



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

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.

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-SHAIFY;

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).

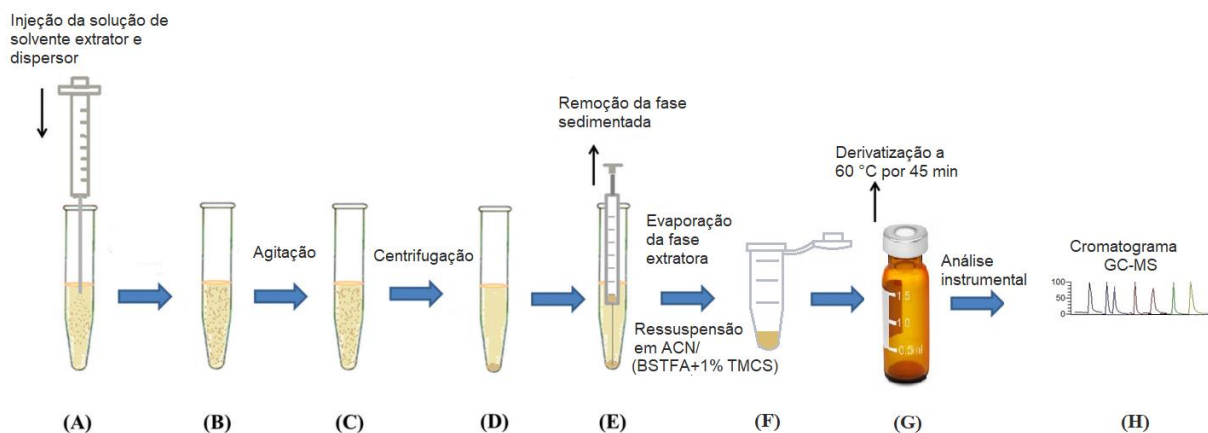
A DLLME foi inicialmente proposta por Rezaee e colaboradores (2006) e está esquematizada na figura 1. Nessa técnica são utilizados um solvente chamado de dispersor, que deve ser miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), e um solvente extrator, que deve ser insolúvel na 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).

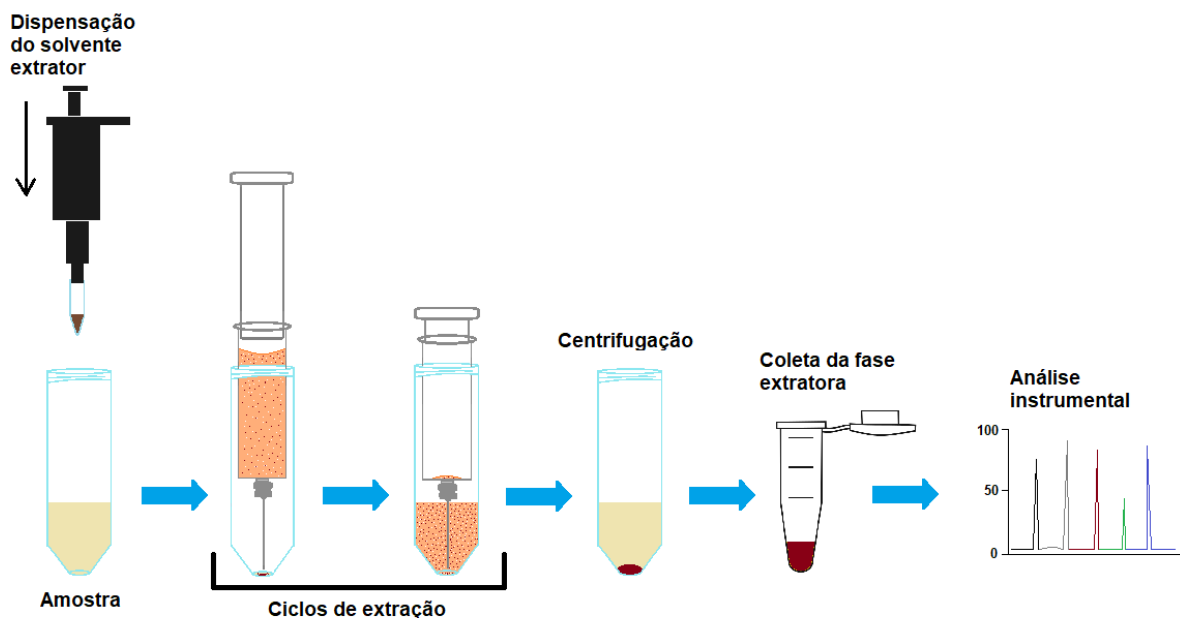
Figura 1: Descrição das etapas realizadas no método de extração da DLLME (Fonte: o autor).



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 (μL) (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.

6. CONCLUSÃO

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>. 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 (μ 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 β -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.

