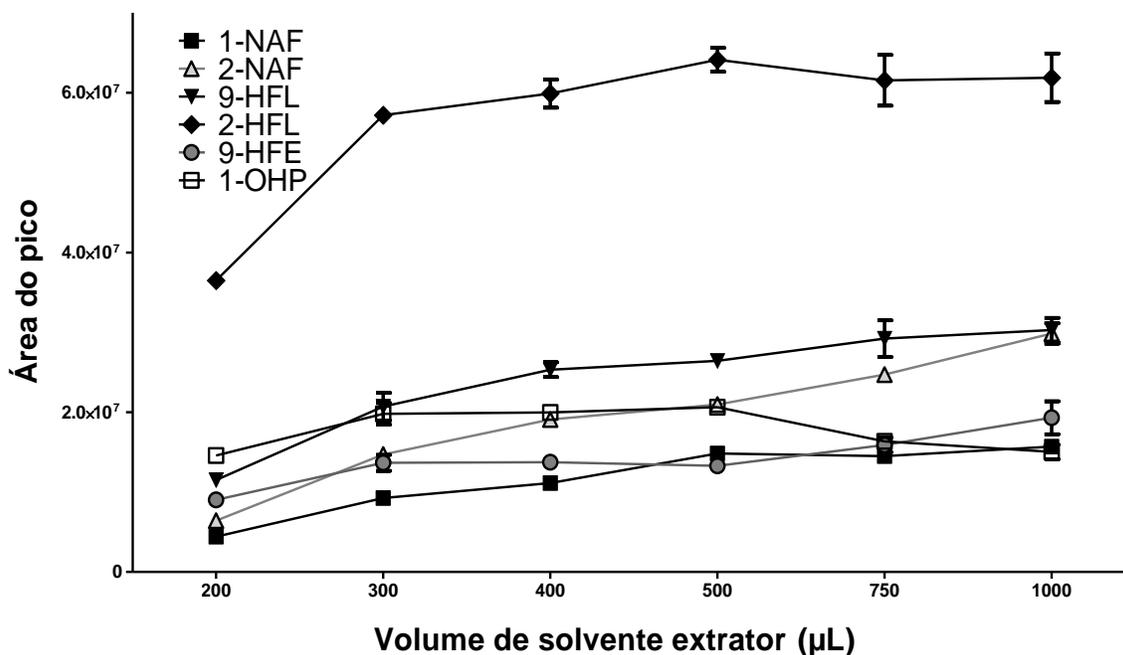


#### 4.3.2 Avaliação do volume de solvente extrator na AALLME

Durante a otimização de um método de microextração líquido-líquido, o volume do solvente de extração é um parâmetro crucial que tem um efeito importante na resposta analítica, uma vez que ele afeta a emulsificação e a eficiência de extração num procedimento de microextração. Em geral, menores volumes de solvente fornecem as maiores eficiências de extração para maioria dos analitos são preferíveis, uma vez que o fator de pré-concentração é mais importante do que a recuperação num procedimento de preparo de amostra líquido-líquido miniaturizado. No entanto, esse volume deve ser suficiente para extrair as quantidades máximas de analitos e permitir sua coleta para análises cromatográficas posteriores.

Os volumes avaliados de DCE variaram de 200, 300, 400, 500, 750 e 1000  $\mu\text{L}$ . Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21. A comparação das eficiências de extração individuais revela uma tendência diferente para os OH-HPAs estudados. Os resultados indicam que a eficiência de extração atinge o equilíbrio entre 300 a 400  $\mu\text{L}$  de solvente de extração para maioria dos analitos, com exceção do 2-NAF e do 1-OHP que apresenta perdas significativas de sinal analítico em volumes superiores a 500  $\mu\text{L}$ . Isso pode ter sido causado pelo efeito de diluição quando um volume maior de solvente de extração foi empregado (MANSOUR; DANIELSON, 2017). Objetivando o menor uso de solvente e extrator tóxico e ao ainda com extração satisfatória para maioria dos analitos o volume de 300  $\mu\text{L}$  de DCE foi selecionado como adequado. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, e diferentes volumes de DCE (solvente extrator): 200, 300, 400 e 500, 750, 1000  $\mu\text{L}$  DCE, 5 ciclos de aspirar e dispensar e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 21).

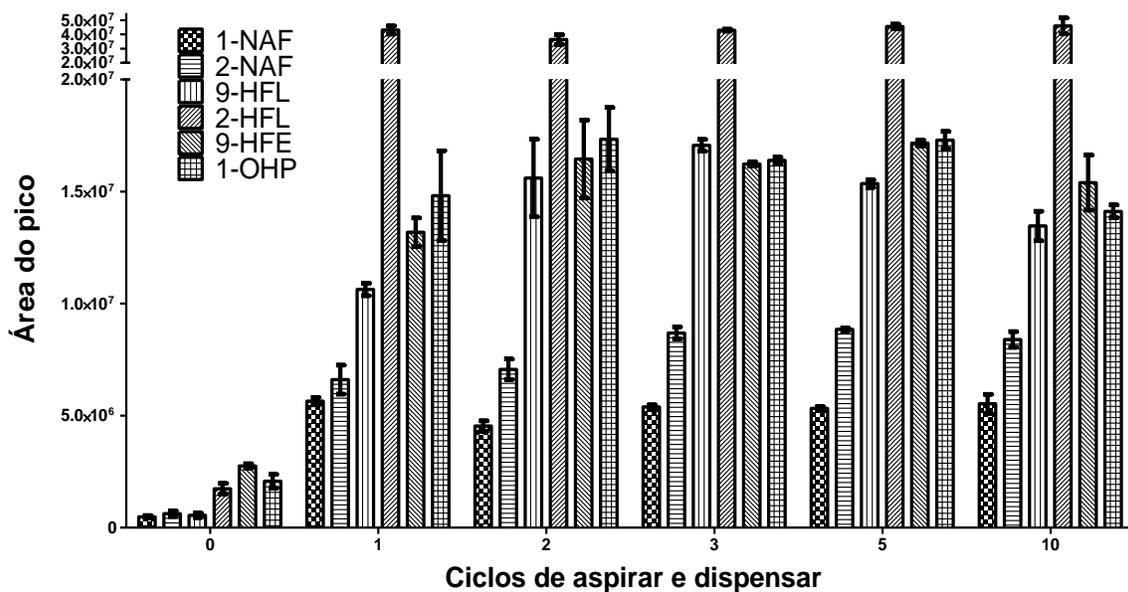
**Figura 21:** Avaliação do volume do solvente extrator na AALLME.



### 4.3.3 Avaliação do número de ciclos de aspiração e dispensação

A aspiração e dispensação da mistura da solução aquosa e solvente extrator por uma seringa de vidro acoplada a uma agulha é chamado de ciclo de extração na AALLME. Espera-se que um maior número de ciclos de extração melhore a eficiência de extração e, portanto, a otimização desse parâmetro é necessária para verificar quantos ciclos devem ser realizados para alcançar o equilíbrio (AMINI; KHANDAGHI; MOGADDAM, 2018). O volume de 300  $\mu$ L DCE foi selecionado como solvente extrator para a extração dos analitos alvos a partir de 5 mL de solução aquosa de amostra e o número de ciclos extração foi estudado na faixa de 1-10 repetições. Como pode ser visto na Figura 22, aumentando os ciclos de extração, a eficiência de extração aumenta até 3 ciclos para a maioria dos analitos e permanecem quase constantes após. Assim, 3 ciclos de extração foram selecionados para os estudos posteriores. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator) e diferentes ciclos de aspirar e dispensar: 0, 1, 2, 3, 5, 10 e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 22).

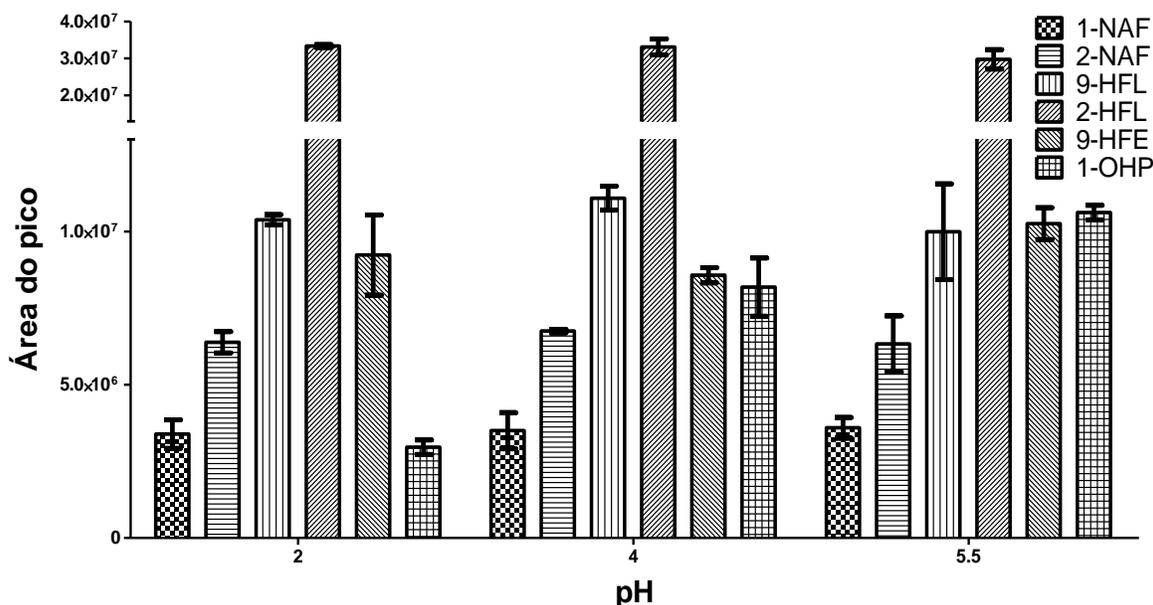
**Figura 22:** Influência do número de ciclos de extração.



#### 4.3.4 Avaliação do efeito do pH na AALLME

O pH da amostra é importante no método de extração, uma vez que as formas não ionizadas dos analitos são melhores extraídas para a fase hidrofóbica (AMINI; KHANDAGHI; MOGADDAM, 2018). As eficiências de extração para a maioria do OH-HPAs foram investigadas no pH da amostra variando de 2 a 5. Como pode ser observado na Figura 23 os resultados não apresentaram diferenças significativas entre a condição de não acidificação (pH natural = 5,5) e a acidificada. Provavelmente, o pH natural de 5,5 foi suficiente para manter as formas neutras dos analitos de OH-HPAs analisados, embora a maioria deles sejam ácidos fracos com valores típicos de pKa maiores que 9. Assim, o ajuste do pH da amostra não foi necessário e desta forma apresentando um resultado similar a DLLME otimizada previamente neste estudo. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada com pH ajustado (com solução de HCl 0,1% (v/v) para 2, 4 e sem ajuste (pH = 5.5), 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 3 ciclos de aspirar e dispensar e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 23).

**Figura 23:** Avaliação do pH da amostra.

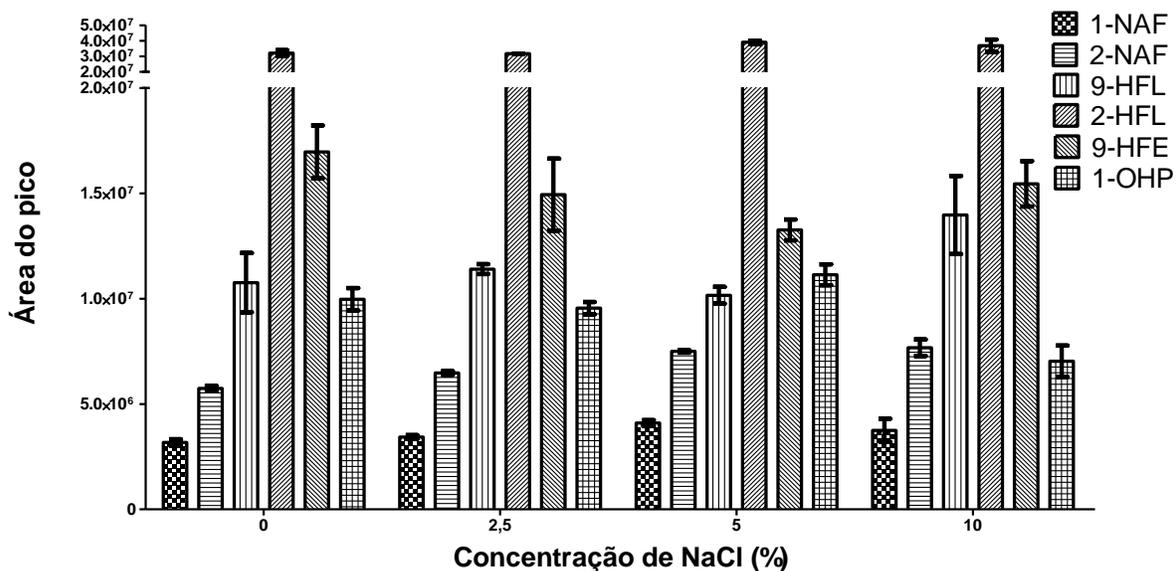


#### 4.3.5 Avaliação do efeito da força iônica na AALLME

Uma das abordagens mais importantes para aumentar a eficiência de extração de um método de microextração é a adição de sal. a força iônica da solução da amostra aumenta por adição

de sal e pode diminuir a solubilidade dos analitos simultaneamente. Esse fenômeno melhora o coeficiente de distribuição dos analitos no extrator. Foram testadas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10% (m/v) de NaCl. De acordo com a Figura 24 a dissolução de NaCl na solução das amostras em diferentes concentrações não apresentaram efeitos significativos na extração dos OH-HPAS como observado anteriormente na etapa de otimização da DLLME deste estudo. Desta forma, optou-se pela não adição de sal, o que, por ser uma etapa a menos, diminui o tempo de preparo de amostra e mantém uma boa extração dos analitos. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl e nas concentrações de 2,5, 5 e 10%, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 3 ciclos de aspirar e dispensar e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 24).

**Figura 24:** Avaliação da força iônica.



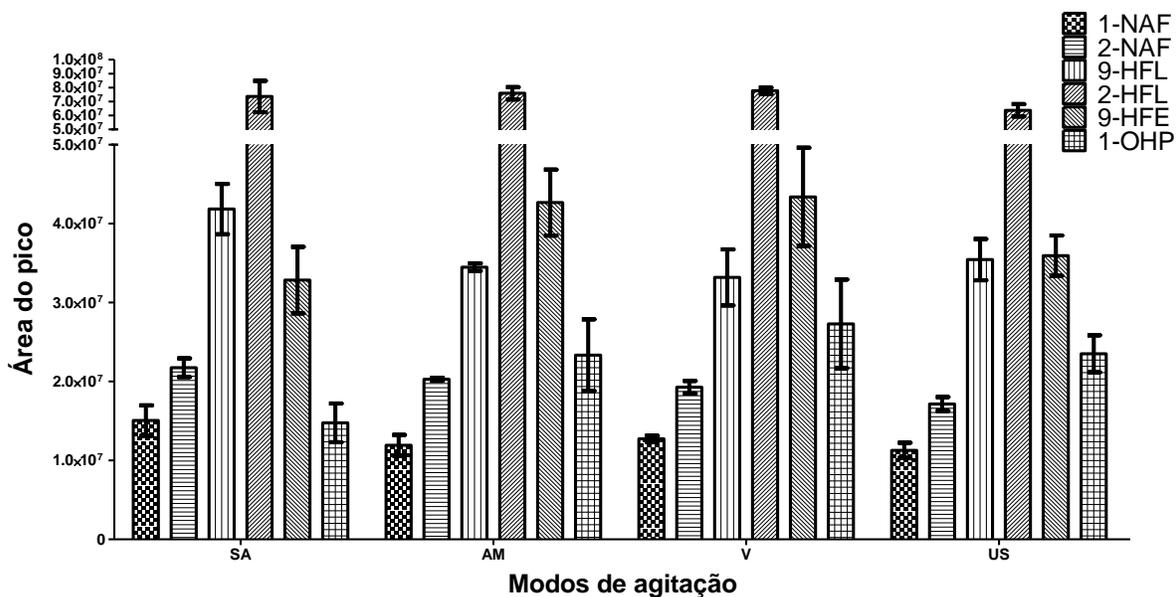
#### 4.3.6 Avaliação do modo e tempo de agitação na AALLME

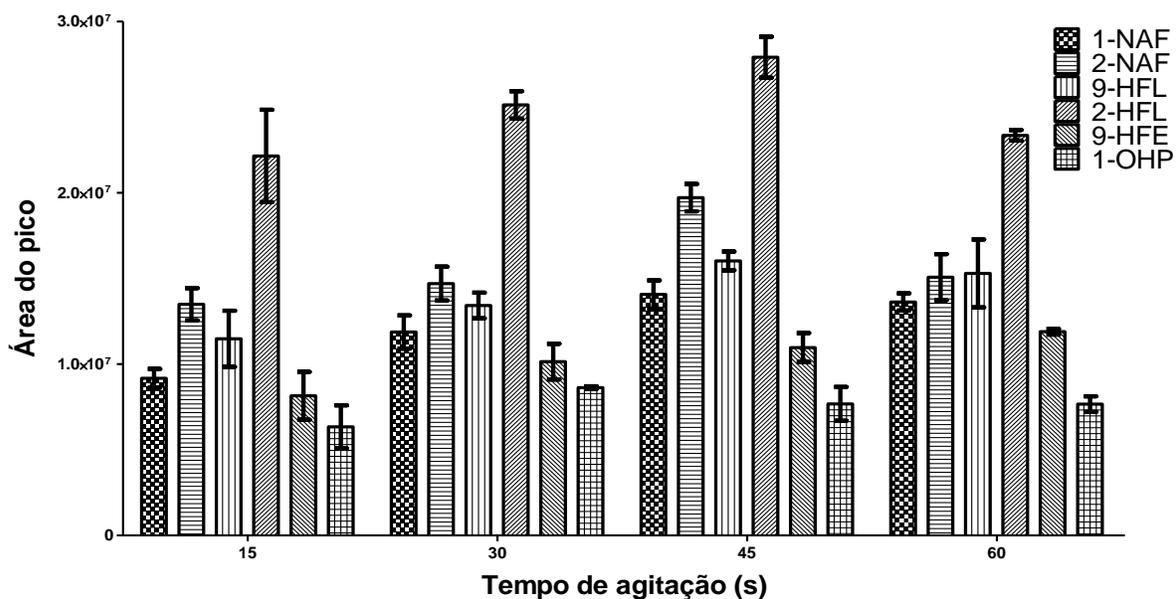
Com o objetivo de aumentar as eficiências de extração dos analitos, as formas de ultrassom, vórtex e agitação manual foram investigadas após a formação de finas gotículas orgânicas pelos ciclos de extração pela seringa de vidro e os resultados comparados sem a agitação (FARAJZADEH; MOGADDAM; AGHDAM, 2013). Como pode ser mostrado na Figura 25 o vórtex foi o que apresentou a melhor extração para o 1-OHP quando comparado com os

demais modos de agitação, desta forma a agitação mecânica utiliza força externa para aumentar a contato entre as fases extrator e doador o que pode resultar num vórtex de emulsificação que geralmente converte uma das duas fases líquidas em finas gotículas (AMINI; KHANDAGHI; MOGADDAM, 2018). Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 3 ciclos de aspirar e dispensar, agitação mantida por 30 segundos e condições diferentes de modos de agitação: sem agitação (S/A), agitação manual (AM), agitação por ultrassom (US), agitação em vórtex (V) e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 25).

Na Figura 26 estão demonstrados diferentes tempos de agitação em vórtex variando entre 15, 30, 45, 60 segundos o tempo agitação de 45 segundos foi selecionado para o método otimizado por extrair satisfatoriamente a maioria dos analitos e o aumento de tempo de agitação não alterar significativamente a eficiência de extração. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 3 ciclos de aspirar e dispensar, agitação em vortex (V) foi mantida por diferentes tempos de agitação, 15, 30, 45, 60 segundos e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 26).

**Figura 25:** Avaliação do modo da agitação.

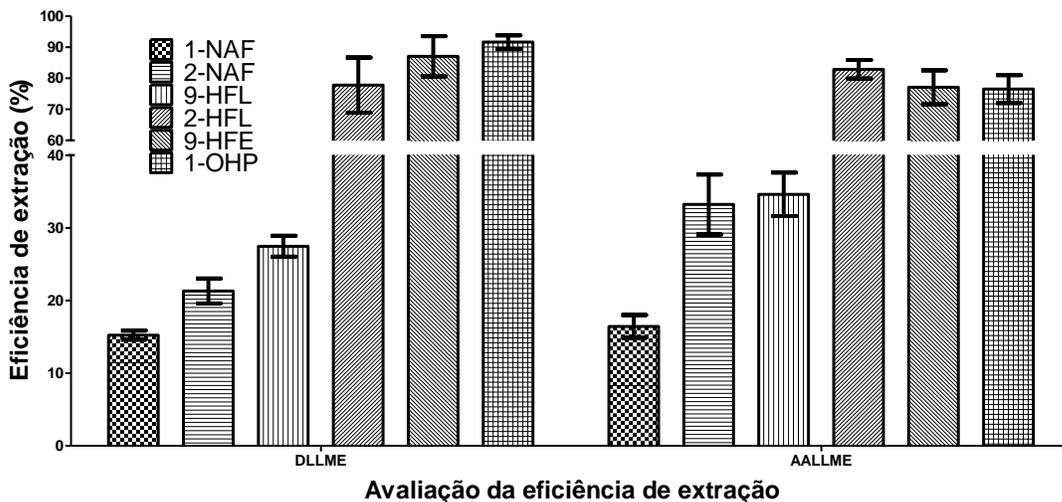


**Figura 26:** Avaliação do tempo da agitação.

#### 4.3.7 Avaliação da eficiência de extração DLLME versus AALLME

Comparando os métodos otimizados da AALLME e DLLME a primeira utiliza o mesmo volume de solvente extrator que a segunda (300  $\mu$ l) e não necessita o uso de solvente dispersor. Por esse motivo, AALLME é mais ambientalmente amigável. Além disso, como mostrado na Figura 27, a eficiência de extração dos métodos da DLLME e AALLME apresentaram faixas de extração similares para a maioria dos analitos alvos, (15,24 – 91,61%) e (16,44 – 82,87%) respectivamente. A AALLME por ser mais ecológica e apresentar eficiência de extração comparáveis a DLLME, foi selecionada para análise de algumas figuras de mérito e aplicação em amostras de urinas humanas. Condições de extração: 5 mL de urina sintética, 5 mL de água deionizada, sem ajuste de (pH= 5.5), sem adição de NaCl, 300  $\mu$ L de DCE (solvente extrator), 500  $\mu$ L de ETOH (solvente dispersor) na DLLME com agitação em vortex (V), por 30 segundos e 3 ciclos de aspirar e dispensar na AALLME com agitação em vortex (V) por 45 segundos e 5 minutos de centrifugação a 4000 rpm. A barra de erros indica o desvio padrão da determinação de 3 replicatas (Figura 27).

**Figura 27:** Avaliação da eficiência de extração DLLME vs. AALLME.



## 5. Avaliação das figuras de mérito

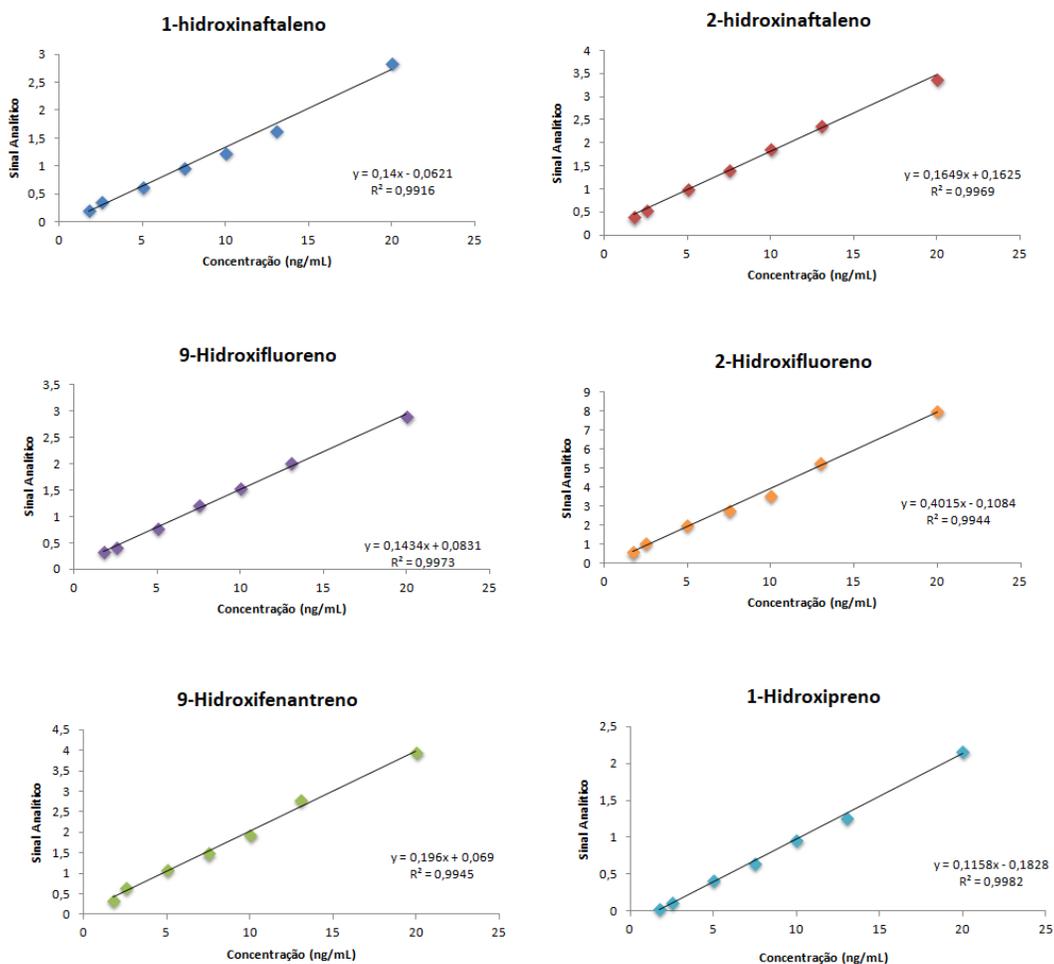
A técnica de preparo das amostras AALLME foi selecionada no estudo para a determinação dos OH-HPAs em amostras de urina humana. Para isso, algumas figuras de mérito foram avaliadas seguindo as recomendações da ANVISA na RDC N° 27 de 17 de maio de 2012, para validação de métodos bioanalíticos, incluindo linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, efeito matriz, precisão e exatidão.

### 5.1 Linearidade, limites de detecção e quantificação

A linearidade do método foi realizada pela construção de três curvas de calibração analítica com seis diferentes concentrações, e adicionadas de padrão interno. A linearidade foi estabelecida por regressão linear empregando o método dos mínimos quadrados, e avaliada relacionando a razão das áreas dos analitos e do padrão interno (área relativa) *versus* as concentrações nominais dos analitos. O método proposto apresentou diferentes intervalos lineares para os compostos analisados. Isso pode ser explicado devido a diferenças de comportamento dos compostos estudados na extração e em uma mesma corrida cromatográfica, como a partição dos compostos entre o gás de arraste e a fase estacionária. Todos os coeficientes de correlação ( $r$ ) obtidos foram superiores a 0,99, indicando uma boa linearidade. Os resultados obtidos bem como a equação e faixa linear de cada composto são mostrados na tabela 3. Os Limites de detecção (LD) para as substâncias estudadas apresentaram um intervalo variando de

0,24 a 0,69, e os limites inferiores de quantificação (LIQ) para os compostos variaram de 0,72 a 2,09 ng/mL. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 3. A partir da análise da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que o método analítico desenvolvido possui excelente correlação entre a concentração dos analitos e a resposta instrumental, visto que os valores obtidos para coeficiente de correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99. De acordo com as normas preconizadas pela ANVISA por meio da Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012, o valor de  $r$  é aceitável para estudo de linearidade é maior que 0,98. As curvas analíticas para os seis metabólitos mono-hidroxilados de HPA estão mostradas na Figura 28, e cada ponto de cada curva foi obtido como a média de três replicatas (Figura 28).

**Figura 28:** Curvas analíticas para os seis metabólitos de OH-HPAs na faixa de concentração de 1,75 a 20 ng/mL de urina.



**Tabela 3:** Linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LOQ), equação da reta e coeficiente de correlação ( $r$ ) dos compostos.

Analito	Intervalo linear (ng/mL)	Equação linear	$r$	LD (ng/mL)	LIQ (ng/mL)
1-NAF	1,95 - 20,00	$0,14x - 0,0621$	0,9958	0,65	1,95
2-NAF	0,72 - 20,00	$0,1649x + 0,1625$	0,9984	0,24	0,72
9-HFL	1,75 - 20,00	$0,1434x + 0,0831$	0,9986	0,58	1,75
2-HFL	2,09 - 20,00	$0,4015x - 0,1084$	0,9972	0,69	02,09
9-HFE	1,89 - 20,00	$0,1960x + 0,0690$	0,9972	0,62	1,89
1-OHP	1,75 - 20,00	$0,1158x - 0,1828$	0,9990	0,58	1,75

Para certificar que o limite de quantificação calculado no estudo era a menor concentração quantificada de cada OH-HPA com CV de até 20% e porcentagem de inexatidão de  $\pm 20\%$ , foram avaliadas 10 amostras de urina sintética enriquecidas com padrões de OH-HPA na concentração de 1,75 ng/mL de urina. Valores estão indicados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Limite de quantificação do método para determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=10).

LQ (1,75 ng/mL)	Precisão - CV (%)	Exatidão - EPR (%)
1-hidroxinaftaleno	14,75	-0,91
2- hidroxinaftaleno	8,59	-8,73
9-hidroxifluoreno	13,05	-6,43
2-hidroxifluoreno	12,29	-0,73
9-hidroxifenantreno	10,22	4,05
1-hidroxipireno	12,37	1,95

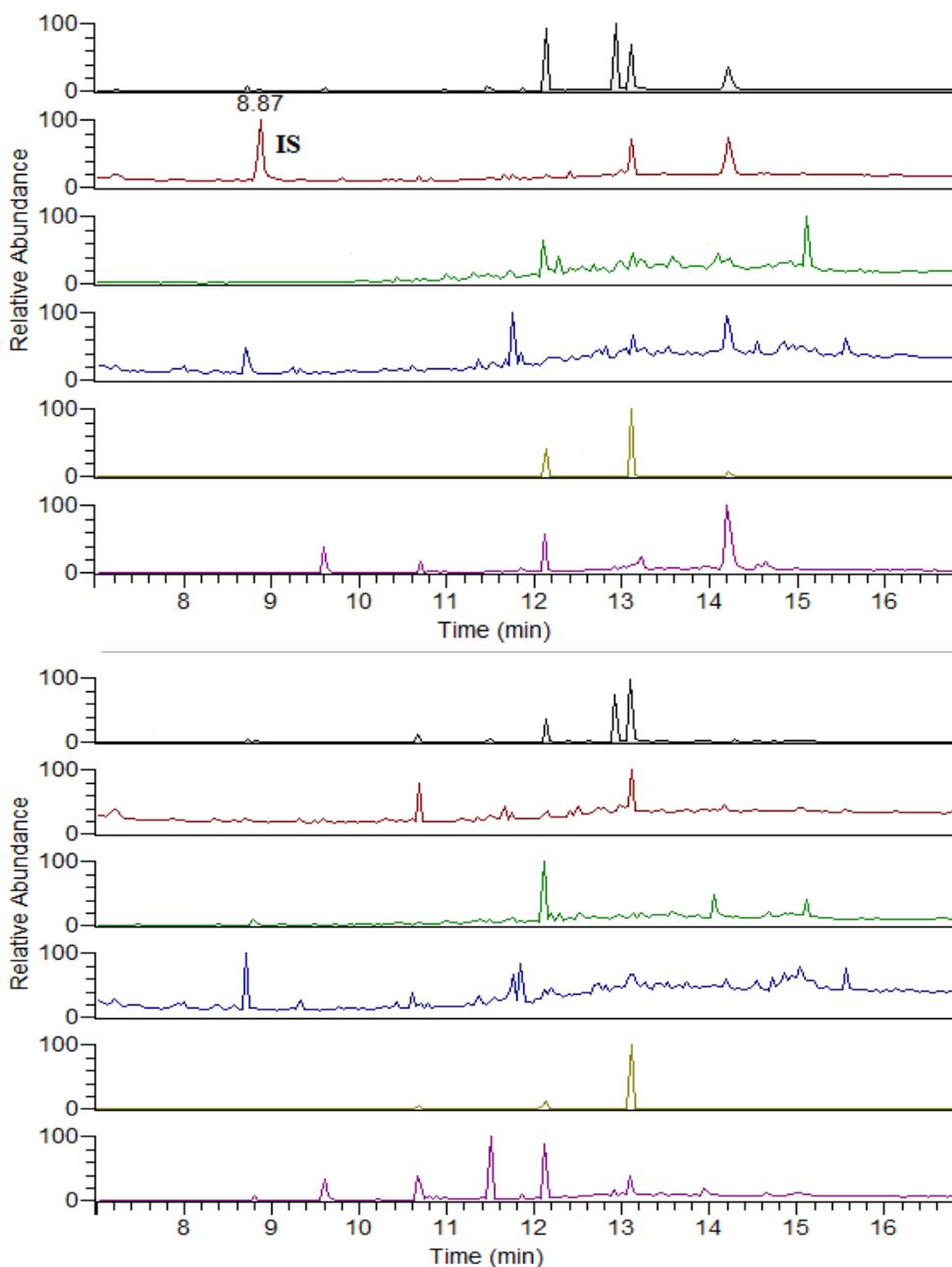
CV= coeficiente de variação (desvio padrão/concentração média experimental)\*100

EPR= erro padrão relativo (concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal \* 100

## 5.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de seis amostras branco (urina sintética), matriz com ausência dos analitos de interesse, e pela análise de seis amostras zero, que consiste em matriz ausente de OH-HPAs, mas com adição de padrão interno. Os cromatogramas da amostra branco e da amostra zero estão indicados na Figura 29.

**Figura 29:** Cromatograma obtido a partir da análise de urina sintética (amostra branco) e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 20 ng/mL de urina.



### 5.3 Efeito matriz

As amostras de urina sintética não apresentaram interferência endógena no método de análise dos OH-HPAs. Os coeficientes de variação (CV) dos fatores de matriz normalizados (FMNs) relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 % (Tabela 5), indicando ausência de efeito matriz no método proposto.

**Tabela 5:** Efeito matriz para os metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (OH-HPA) em urina sintética.

<b>Efeito Matriz - CV (%)</b>	
1-hidroxinaftaleno	13,1
2- hidroxinaftaleno	2,7
9-hidroxifluoreno	7,3
2-hidroxifluoreno	9,9
9-hidroxifenantreno	14,4
1-hidroxipireno	11,8

### 5.4 Precisão e Exatidão

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas, em sextuplicata para cada valor de concentração, (Tabela 6 e 7) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados.

Tabela 6 – Precisão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=6 para cada controle de qualidade).

Precisão CV (%)	1NAF	2NAF	9HFL	2HFL	9HPE	1OHP
Intra LIQ	12,7	9,5	11,5	6,8	9,2	7,2
CQB	5,7	5,3	5,9	9,8	11,8	2,4
CQM	3,9	2,6	5,8	4,6	9,8	2,8
CQA	9,9	1,8	1,0	2,8	0,6	0,3
Inter LIQ	14,6	12,6	14,4	12,3	10,2	14,6
CQB	12,6	10,8	8,4	12,7	13,1	12,8
CQM	8,7	3,1	5,5	10,8	8,5	8,0
CQA	9,2	6,7	7,6	6,7	12,0	10,9

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/concentração média experimental)\*100

Tabela 7 – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina sintética (n=6 para cada controle de qualidade).

Exatidão EPR (%)	1NAF	2NAF	9HFL	2HFL	9HPE	1OHP
Intra LIQ	0,1	-8,5	-13,9	9,4	-3,6	2,4
CQB	-5,8	1,3	-1,4	-8,0	12,6	3,9
CQM	-3,9	-2,2	-5,3	0,2	6,8	3,5
CQA	0,1	-0,7	-3,0	6,5	11,8	-4,3
Inter LIQ	3,0	-11,5	-8,3	-0,7	4,1	-0,5
CQB	4,7	-4,8	-0,7	-0,3	11,4	9,8
CQM	-4,4	-2,4	-7,8	1,4	13,6	9,8
CQA	-4,3	0,1	2,7	10,1	4,4	13,7

EPR= erro padrão relativo (concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal \* 100

O método validado para determinação metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina está de acordo com as diretrizes estabelecidas pela ANVISA (Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012). O método analítico empregando ALLME mostrou-se uma alternativa simples, rápida, de baixo custo e o pequeno volume de solventes orgânicos necessário, tornam a proposta aqui apresentada altamente atraente para aplicações em rotina de estudos de biomonitoramento humano, quando comparado a técnicas de preparo de amostras clássicas descritas na literatura, tais como SPE, LLE e DLLME como mostrado na Tabela 8. Ademais, como outras vantagens, a técnicas de ALLME apresentou elevada eficiência de extração nas condições otimizadas utilizando menor volume de solvente, além de dispensar o uso do solvente dispersor o que torna a técnica ambientalmente amigável.

**Tabela 8** – Comparação das características analíticas do método validado de AALLME para quantificação de OH-HPA em urina com outros estudos descritos na literatura.

Referências	LIQ (ng/ mL)	Amostra	Método	Volume de solvente	Preparo das amostras	Análise Instrumental
<b>Presente estudo</b>	0,7 - 2,1	5 mL	ALLME	0,3 mL	72 min	17 min
<b>Campo et al. (2008)</b>	0,1 - 1,4	2 mL	LLE	4,0 mL	2h20	39 min
<b>Serdar et al. (2003)</b>	0,9 - 8,7	2 mL	LLE	8,0 mL	3h00	74 min
<b>Grova et al. (2005)</b>	1,7 - 8,3	10 mL	LLE/ SPE	35 mL	4h00	19 min
<b>Gupta et al. (2015)</b>	3,0 – 29,0	10 mL	DLLME	0,4 mL	27 min	21 min

### 5.5 Aplicação do método analítico em urina humana

O método desenvolvido e validado foi aplicado na determinação dos 6 OHHPAs em 20 amostras de urina de voluntários da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. A concentração do 1-OHP em todas as amostras analisadas foi abaixo do limite de detecção. Possivelmente um método com maior capacidade de preconcentrar o analito ou o uso de um sistema de detecção mais sensível como GC-MS/MS ou LC-MS/MS sejam requeridos para sua detecção. Visto que esse analito foi detectado na faixa 0,100 a 0,450 ng/ mL por (CDC 2021) e o LIQ do presente estudo para esse analito é de 1,75 ng/ mL. O 9-HFE apresentou a mais alta porcentagem de detecção e quantificação, correspondendo a 60% do total de amostras analisadas em concentrações que variaram de 3,71 a 5,59 ng/mL com média de 4,70 ng/ mL, apresentando resultados próximos aos descritos por Urbancova e colaboradores (2016), que apresentou concentrações que variaram de 0,01 a 19,00 ng/mL e média de 0,83 ng/mL. Os analitos 1-NAF e 2-NAF foram mensurados em 45% e 25% das amostras em concentrações que variaram de 0,87 a 7,59 ng/mL e 1,86 a 7,24 ng/mL com médias de 3,21 e 4,20 ng/ mL respectivamente, apresentando resultados próximos aos descritos por CDC (2021). O 2-HFL e o 9-HFL foram quantificados em 10% e 25% das amostras em concentrações de 1,28 (1,12 - 1,43) ng/ mL e 3,27 (0,58 - 8,58). Os resultados estão apresentados na Tabela 9, e as concentrações abaixo do LD foram substituídas pelo valor referente ao LD do analito dividido por 2.

**Tabela 9** – Concentração determinada para cada metabólito de OH-HPAs em amostras de urina humana. Os valores são expressos em ng/mL de urina. (continua)

<b>Amostras</b>	<b>1-NAF</b>	<b>2-NAF</b>	<b>9-HFL</b>	<b>2-HFL</b>	<b>9-HFE</b>	<b>1-OHP</b>
<b>(Média)</b>	3,21	4,20	3,27	1,28	4,70	0,29*
<b>(Min – Max)</b>	0,87 – 7,59	1,86 – 7,24	0,58 – 8,58	1,12 – 1,43	3,71 – 5,59	0,29*
<b>(Detecção – %)</b>	45	25	25	10	60	0
<b>(Amostra – 1)</b>	0,33*	0,12*	0,29*	1,12	5,02	0,29*
<b>(Amostra – 2)</b>	0,33*	0,12*	3,58	0,35*	5,29	0,29*
<b>(Amostra – 3)</b>	0,33*	1,89	0,58	0,35*	0,31*	0,29*

Tabela 9 – Concentração determinada para cada metabólito de OH-HPAs em amostras de urina humana. Os valores são expressos em ng/mL de urina. (conclusão)

Amostras	1-NAF	2-NAF	9-HFL	2-HFL	9-HFE	1-OHP
(Amostra – 4)	1,86	0,12*	0,29*	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 5)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	4,73	0,29*
(Amostra – 6)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	4,72	0,29*
(Amostra – 7)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	4,32	0,29*
(Amostra – 8)	1,77	0,12*	0,29*	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 9)	3,62	0,12*	0,29*	1,43	3,72	0,29*
(Amostra – 10)	4,04	0,12*	0,29*	0,35*	3,92	0,29*
(Amostra – 11)	0,87	0,12*	0,29*	0,35*	3,71	0,29*
(Amostra – 12)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	4,82	0,29*
(Amostra – 13)	1,96	3,71	8,58	0,35*	5,17	0,29*
(Amostra – 14)	4,82	6,32	2,51	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 15)	2,32	1,86	0,29*	0,35*	5,43	0,29*
(Amostra – 16)	7,59	7,24	0,29*	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 17)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	5,59	0,29*
(Amostra – 18)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 19)	0,33*	0,12*	0,29*	0,35*	0,31*	0,29*
(Amostra – 20)	0,33*	0,12*	1,11	0,35*	0,31*	0,29*

\*Valor equivalente ao Limite de Detecção/2

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta a comparação entre duas microtécnicas de preparo de amostra, a DLLME e a AALLME. As condições otimizadas de cada técnica analítica, como o tipo e volume de solvente extrator, força iônica, pH, modo e tempo de agitação, favorecem o aumento da eficiência da extração. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, a técnica de AALLME mostrou-se tão ou mais eficiente que a DLLME, e com menor consumo de solvente orgânico durante o processo. A utilização de AALLME apresenta muitas vantagens, quando comparada com técnicas convencionais já descritas na literatura, como a extração em fase sólida. Menores volumes de amostra e solventes orgânicos utilizados, não utilização solvente dispersor, diminuindo o volume de resíduos gerados, torna o método atrativo para estudos de BH. Diante do exposto, o método de AALLME foi desenvolvido e validado, e está de acordo com as diretrizes estabelecidas pela ANVISA, na RDC N° 27 de 17 de maio de 2012, podendo ser utilizado para análise de metabólitos dos OH-HPAS na urina e aplicado em estudos de biomonitoramento humano. Ademais, a técnica permite a determinação simultânea de vários analitos da mesma classe em uma única análise instrumental por GC-MS no tempo total de aproximadamente 17 minutos.

## REFERÊNCIAS

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: State of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 3–4, p. 201–228, 2007.

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, 2016.

Agency For Toxic Substances And Disease Registry (ATSDR). Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). **Case Studies in Environmental Medicine**, p. 1–68, 2009.

Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). ATSDR's Substance Priority List. August, 2017. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/#2017spl> Acesso em: 28/02/2019.

American Conference of Government Industrial Hygienists. 2005 TLVs e BEIs – Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Tradução da Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. São Paulo: **ABHO**; 2005.

AMINI, R.; KHANDAGHI, J.; MOGADDAM, M. R. A. Combination of Vortex-Assisted Liquid–Liquid Extraction and Air-Assisted Liquid–Liquid Microextraction for the Extraction of Bisphenol A and Bisphenol B in Canned Doogh Samples. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 11, p. 3267–3275, 2018

ANDERSSON, J.T.; ACHTEN C. Time to say goodbye to the 16 EPA-PAHs? Toward an upto-date use of PACs for environmental purposes, **Polycyclic aromatic compounds**. V.35, n. 2-4, p. 330–354, 2015.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: State of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 3–4, p. 201–228, 2007.

BARBEAU, D.; MAÎTRE, A.; MARQUES, M. Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. **The Analyst**, v. 136, n. 6, p. 1183, 2011.

BARBOSA, F. et al. Elevated blood lead levels in a riverside population in Brazilian Amazon, **Environmental Research**, v.109, p.594-599, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)>. Acesso em: maio/2018.

BOCATO, M. Z.; XIMENEZ, J. P. B.; HOFFMANN, C.; BARBOSA, F. Jr. An overview of the current progress, challenges, and prospects of human biomonitoring and exposome studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**. V.22, n. 5-6, pg 131-156, 2019.

CAMPO, L. et al. Biological Monitoring of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at an Electric Steel Foundry in Tunisia. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 700–716, 2016.

CAMPO, L.; ROSSELLA, F.; FUSTINONI, S. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 875, n. 2, p. 531–540, 2008.

CANADIAN HEALTH - Canadian Health Measures Survey (CHMS). Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada. 2010.

CAPELO, J. L. et al. Micro-focused ultrasonic solid–liquid extraction ( $\mu$ FUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: optimization and linking with the analytical minimalism concept. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1272-1280, 2005.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Fourth National on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services, CDC, 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Fourth Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Updated Tables. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018.

ELOVAARA, E.; VÄÄNÄNEN, V.; MIKKOLA, J. Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with  $\beta$ -naphthoflavone in. **Archives of Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 183–193, 2003.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, v. L364, n. 1881, p. 5–24, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **EFSA**, v. 724, p. 1-114, 2008.

FARAJZADEH, M. A. et al. Air-assisted liquid-liquid microextraction; principles and applications with analytical instruments. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, p. 115734, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115734>>.

FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R. A.; AGHDAM, A. A. Comparison of air-agitated liquid-liquid microextraction technique and conventional dispersive liquid-liquid micro-extraction for determination of triazole pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 70–78, 2013.

FELIX, T.; HALL, B.J.; BRODBELT, J.S. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 371, p. 195-203, 1998.

GOUVEIA, N. et al. Projeto-piloto do Primeiro Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, 2008-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 3, p. 553–558, 2014.

GROVA, N. et al. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 10, p. 1653–1667, 2011.

GUPTA, M. K. et al. Determination of Urinary PAH Metabolites Using DLLME Hyphenated to Injector Port Silylation and GC-MS-MS. **Journal of analytical toxicology**, v. 39, n. 5, p. 365-373, 2015.

HAINES, D. et al. An overview of human biomonitoring of environmental chemicals in the

Canadian Health Measures Sur, 2017vey: 2007-2013. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 2, p. 13-28, 2017.

HUO, X. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of six fungicides in fruit samples by GC-ECD. **Chromatographia**, v. 73, n. 3–4, p. 313–319, 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Polynuclear Aromatic Compounds PART 1, Chemical, environmental and experimental data. **IARC, International Agency for Research on Cancer**, v. 32, p. 1–483, 1983.

KIM, K. H. et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v. 60, p. 71–80, 2013.

KROESE, E. D. et al. Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **National Institute of Public Health and the Environment**, n. 658603 010, 2001.

LANKOVA, D. et al. A novel strategy for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxylated metabolites in urine using ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 10, p. 2515–2525, 2016.

LI, Z. et al. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 16, p. 5744–5751, 2006.

Liu et al. Quantification of selected monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. **Science China Chemistry**, V. 58, n. 10 p. 1579–1584, 2015.

MA, Y.; HARRAD, S. Spatiotemporal analysis and human exposure assessment on polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air, settled house dust, and diet: A review. **Environment International**, v. 84, p. 7–16, 2015.

MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, v. 170, n. January, p. 22–35, 2017.

MARTINS, M. L. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva ( DLLME ): fundamentos e aplicações. v. 4, n. 1, p. 35–51, 2012.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva ( DLLME ): fundamentos , inovações e aplicações biológicas. v. 6, n. 3, p. 186–204, 2014.

MOUSTAFA, G.-A. et al. Skin disease after occupational dermal exposure to coal tar: a review of the scientific literature. **International Journal of Dermatology**, v. 54, n. 8, p. 868–879, 2015.

PARKER, S. et al. Quantitative bioanalytical validation of fosfomicin in human whole blood with volumetric absorptive microsampling. *Bioanalysis* 7, 2585–2595, 2015.

PASCHAL, D. Biological monitoring of toxic elements. **Journal of Chemical Health and Safety**, v15, p.8-13,2007.

PAZ, A. P. S. DA et al. Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 0, 2017.

PLOTKA-WASYLKA, J.; OWCZAREK, K.; NAMIESNIK, J. Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 46-64, 2016.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 565-574, 2003.

RAMESH, A. et al. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. **International journal of toxicology**, v. 23, n. 5, p. 301-333, 2004.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2001. 174p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000238361>>. Acesso em: 2018-05-06.

SANTOS, M.G.; ABRÃO, L.C.C.; FREITAS, L.A.S.; MORAES, G.O.S.; LIMA, M.M.; FIGUEIREDO, E.C. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 161-195, 2012.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. **Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction** *Microextraction Techniques*. [s.l: s.n.]v. 406

SCINICARIELLO, F.; BUSER, M. C. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood obesity: NHANES (2001-2006). **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 3, p. 299–303, 2014.

SROGI, K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 169–195, 2007.

UNWIN, J. et al. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 50, n. 4, p. 395–403, 2006.

VAN DE WIELE, Tom R. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. **Journal of Chromatography B**, v. 806, n. 2, p. 245-253, 2004.

XU, X. et al. Selective detection of monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 19, p. 2299–2308, 2004.

XIA, Y. et al. Urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to idiopathic male infertility. **Human Reproduction**, v. 24, n. 5, p. 1067–1074, 2009.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety). Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, **World Health Organization**, Geneva. 1998.

YAN, H.; WANG, H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 1–15, 2013.

## ANEXOS

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do FCFRP - USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 020/2018  
kms

Ribeirão Preto, 08 de novembro de 2018.

Ao pesquisador  
**João Carlos Jacinto da Cunha de Souza**  
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior  
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS MONO-HIDROXILADOS DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM URINA EMPREGANDO MICRO-AMOSTRAGEM VOLUMÉTRICA ABSORPTIVA E QUANTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 477 - CAAE: 91124418.2.0000.5403**, foi aprovado “*ad referendum*” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 08/11/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.009.288.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
Coordenadora do CEP/FCFRP

## **ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

“Determinação dos principais metabólitos mono-hidroxilados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em urina empregando micro-amostragem volumétrica absorptiva e quantificação por LC-MS/MS”

### **Prezado (a),**

O senhor (a) está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa sobre avaliação da exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs que estão amplamente presentes no meio ambiente de maneira natural ou de atividades que o ser humano utiliza fontes naturais para processos industriais, como por exemplo a queima de combustíveis fósseis, podendo desta maneira o senhor (a) estar exposto (a) a esses contaminantes que podem ser tóxicos, ou seja, que são prejudiciais ao organismo/corpo humano.

Os valores dos HPAs no corpo podem variar de pessoa a pessoa, devido ao sexo, idade, dieta, histórico médico, tabagismo, etc. Assim, pessoas que estão expostas aos HPAs, podem apresentar valores corporais diferentes e estes dados são muito importantes para avaliar os efeitos tóxicos que os HPAs possam causar. Para isso, será necessário a coleta de urina do Sr. (a), para a realização de testes laboratoriais.

Esperamos que cerca de 20 pessoas de ambos os sexos com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes que trabalhem no departamento da FCF-RP aceitem participar desta pesquisa através de uma coleta de urina. Este documento foi elaborado para lhe fornecer informações importantes e necessárias a respeito desta pesquisa. Antes de o Sr. (a) decidir se quer participar ou não deste estudo, é extremamente importante que Sr. (Sra.) saiba a razão pela qual a pesquisa está sendo desenvolvida e o que ela irá envolver.

### **Por que esta pesquisa será feita?**

Para desenvolver um aparelho que possa coletar urina em casa à temperatura ambiente sem precisar de ficar guardado na geladeira, o que facilitaria a coleta em regiões de difíceis acesso. Ainda não se sabe por quanto tempo essa urina pode ficar fora da geladeira sem degradar o “contaminante”, por esse motivo será realizado este estudo.

### **Quais serão os procedimentos que serão realizados?**

1- O voluntário receberá um recipiente plástico onde deverá ser depositada a urina de qualquer horário do dia.

2- A coleta poderá ser realizada onde o Sr.(a) preferir inclusive na sua residência desde que o frasco seja tampado e armazenado em geladeira até a entrega do material para o pesquisador João Carlos que será responsável por receber as urinas coletadas.

3- As urinas devem ser entregues no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP/USP, sala 85 AA Caso concorde em participar, o Sr. (a) também terá a liberdade de desistir a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

### **Quais os riscos e desconfortos ao participar desta pesquisa?**

O procedimento de coleta de urina não há riscos previsíveis e não precisará ser assistido por nenhum integrante da pesquisa, tendo o voluntário total privacidade e evitando possíveis desconfortos. Diante de qualquer eventual dano decorrente desta pesquisa será garantida a indenização ao participante.

### **Quais os benefícios de participar deste estudo?**

O conhecimento obtido pela pesquisa ajudará a avaliar se o Sr. (a) está exposto (a) HPAs o que pode ser prejudicial à saúde.

Todos os resultados individuais dos exames serão encaminhados ao Sr. (a) pessoalmente após a análise dos resultados pelo Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior. Os pesquisadores se propõem a apresentar os resultados em forma de palestras ou reuniões de grupo, em dias pré-estabelecidos a todos os participantes do estudo.

### **Custos**

É importante lembrar que o Sr. (a) não terá gastos financeiros com a pesquisa. Também, como a sua participação será voluntária, o Sr. (a) não receberá nenhum valor.

### **Privacidade / Confidencialidade**

Os resultados que serão divulgados nunca terão a sua identidade divulgada e serão usados somente para fins de pesquisa. O Sr.(a) poderá desistir de participar a qualquer momento, mesmo depois de ter doado urina; para isto, o Sr. (a) deverá informar os pesquisadores nos telefones abaixo e seu questionário e as suas amostras serão jogadas fora. Este documento será impresso e assinado em duas vias e uma delas ficará com o Sr. (a).

### **Contatos**

Você poderá solicitar quaisquer informações adicionais, a qualquer momento, entrando em contato com os pesquisadores: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior e João Carlos Jacinto da Cunha de Souza pelos telefones, inclusive ligações a cobrar, (16) 3315-4701 (de segunda a sexta das 08:00 as 17:00) ou (31) 99812-1188 (João Carlos) a qualquer momento. Você ainda poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo telefone (16) 3315-4213 (de segunda a sexta das 08:00 as 17:00).

**Armazenamento das amostras:** Ao final da pesquisa, o material coletado será descartado.

“Li e concordo em participar da pesquisa. ”

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Participante:

Documento:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior  
Pesquisador Responsável; CPF: 670.028.461-91

\_\_\_\_\_  
João Carlos Jacinto da Cunha de Souza  
Pesquisador Responsável; CPF: 081.832.816-99

